Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

►**B**

SMĚRNICE RADY 93/85/EHS

ze dne 4. října 1993

o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru

(Úř. věst. L 259, 18.10.1993, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
►**M1**	Směrnice Komise 2006/56/ES ze dne 12. června 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

SMĚRNICE RADY 93/85/EHS

ze dne 4. října 1993

o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru

RADA EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství, a zejména na článek 43 této smlouvy,

s ohledem na návrh Komise ([1]),

s ohledem na stanovisko Evropského parlamentu ([2]),

s ohledem na stanovisko Hospodářského a sociálního výboru ([3]),

vzhledem k tomu, že produkce brambor zaujímá významné místo v zemědělství Společenství; že výnos z této produkce je soustavně ohrožován škodlivými organismy;

vzhledem k tomu, že ochranou pěstování brambor proti těmto škodlivým organismům by měla nejen být zachována jejich produkční kapacita, ale také zvýšena zemědělská produktivita;

vzhledem k tomu, že ochranná opatření proti zavlékání škodlivých organismů do jednotlivých členských států by měla pouzeomezený účinek, pokud by proti těmto organismům neexistovala souběžná a metodicky řízená ochrana v celém Společenství a nezamezovalo se jejich rozšiřování;

vzhledem k tomu, že jedním z nejnebezpečnějších škodlivých organismů pro brambory je *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.,* původce bakteriální kroužkovitosti bramboru; že se tato choroba vyskytla v určitých částech Společenství a dosud existují některé menší zdroje choroby;

vzhledem k tomu, že dokud nebudou přijata účinná opatření k ochraně proti této chorobě a k zamezení jejího šíření, je pěstování brambor v celém Společenství trvale ohroženo;

vzhledem k tomu, že k dosažení tohoto cíle je nezbytné, aby Společenství přijalo některá opatření; že by kromě opatření uvedených ve směrnici Rady 77/93/EHS ze dne 21. prosince 1976 o ochranných opatřeních proti zavlékání organismů škodlivých rostlinám nebo rostlinným produktům do členských států ([4]) mělo být členským státům umožněno přijmout v případě potřeby doplňující nebo přísnější opatření, pokud jsou taková opatření nezbytná a nejsou překážkou obchodu s bramborami uvnitř Společenství; že tato opatření musí být oznámena ostatním členským státům a Komisi;

vzhledem k tomu, že směrnice Rady 80/665/EHS ze dne 24. června 1980 o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru ([5]) stanovila minimální opatření, která mají členské státy učinit proti bakteriální kroužkovitosti bramboru;

vzhledem k tomu, že od té doby byl v poznatcích o bakteriální kroužkovitosti bramboru a o zjišťování patogenů bakteriální kroužkovitosti bramboru učiněn výrazný pokrok;

vzhledem k tomu, že použití rostlinolékařského režimu Společenství pro Společenství jako prostor bez vnitřních hranic si vyžádalo přezkoumání a revizi některých ustanovení směrnice 80/665/EHS;

vzhledem k tomu, že v důsledku tohoto přezkoumání byla ustanovení směrnice 80/665/EHS shledána nedostatečnými a je nezbytné stanovená opatření dále upřesnit;

([1]) Úř. věst. C 93, 2.4.1993, s. 12.
([2]) Úř. věst. C 176, 28.6.1993, s. 210.
([3]) Úř. věst. C 161, 14.6.1993, s. 18.
([4]) Úř. věst. L 26, 31.1.1977, s. 20. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Komise 92/103/EHS (Úř. věst. L 363, 11.12.1992, s. 1).
([5]) Úř. věst. L 180, 14. 7.1980, s. 30.

▼B

vzhledem k tomu, že by za této situace měla být zrušena směrnice 80/665/EHS a měla by být přijata nezbytná opatření;

vzhledem k tomu, že opatření musí přihlédnout ke skutečnosti, že choroba může zůstat skrytá a nepozorovaná jak v rostoucí plodině, tak i ve skladovaných hlízách, a může se jí účinně předcházet pouze pěstováním a používáním sadbových brambor, které jsou prosté infekce, a že pro určení ohnisek choroby jsou nezbytná pravidelná úřední šetření; že rozšíření patogenu v rostoucí plodině není nejdůležitějším faktorem, ale že patogen může přečkat zimu v bramborových rostlinách, které se vysemenily přirozeným způsobem (planě rostoucí rostliny), a ty jsou hlavním zdrojem choroby, která se přenáší z jednoho období do druhého; že se patogen většinou rozšiřuje při kontaktu brambor s napadenými bramborami a sázecím, sklízecím a manipulačním zařízením nebo dopravními a skladovacími kontejnery, které byly zamořeny při dřívějším kontaktu s napadenými bramborami; že tyto předměty mohou zůstat zamořenými po určitou dobu po tomto zamoření; že může být rozšíření patogenu sníženo nebo mu lze předejít dezinfekcí těchto předmětů; že každá takové zamoření sadbových brambor přináší velmi velké nebezpečí rozšíření patogenu;

vzhledem k tomu, že je žádoucí, aby členské státy úzce spolupracovaly s Komisí v rámci Stálého rostlinolékařského výboru (dále jen „výbor") při stanovení podrobností těchto obecných, jakož přísnějších nebo doplňujících opatření, učiněných členskými státy na ochranu proti zavlečení patogenu na jejich území,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Směrnice se týká opatření, která mají být přijata členskými státy proti *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al.* ssp. *sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al.,* vyvolávající bakteriální kroužkovitost bramboru (dále jen „organismus"), aby:

a) se zjistilo ohnisko choroby a určilo její rozšíření;

b) se předešlo výskytu choroby a jejímu rozšíření; a

c) se v případě výskytu předešlo rozšíření a prováděla se ochranná opatření za účelem její eradikace.

Článek 2

1. Členské státy provádějí za účelem potvrzení nepřítomnosti organismu pravidelná úřední šetření organismu zaměřená na zjištění organismu na hlízách a v případě potřeby na rostlinách bramboru (*Solanum tuberosum L.*) pocházejících z jejich území.

Pro tato šetření se v případě hlíz odebírají vzorky sadbových i ostatních brambor, především ze skladovaných zásilek, a podrobují se úředním nebo úředně kontrolovaným laboratorním testům pomocí metody na zjištění a určení organismu uvedené v příloze I. Kromě toho může být v případě potřeby u ostatních vzorků provedena úřední nebo úředně kontrolovaná vizuální kontrola rozříznutím hlíz.

U rostlin se tato šetření provádějí podle odpovídajících metod a vzorky se podrobují příslušným úředním nebo úředně kontrolovaným testům.

O počtu, původu, složení a časovém rozvrhu při shromažďování vzorků rozhodnou příslušné úřední subjekty podle směrnice 77/93/EHS na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad a biologie organismu a s přihlédnutím k zvláštním systémům produkce brambor příslušných členských států. Podrobnosti týkající se těchto šetření se předkládají ročně ostatním členským státům a Komisi, aby se zajistily srovnatelné úrovně záruk členských států pro potvrzení nepřítomnosti organismu.

2. Výsledky úředních šetření stanovených v odstavci 1 se oznamují nejméně jednou ročně ostatním členským státům a Komisi. Podrobnosti těchto oznámení jsou důvěrné. Mohou být předloženy výboru postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

▼B

3. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata:

— pravidla pro šetření stanovená v odstavci 1, která se provádějí na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad,

— pravidla pro oznámení uvedená v odstavci 2.

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS se přijmou tato ustanovení:

— vhodná metoda pro šetření a testy uvedené v odst. 1 třetím pododstavci.

Článek 3

Členské státy zajistí, aby bylo jakékoli podezření z výskytu nebo potvrzená přítomnost organismu v rostlinách bramboru a hlízách nebo v hlízách sklízených, skladovaných nebo uváděných na trh na jejich území sděleny příslušným úředním subjektům těchto členských států.

Článek 4

1. V případě podezření z výskytu zajistí příslušné úřední subjekty členského státu, ve kterém byly tyto případy ohlášeny, provedení úředních nebo úředně kontrolovaných laboratorních testů pomocí metody uvedené v příloze I a za podmínek uvedených v bodě 1 přílohy II, aby potvrdily nebo vyvrátily podezření z výskytu. Je-li potvrzena přítomnost organismu, použije se bod 2 přílohy II.

2. Až do potvrzení nebo vyvrácení podezření z výskytu podle odstavce 1, v případech, kdy byly zjištěny:

i) diagnostické vizuální příznaky choroby; nebo

ii) pozitivní reakce na imunofluorescenční test podle přílohy I nebo jiný odpovídající test;

příslušné úřední subjekty členských států:

a) zakážou pohyb všech partií nebo zásilek, ze kterých byly odebrány vzorky, s výjimkou partií nebo zásilek, které jsou pod jejich kontrolou, a u nichž bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu;

b) učiní nezbytná opatření, aby zjistily původ podezřelého výskytu;

c) zavedou vhodná doplňující bezpečnostní opatření založená na stupni odhadovaného nebezpečí, aby předešly jakémukoli rozšíření organismu. Mezi tato opatření může být zahrnuta úřední kontrola pohybu všech ostatních hlíz nebo rostlin v rámci prostor nebo mimo prostory spojené s podezřelým výskytem.

3. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata tato ustanovení:

— ustanovení uvedená v odst. 2 písm. c).

4. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS se přijímají tato ustanovení:

— jiný odpovídající test stanovený v odst. 2 bodu ii).

Článek 5

1. Pokud úřední nebo úředně kontrolovaný laboratorní test pomocí metody uvedené v příloze I potvrdí přítomnost organismu ve vzorku hlíz, rostlin nebo částí rostlin, příslušné úřední subjekty členského státu na základě uznávaných vědeckých zásad, biologie organismu a zvláštních systémů produkce, uvádění na trh nebo zpracování v daném členském státě:

a) označí hlízy nebo rostliny, zásilku a/nebo partii, a zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad nebo jejich jednotky a veškeré jiné předměty včetně obalového materiálu, z něhož byl vzorek odebrán, a v případě potřeby místo(a) produkce a pozemky, na nichž se hlízy nebo rostliny sklízely, za zamořené;

▼B

b) s přihlédnutím k bodu 1 přílohy III určí rozsah pravděpodobného zamoření, které vzniklo předsklizňovým nebo posklizňovým kontaktem s prvky označenými za zamořené nebo vztahem s nimi v rámci produkčního systému;

c) vymezí oblast na základě označení zamoření podle písmene a), určí rozsah pravděpodobného zamoření podle písmene b) a možného rozšíření organismu s přihlédnutím k bodu 2 přílohy III.

2. Členské státy neprodleně oznámí postupem podle bodu 3 přílohy III ostatním členským státům a Komisi jakékoli zamoření označené podle odst. 1 písm. a), jakož i podrobné informace o vymezení oblasti podle odst. 1 písm. c).

Podrobnosti tohoto oznámení jsou důvěrné. Mohou být předloženy výboru postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

3. V důsledku oznámení podle odstavce 2 a podle prvků v něm uvedených označí ostatní členské státy, které jsou v oznámení uvedeny, přiměřeným způsobem zamoření podle odst. 1 písm. a), stanoví rozsah pravděpodobného zamoření podle odst. 1 písm. b) a vymezí oblast podle odst. 1 písm. c).

Článek 6

Členské státy nařídí, aby se v případě označení hlíz nebo rostlin za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) provedlo v souladu s čl. 4 odst. 1 testování zásob brambor klonově příbuzných zamořeným bramborám. Testování se provede na takovém množství hlíz nebo rostlin, které je potřeba ke stanovení prvotního zdroje choroby a rozsahu pravděpodobného zamoření, a zejména podle stupně nebezpečí.

V důsledku testování se v případě potřeby provede další označení zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. a), určení rozsahu pravděpodobného zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. b) a vymezení oblasti podle čl. 5 odst. 1 písm. c).

Článek 7

1. Členské státy nařídí, že hlízy nebo rostliny označené za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nesmí být sázeny a musí být pod kontrolou jejich příslušných úředních subjektů:

— zničeny nebo

— odstraněny jiným způsobem v rámci opatření prováděných pod úřední kontrolou v souladu s bodem 1 přílohy IV, pokud bylo stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu

2. Členské státy nařídí, že se hlízy nebo rostliny označené jako pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b) nesmí sázet a musí být pod kontrolou příslušných úředních subjektů, aniž jsou dotčeny výsledky testů uvedených v článku 6 pro klonově příbuzné hlízy nebo rostliny, použity nebo odstraněny vhodným způsobem uvedeným v bodě 2 přílohy IV tak, aby mohlo být stanoveno, že neexistuje zjistitelné nebezpečí rozšíření organismu.

3. Členské státy nařídí, že každé zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad nebo jejich jednotky a veškeré jiné předměty včetně obalového materiálu, které byly označeny za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nebo označeny za pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b), se buď zničí, nebo vyčistí a dezinfikují příslušnými metodami uvedenými v bodu 3 přílohy IV. Po vydezinfikování se takové předměty již nepovažují za zamořené.

4. Aniž jsou dotčena ustanovení provedená podle odstavců 1, 2 a 3, členské státy nařídí, aby byla v oblasti vymezené podle čl. 5 odst. 1 písm. c) provedena různá opatření podle bodu 4 přílohy IV.

▼B

Článek 8

1. Členské státy nařídí, že sadbové brambory musí splňovat požadavky směrnice 77/93/EHS a musí v přímé linii pocházet z materiálu získaného podle úředně schváleného programu, který byl při úředním nebo úředně kontrolovaném testu pomocí metody uvedené v příloze I shledán prostým organismu.

Uvedené testování se provádí:

— v případech, kdy se zamoření týká produkce sadbových brambor na rostlinách původního klonového výběru,

— v ostatních případech buď na rostlinách původního klonového výběru, nebo na reprezentativních vzorcích základní kategorie sadbových brambor nebo dřívějších stupňů množení.

2. Postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS mohou být přijata tato ustanovení:

— prováděcí pravidla k odst. 1 druhému pododstavci první odrážce,

— pravidla týkající se reprezentativních vzorků stanovených v odst. 1 druhém pododstavci tohoto článku.

Článek 9

Členské státy zakážou držení organismu a nakládání s ním.

Článek 10

Aniž jsou dotčena ustanovení směrnice 77/93/EHS, členské státy jsou oprávněny povolit odchylky od opatření uvedených v článcích 6, 7 a 9 této směrnice k pokusným nebo vědeckým účelům a k šlechtitelské práci, pokud tyto odchylky nejsou na újmu ochrany proti organismu a nevyvolávají nebezpečí jeho rozšíření.

Článek 11

Členské státy mohou přijmout doplňující nebo přísnější pravidla k ochraně proti organismu nebo k zabránění jeho rozšíření, pokud jsou tato opatření v souladu se směrnicí 77/93/EHS.

Doplňující opatření uvedená v prvním pododstavci mohou zahrnovat povinnost sázet pouze sadbové brambory, které jsou certifikované nebo úředně prověřené a které splňují požadované rostlinolékařské normy. Tyto rostlinolékařské normy lze použít zejména v případě, kdy jsou zemědělci ve svých podnicích oprávněni k používání sadbových brambor získaných z vlastní sklizně, jakož i v ostatních případech, kdy se sázejí sadbové brambory vypěstované producentem.

Podrobnosti o těchto opatřeních se oznamují ostatním členským státům a Komisi.

Článek 12

Změny příloh této směrnice na základě vývoje vědeckých nebo technických znalostí se přijmou postupem podle článku 16a směrnice 77/93/EHS.

Článek 13

1. Členské státy přijmou a zveřejní ustanovení nezbytná pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 15. listopadu 1993. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním zveřejnění. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Členské státy použijí tato ustanovení ode dne 16. listopadu 1993.

2. Členské státy neprodleně sdělí Komisi znění všech ustanovení vnitrostátních právních předpisů, které přijmou v oblasti působnosti této směrnice. Komise o nich uvědomí ostatní členské státy.

▼B

Článek 14

Směrnice 80/665/EHS se zrušuje ode dne 16. listopadu 1993.

Článek 15

Tato směrnice je určena členským státům.

▼M1

PŘÍLOHA I

SCHÉMA TESTU PRO DIAGNÓZU, ZJIŠTĚNÍ A IDENTIFIKACI BAKTERIÁLNÍ KROUŽKOVITOSTI BRAMBORU, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **subsp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann et Kotthoff) Davis** *et al.*

OBLAST PŮSOBNOSTI SCHÉMATU TESTU

Předložené schéma popisuje různé postupy, které jsou součástí:

i) diagnózy kroužkovitosti v hlízách bramboru a rostlinách bramboru;

ii) zjištění *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vzorcích hlíz bramboru a rostlin bramboru;

iii) identifikace *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus (C. m.* subsp. *sepedonicus*).

OBECNÉ ZÁSADY

Optimalizované protokoly pro různé metody, validovaná činidla a podrobnosti pro přípravu testovaných a kontrolních materiálů jsou uvedeny v dodatcích. Seznam laboratoří, které se podílely na optimalizaci a validaci protokolů, je v dodatku 1.

Protože protokoly obsahují zjištění karanténního organismu a budou zahrnovat použití životaschopných kultur *C. m.* subsp. *sepedonicus* jako kontrolních materiálů, bude nutné provádět postupy za vhodných karanténních podmínek s odpovídajícím zařízením na odstraňování odpadů a za podmínek příslušných povolení vydaných úředními orgány pro karanténu rostlin.

Testovací parametry musí zajistit stálé a reprodukovatelné zjištění úrovní *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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, jak je uvedeno v čl. 4 odst. 2 směrnice 93/85/EHS, naznačuje pozitivní výsledek z diagnostických nebo screeningových testů provedených na vzorku, jak je znázorněno v níže uvedených postupových diagramech.

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

Z toho důvodu je pozitivní IF test podle čl. 4 odst. 2 definován jako pozitivní výsledek IF testu potvrzený druhým screeningovým testem (PCR/FISH).

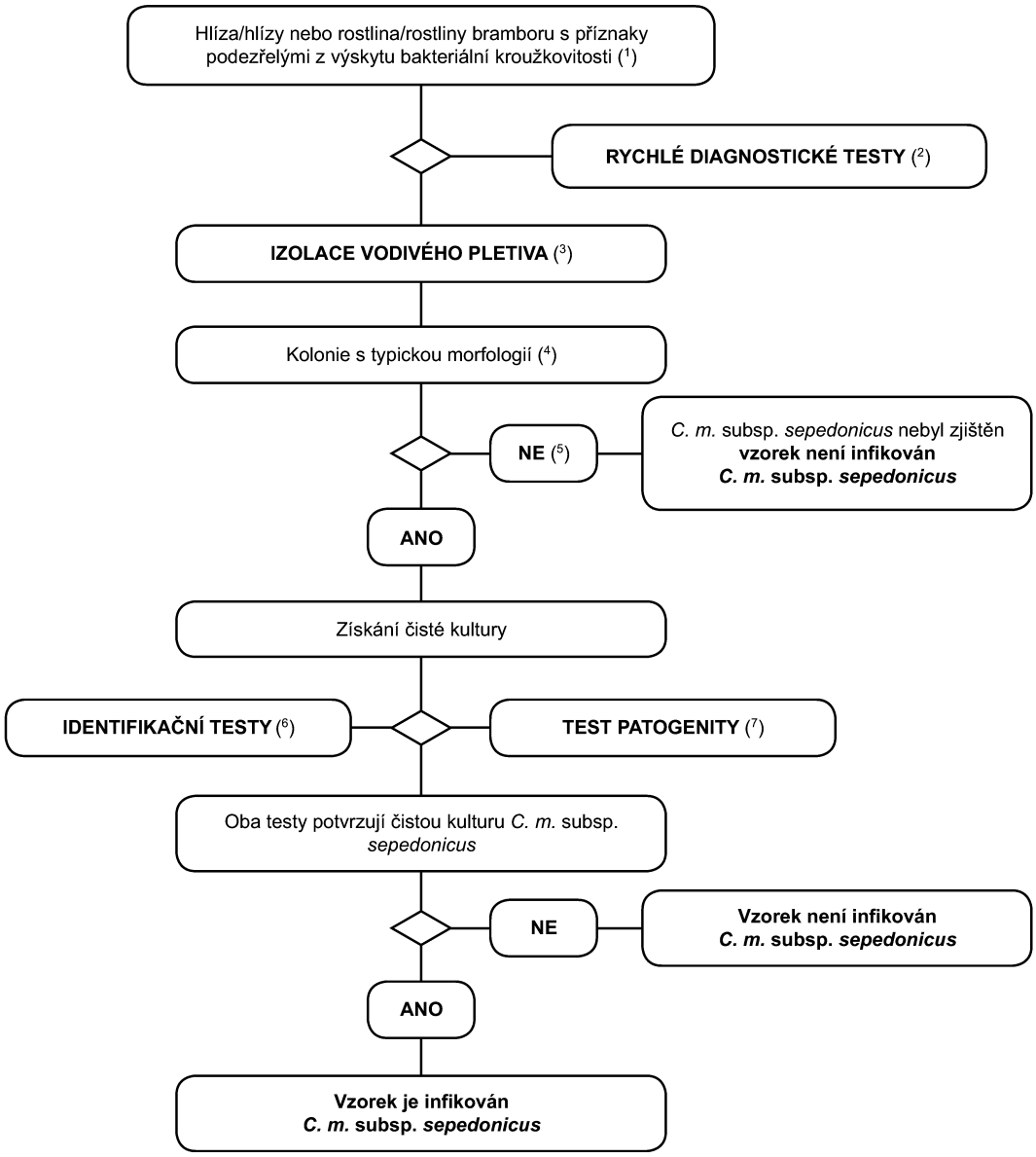
Potvrzená přítomnost podle čl. 5 odst. 1 směrnice 93/85/EHS vyžaduje izolaci a identifikaci čisté kultury *C. m.* subsp. *sepedonicus* s potvrzením patogenity.

1. PREZENTACE POSTUPOVÉHO DIAGRAMU

1.1 **Detekční schéma pro diagnózu bakteriální kroužkovitosti v hlízách bramboru a v rostlinách bramboru vykazujících příznaky bakteriální kroužkovitosti**

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

▼M1



(1) Popis příznaků naleznete v oddíle 2.

(2) Vhodné testy jsou:
— IF test (oddíl 4),
— PCR test (oddíl 6),
— FISH test (oddíl 5).

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

(4) Popis typické morfologie kolonie naleznete v oddíle 8.

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

(6) Spolehlivé identifikace čisté kultury *C. m.* subsp. *sepedonicus* se dosáhne za použití testů uvedených v oddílu 9.

(7) Zkouška patogenity je popsána v oddíle 10.

▼**M1**

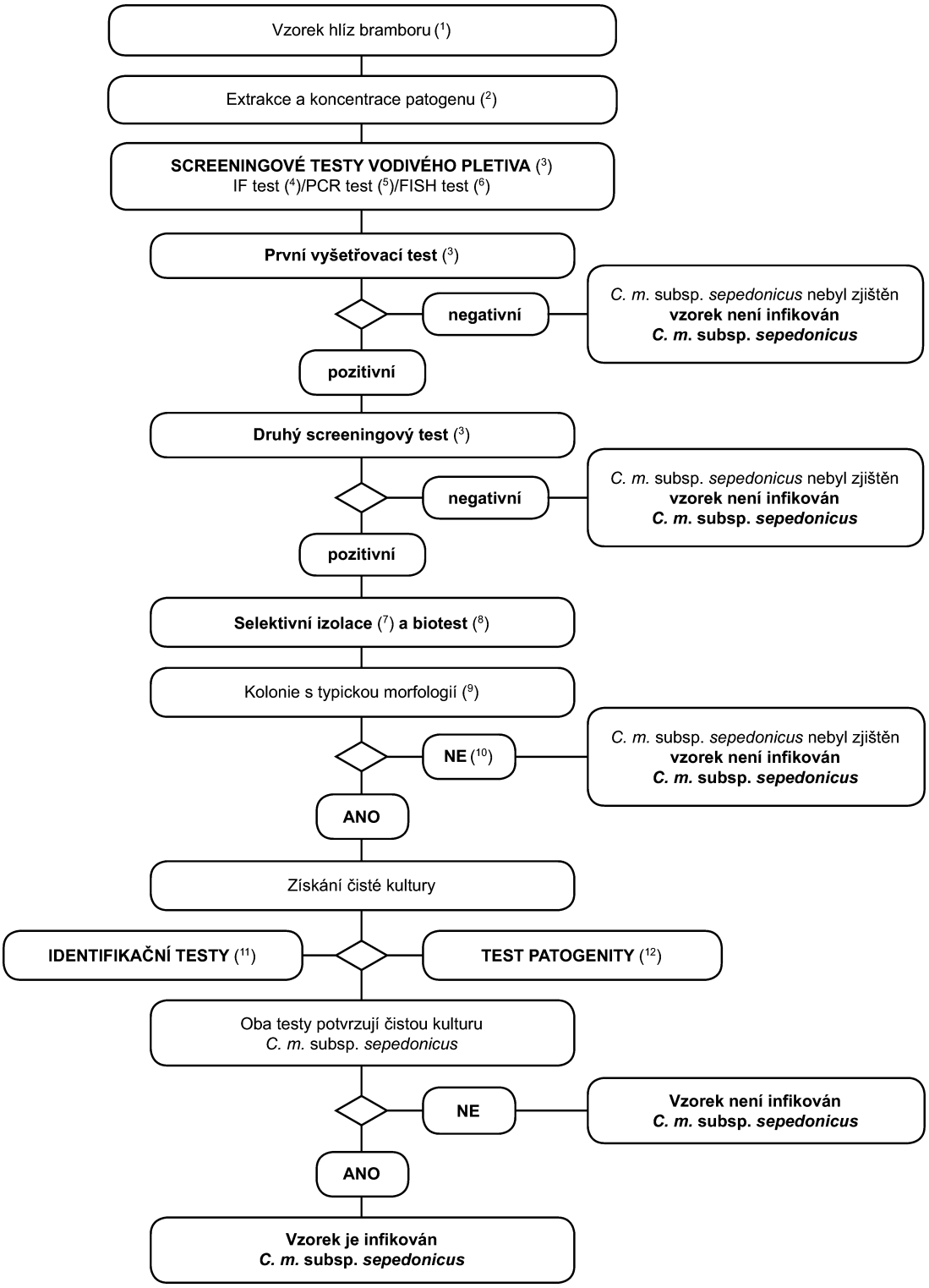
1.2 **Schéma pro zjištění a identifikaci** *Clavibacter michiganensis* **subsp.** *sepedonicus* **ve vzorcích bezpříznakových hlíz bramboru**

Princip

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

Screeningové testy a izolační testy musí umožnit detekční práh 10^3 až 10^4 buněk/ml resuspendované pelety zahrnutý jako pozitivní kontroly v každé sérii testů.

▼M1


Vzorek hlíz bramboru (1)
Extrakce a koncentrace patogenu (2)
SCREENINGOVÉ TESTY VODIVÉHO PLETIVA (3)
IF test (4)/PCR test (5)/FISH test (6)
První vyšetřovací test (3)
negativní
C. m. subsp. sepedonicus nebyl zjištěn
vzorek není infikován
C. m. subsp. sepedonicus
pozitivní
Druhý screeningový test (3)
negativní
C. m. subsp. sepedonicus nebyl zjištěn
vzorek není infikován
C. m. subsp. sepedonicus
pozitivní
Selektivní izolace (7) a biotest (8)
Kolonie s typickou morfologií (9)
NE (10)
C. m. subsp. sepedonicus nebyl zjištěn
vzorek není infikován
C. m. subsp. sepedonicus
ANO
Získání čisté kultury
IDENTIFIKAČNÍ TESTY (11)
TEST PATOGENITY (12)
Oba testy potvrzují čistou kulturu
C. m. subsp. sepedonicus
NE
Vzorek není infikován
C. m. subsp. sepedonicus
ANO
Vzorek je infikován
C. m. subsp. sepedonicus

▼**M1**

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

([2]) Metody extrakce a koncentrace patogenu jsou popsány v oddílu 3.1.

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

([4]) Test imunofluorescence (IF).
Pro vyšetření IF vždy používejte polyklonální protilátku, další monoklonální protilátky mohou umožnit větší přesnost (viz oddíl 4).

([5]) PCR test.
Používejte vhodná validovaná PCR činidla a protokoly (viz oddíl 6).

([6]) Fish test.
Používejte validovaná činidla a protokoly (viz oddíl 5).

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

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

([9]) Typická morfologie kolonie je popsána v oddílu 8.

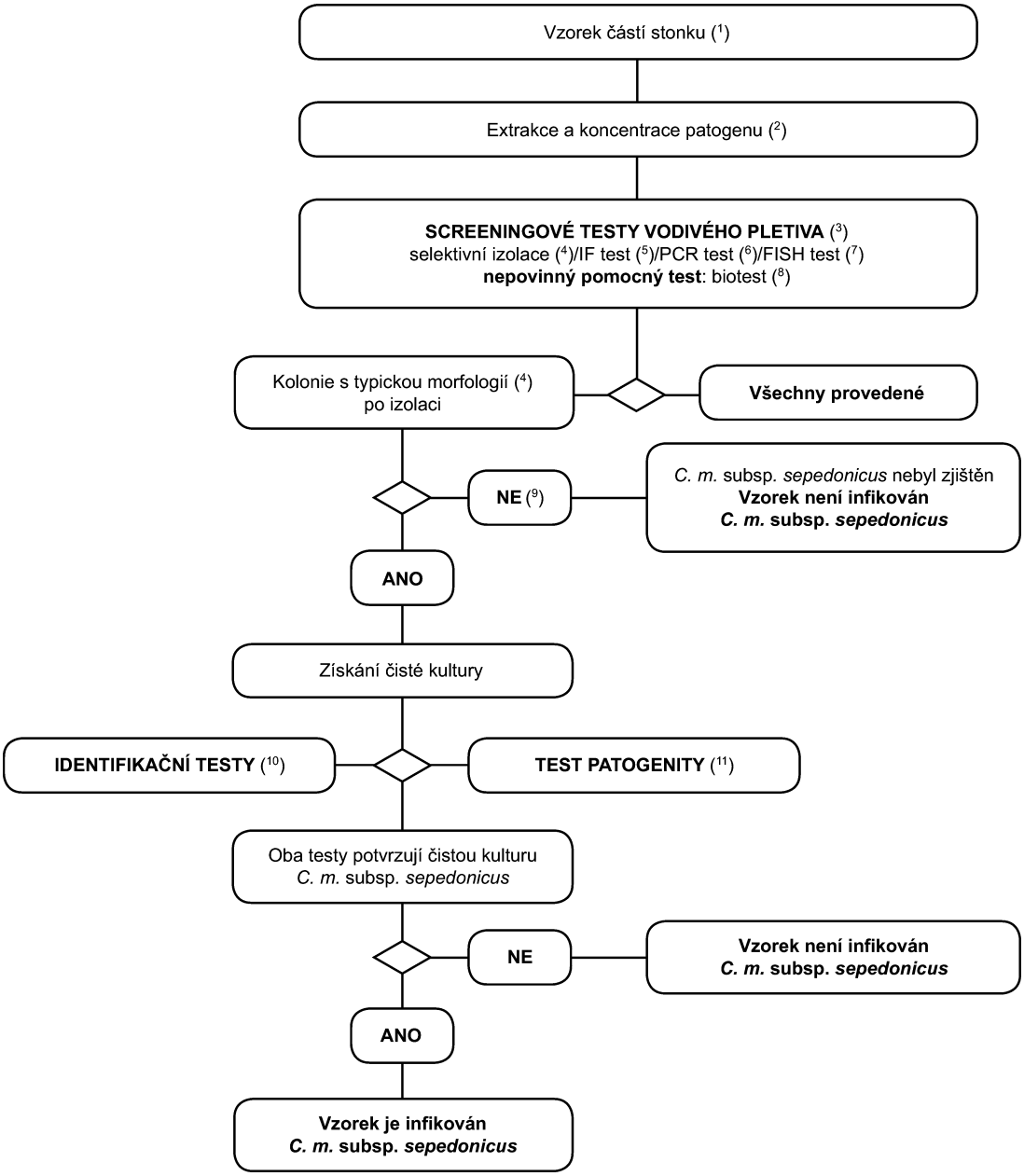
([10]) Kultivace nebo biotesty mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky screeningových testů pozitivní, ale izolační testy jsou negativní, opakujte izolační testy ze stejné pelety nebo dodatečným odebráním vodivého pletiva z blízkosti pupkového konce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

([11]) Spolehlivé identifikace čistých kultur podezřelých na *C. m.* subsp. *sepedonicus* se dosáhne použitím testů popsaných v oddílu 9.

([12]) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

▼M1

1.3 **Schéma pro zjištění a identifikaci** *Clavibacter michiganensis* **subsp.** *sepedonicus* **ve vzorcích bezpříznakových rostlin bramboru**



▼**M1**

(1) Doporučené velikosti vzorků – viz oddíl 3.2.

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

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

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

(5) IF test je popsán v oddílu 4.

(6) PCR testy jsou popsány v oddílu 6.

(7) FISH test je popsán v oddílu 5.

(8) Biotest je popsán v oddílu 7.

(9) Kultivace nebo biotest mohou selhat z důvodů konkurence nebo inhibice saprofytickými bakteriemi. Pokud jsou výsledky scrreningových testů pozitivní, ale izolační testy jsou negativní, opakujte izolační testy a v případě potřeby proveďte test dalších vzorků.

(10) Spolehlivé identifikace čistých kultur, u kterých je podezření, že se jedná o *C. m.* subsp. *sepedonicus*, se dosáhne pomocí testů

(11) Test patogenity je popsán v oddílu 10.

▼M1

2. VIZUÁLNÍ VYŠETŘENÍ NA PŘÍTOMNOST PŘÍZNAKŮ KROUŽKOVITOSTI

2.1 **Rostliny bramboru**

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

2.2 **Hlízy bramboru**

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

3. PŘÍPRAVA VZORKŮ

3.1 **Hlízy bramboru**

Poznámka:

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

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

— Níže popsaný bramborový extrakt lze použít také pro zjištění původce hnědé hniloby, *Ralstonia solanacearum.*

Nepovinné ošetření před přípravou vzorku:

Omyjte hlízy. Použijte vhodné dezinfekční prostředky (s obsahem chlóru, jestliže má být proveden PCR test, pro odstranění možné patogenní DNA) a mycí prostředky mezi každým vzorkem. Nechte hlízy oschnout na vzduchu. Tento postup mytí je obzvlášť užitečný (není však vyžadován) pro vzorky v případě, že je ve vzorku příliš zeminy a jestliže se má provádět PCR test nebo přímá izolace.

3.1.1 Pomocí čistého a dezinfikovaného skalpelu nebo nože na zeleninu odstraňte slupku na pupkovém konci každé hlízy. Opatrně vyřízněte malé výkrojky vodivého pletiva z pupkové části a množství pletiva nezahrnující cévní svazky omezte na minimum (viz internetovou stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Poznámka:

Všechny hlízy s podezřelými příznaky bakteriální kroužkovitosti dejte stranou a testujte odděleně.

▼M1

Pokud jsou při vyříznutí výkrojku z pupkového konce zjištěny příznaky podezření z kroužkovitosti, mělo by se provést vizuální vyšetření této hlízy po naříznutí hlízy na pupkovém konci. Všechny naříznuté hlízy s podezřelými příznaky by měly korkovatět po dobu 2 dnů při pokojové teplotě a měly by být uchovávány v karanténě (při v 4–10 °C) až do ukončení všech testů. Všechny hlízy ve vzorku (včetně hlíz s podezřelými příznaky) by měly být uchovány podle přílohy II.

3.1.2 Shromážděte výkrojky z pupkové části do nepoužitých nádob na jedno použití, které jsou uzavíratelné a/nebo utěsnitelné (v případě, že jsou nádoby znovu používány, musí být důkladně vyčištěny a dezinfikovány prostředky s obsahem chlóru). Nejlépe je zpracovat výkrojky z pupkového konce okamžitě, pokud to není možné, uchovávejte je v nádobě bez přidání pufru, v chladu po dobu maximálně 72 hodin nebo při pokojové teplotě maximálně 24 hodin. Schnutí a suberizace výkrojků a růst saprofytů v průběhu skladování může bránit zjištění přítomnosti bakterie způsobující kroužkovitost.

3.1.3 Zpracujte výkrojky z pupkového konce jedním z následujících postupů:

a) buďto zalijte výkrojky dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 3) a třepejte v rotační třepačce (50–100 ot/min) po dobu 4 hodin při teplotě nižší než 24 °C nebo po dobu 16–24 hodin chlazené,

nebo

b) homogenizujte výkrojky s dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 3), buď v mixéru (např. Waring nebo Ultra Thurax) nebo rozdrcením v utěsněném jednorázovém maceračním sáčku (např. silný polyethylenový sáček Stomacher nebo Bioreba, 150 mm × 250 mm; sterilovaný zářením) za použití gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení (např. Homex).

Poznámka:

Při homogenizaci vzorků za použití mixéru existuje vysoké nebezpečí křížové kontaminace vzorků. Učiňte bezpečnostní opatření pro zamezení vzniku aerosolu nebo rozlití během extrakce. Zajistěte, aby pro každý vzorek bylo použito čerstvě sterilizované ostří (nože) a nádoby. Pokud má být použit PCR test, zamezte přenosu DNA na nádoby nebo mlecí zařízení. Pokud má být použit PCR test, doporučuje se drcení v sáčcích na jedno použití a použití zkumavky na jedno použití.

3.1.4 Dekantujte supernatant. Pokud je nadměrně zakalený, pročistěte jej buď pomalým odstředěním (při maximálně 180 g po dobu 10 minut při teplotě mezi 4–10 °C) nebo vakuovou filtrací (40–100 µm), filtr omyjte přídavkem (10 ml) extrakčního pufru (dodatek 3).

3.1.5 Zahustěte bakteriální frakci odstřeďováním při 7 000 g po dobu 15 minut (nebo 10 000 g po dobu 10 minut) při teplotě mezi 4–10 °C a odstraňte supernatant, aniž by se rozvířila peleta.

3.1.6 Resuspendujte peletu v 1,5 ml peletového pufru (dodatek 3). Použijte 500 µl pro test na *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 µl pro *Ralstonia solanacearum* a 500 µl pro referenční účely. Přidejte sterilní glycerol na konečnou koncentraci 10–25 % (v/v) k 500 µl referenční poměrné části a ke zbývající části vzorku, promíchejte vířením a uložte při teplotě –16 až –24 °C (týdny) nebo při teplotě -68 až –86 ° C (měsíce). Extrakty uchovávejte během testování při teplotě 4–10 °C.

Opakované zmrazení a rozmrazení se nedoporučuje.

Pokud je nutný transport extraktu, zajistěte přepravu v chladícím boxu do 24 až 48 hodin.

3.1.7 Je nezbytně nutné, aby se se všemi pozitivními kontrolami a vzorky *C. m.* subsp. *sepedonicus* zacházelo odděleně, aby se předešlo kontaminaci. To platí i pro sklíčka na IF testy a všechny testy.

3.2 **Rostliny bramboru**

Poznámka:

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

▼M1

3.2.1 Pomocí čistého dezinfikovaného nože nebo zahradnických nůžek odstraňte část o velikosti 1–2 cm ze spodní strany každého stonku přímo nad povrchem země.

Části stonků krátce dezinfikujte etanolem 70 % a okamžitě osušte savým papírem.

Shromažďujte části stonků v uzavření sterilní nádobě podle následujících postupů vzorkování:

3.2.2 Zpracujte části stonků jedním z následujících postupů:

a) buďto zalijte části dostatečným množstvím (přibližně 40 ml) extrakčního pufru (dodatek 3) a třepejte v rotační třepačce (50–100 ot/min) po dobu 4 hodin při teplotě nižší než 24 °C nebo po dobu 16–24 hodin chlazené,

anebo

b) okamžitě zpracujte rozdrcením částí v pevném maceračním sáčku (např. Stomacher nebo Bioreba) s přiměřeným množstvím extrakčního pufru (dodatek 3) za použití gumového tloučku nebo vhodného mlecího zařízení (např. Homex). Pokud to není možné, skladujte části stonků v chladu maximálně 72 hodin nebo maximálně 24 hodin při pokojové teplotě.

3.2.3 Po usazení, které má trvat 15 minut, dekantujte supernatant.

3.2.4 Další purifikace extraktu nebo koncentrace bakteriální frakce obvykle není nutná, ale lze ji dosáhnout filtrací a/nebo odstředěním podle popisu v oddílu 3.1.4–3.1.6.

3.2.5 Rozdělte čistý nebo koncentrovaný vzorkový extrakt na 2 stejné části. Jednu polovinu udržujte během testování při teplotě 4–10 °C a druhou polovinu skladujte s 10–25 % (v/v) sterilního glycerolu při teplotě –16 až –24 °C (týdny) nebo při teplotě –68 až –86 °C (měsíce), pokud je nutné další testování.

4. IF TEST

Princip

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

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

Poznámka:

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

Používejte protilátky proti referenčnímu kmeni *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Doporučuje se určovat titr pro každou novou řadu protilátek. Titr je stanoven jako nejvyšší ředění, při kterém dochází k optimální reakci při testování suspenze obsahující 10^5 až 10^6 buněk na 1 ml homologického kmene *C. m.* subsp. *sepedonicus* a při použití vhodného konjugátu fluorescenčního isothiokyanatanu (FITC) podle doporučení výrobce. Nezpracované polyklonální nebo monoklonální protilátky by měly mít IF titr alespoň 1:2000. Během testu by se měly protilátky používat v pracovním ředění (WD) v blízkosti titru nebo na titru. Používejte validované protilátky (viz internetovou stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Test by měl být prováděn na čerstvě připravených vzorkových extraktech. V případě potřeby může být úspěšně proveden na extraktech skladovaných při –68 až –86 °C v glycerolu. Glycerol lze ze vzorku odstranit přidáním 1 ml peletového pufru (dodatek 4), opětovným odstředěním po dobu 15 minut při 7 000 g a resuspenzí ve stejném množství peletového pufru. To často není nutné, zejména pokud jsou sklíčka se vzorky fixována plamenem (viz 2.2).

Připravte oddělené pozitivní kontrolní sklíčka s homologickým kmenem nebo s jiným srovnávacím kmenem *C. m.* subsp. *sepedonicus*, suspendovaném ve výluhu z brambor podle dodatku 2, a nepovinně v pufru.

▼M1

Pletivo infikované přirozenou cestou (uchovávané lyofilizací nebo zmrazením při teplotě –16 až –24 °C) by se mělo podle možnosti použít jako paralelní kontrola na stejném podložním sklíčku.

Jako negativní kontroly použijte alikvotní části vzorkových extraktů, které byly předtím testovány s negativním výsledkem.

Používejte mikroskopická sklíčka s více okénky, nejlépe s 10 okénky o průměru nejméně 6 mm.

Proveďte test kontrolního materiálu stejným způsobem jako test vzorku (vzorků).

4.1 Připravte sklíčka na test jedním z následujících postupů:

i) Pro pelety s relativně nízkým množstvím škrobového sedimentu:

Napipetujte měřené standardní množství (pro okénka o průměru 6 mm je vhodné 15 µl – pro větší okénka objem zvyšte) roztoku resuspendované bramborové pelety 1/100 do prvního okénka. Následně napipetujte stejné množství nezředěné pelety (1/1) do zbývajících okének v řadě. Druhou řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek podle obrázku 1.

ii) Pro jiné pelety:

Připravte desetinná ředění (1/10 a 1/100) resuspendované pelety v peletovém pufru. Napipetujte měřené standardní množství (pro okénka o průměru 6 mm je vhodné 15 µl – pro větší okénka objem zvyšte) resuspendované pelety 1/100 a každého roztoku do řady okének. Druhou řadu lze použít jako duplikát nebo pro druhý vzorek podle obrázku 2.

4.2 Vysušte kapky při pokojové teplotě nebo zahřátím na teplotu 40 až 45 °C. Fixujte bakteriální buňky na sklíčko buď zahřátím (15 minut při teplotě 60 °C) nad plamenem pomocí 95 % etanolu nebo podle zvláštních pokynů dodavatelů protilátek.

V případě potřeby lze potom fixovaná sklíčka před dalším použitím skladovat zmrazená v suchém boxu po co možná nejkratší dobu (maximálně 3 měsíce).

4.3 Postup IF testu:

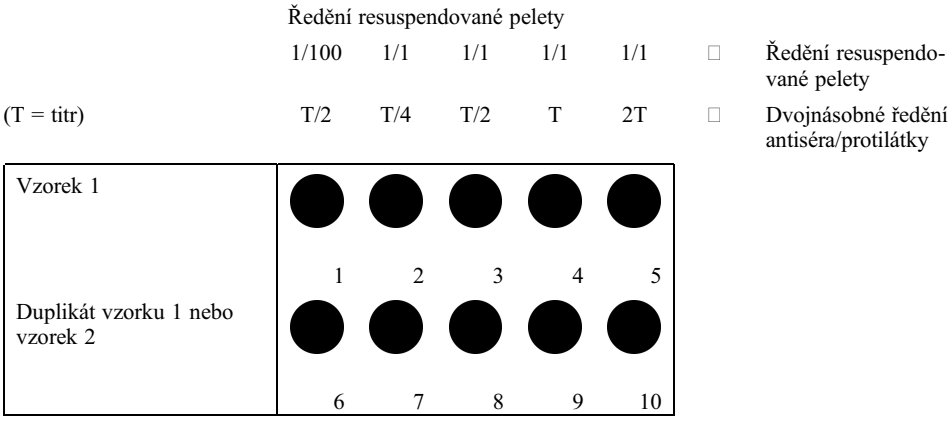
i) Podle přípravy sklíčka na test v oddílu 4.1 písm. i):

Připravte sadu dvojnásobných roztoků protilátky v IF pufru. V první jamce by měl být titr 1/2 (T/2), v ostatních titr 1/4 (T/4), titr 1/2 (T/2), titr (T) a dvojnásobný titr (2T).

ii) Podle přípravy sklíčka na test v oddílu 4.1 písm. ii):

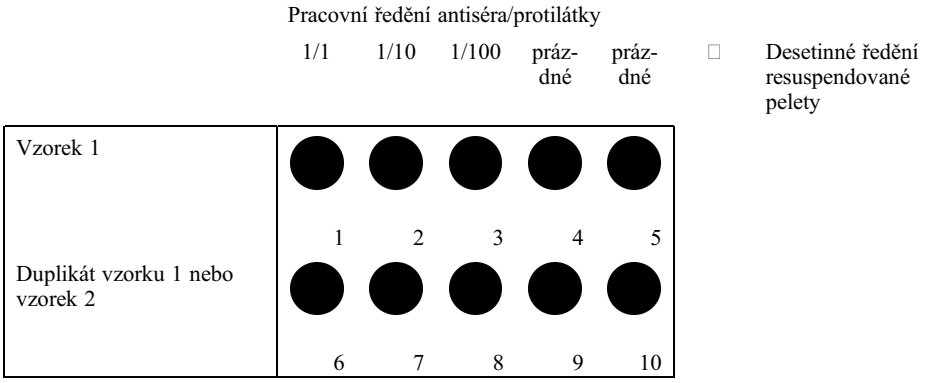
Připravte pracovní ředění (WD) protilátky v IF pufru. Pracovní ředění ovlivňuje přesnost.

Obrázek 1. Příprava sklíčka na test podle oddílu 4.1 písm. i) a oddílu 4.3 písm. i)



▼**M1**

Obrázek 2. Příprava sklíčka na test podle oddílu 4.1 písm. ii) a oddílu 4.3 písm. ii)



4.3.1 Uspořádejte podložní sklíčka na navlhčený papír. Pokryjte každé testovací okénko kompletně ředěním protilátek. Množství protilátky na každém okénku musí být nejméně stejné jako množství použitého extraktu.

Pokud nemáte konkrétní pokyny od dodavatele protilátek, řiďte se následujícím postupem:

4.3.2 Podložní sklíčka inkubujte na vlhkém papíře přikrytá po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

4.3.3 Setřeste kapky ze všech podložních sklíček a pečlivě opláchněte pufrem IF. Umyjte ponořením po dobu 5 minut v pufru IF Tween (dodatek 3) a následně v pufru IF. Zabraňte vzniku aerosolu nebo přenosu kapiček, které by mohly způsobit vzájemnou kontaminaci. Pečlivě odstraňte přebytečnou vlhkost jemným osušením.

4.3.4 Umístěte sklíčka na vlhký papír. Testovací okénka pokryjte ředěním konjugátu FITC, kterým se stanovuje titr. Množství konjugátu naneseného do okének musí být stejné jako množství použité protilátky.

4.3.5 Inkubujte sklíčka zakrytá na vlhkém papíru po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18–25 °C).

4.3.6 Setřeste kapky konjugátu ze sklíčka. Opláchněte a umyjte jako předtím (4.3.3).

Opatrně odstraňte přebytečnou vlhkost.

4.3.7 Napipetujte 5–10 µl 0,1M fosfátového pufru s glycerolem (dodatek 3) nebo komerční krycí tekutiny do každého okénka a přiložte krycí sklíčko.

4.4 Vyhodnocení IF testu:

4.4.1 Prohlížejte testovací sklíčka epifluorescenčním mikroskopem s filtry vhodnými pro excitaci FITC pod olejovou nebo vodní imersí při zvětšení 500x až 1 000x. Zkoumejte okénka ve dvou navzájem kolmých průměrech a kolem obvodu. U vzorků s žádnými nebo malým počtem buněk zkoumejte nejméně 40 polí mikroskopu.

Nejdřív zkontrolujte pozitivní kontrolní vzorek. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela obarvené v určeném titru protilátky nebo pracovnímu ředění. Pokud je barevnost odchylná, musí být test IF opakován (oddíl 4).

4.4.2 Pozorujte jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií *C. m.* subsp. *sepedonicus* v testovacích okéncích sklíčka (viz internetová stránka http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenzita fluorescence musí být při porovnání s pozitivním kontrolním kmenem ve stejném ředění protilátky stejná nebo lepší. Buňky s neúplným zbarvením nebo slabou fluorescencí nelze brát v úvahu.

Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. To se může stát, když všechna sklíčka ve skupině vykazují pozitivní buňky díky kontaminaci pufru nebo při zjištění pozitivních buněk (mimo okénka sklíček) na povrchu sklíček.

▼M1

4.4.3 Existuje několik problémů podstatných pro přesnost imunofluorescenčního testu. V peletách z pupkové části bramboru a částí stonku se mohou vyskytnout doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s velikostí a morfologií podobnou *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

4.4.4 Uvažujte pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií v titru nebo pracovním ředění protilátek podle oddílu 4.3.

4.4.5 Interpretace výsledku IF testu:

i) Při zjištění jasně fluoreskujících buněk s typickou morfologií odhadněte průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopovém poli a vypočítejte počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety (dodatek 4).

Výsledek IF je pozitivní u vzorků, kde je počet typických buněk na 1 ml resuspendované pelety nejméně 5×10^3. Vzorek je považován za potenciálně infikovaný a je povinné další testování.

ii) Výsledek IF testu je negativní pro vzorky, které obsahují méně než 5×10^3 buněk na 1 ml resuspendované pelety a vzorek se považuje za negativní. Další testování není nutné.

5. TEST FISH

Princip

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

Poznámka:

Používejte validované oligosondy specifické pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* (dodatek 7). Úvodní testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění alespoň 10^3–10^4 buněk *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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 nebo –68 až –86 °C.

Jako negativní kontroly používejte alikvotní část extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *C. m.* subsp. *sepedonicus* s negativním výsledkem.

Jako pozitivní kontroly připravte suspenzi obsahující 10^5 až 10^6 buněk *C. m.* subsp. *sepedonicus* na ml (např. kmen NCPPB 4053 nebo PD 406) v 0,01 M fosfátového pufru (PB) z 3–5denní kultury (příprava viz dodatek 2). Připravte samostatná sklíčka s pozitivními kontrolními vzorky homologického kmene nebo jiného referenčního kmene *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspendovaného v bramborovém extraktu podle dodatku 2.

Použití eubakteriálních oligosond značených FITC poskytuje kontrolu procesu hybridizace, protože zbarví všechny eubakterie přítomné ve vzorku.

Proveďte test kontrolního materiálu stejným způsobem jako u vzorku/ů.

5.1 **Fixace bramborového extraktu**

Následující protokol vychází z Wullings a kol. (1998):

5.1.1 Připravte fixační roztok (viz dodatek 7).

5.1.2 Napipetujte 100 µl každého vzorkového extraktu do Eppendorfovy mikrozkumavky a odstřeďujte po dobu 8 minut na 7 000 g.

5.1.3 Odstraňte supernatant a rozpusťte peletu v 500 µl fixačního roztoku připraveného max. 24 hodin předem. Protřepejte a inkubujte přes noc při teplotě 4 °C.

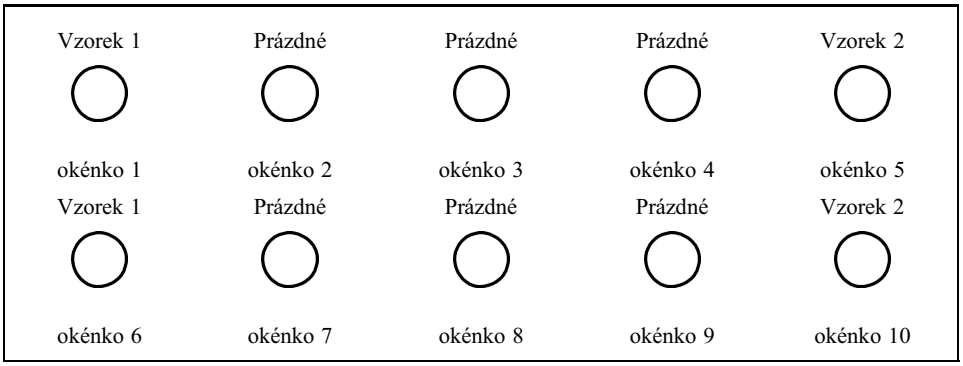
Alternativním fixačním činidlem je 96 % etanol. Pro jeho použití rozpusťte peletu z kroku 5.1.2 v 50 µl 0,01 M PB a 50 µl 96 % etanolu. Promíchejte protřepáním a inkubujte při teplotě 4 °C po dobu 30–60 minut.

5.1.4 Odstřeďujte po dobu 8 minut na 7 000 g, odstraňte supernatant a resuspendujte peletu v 75 µl 0,01 M PB (viz dodatek 3).

▼M1

5.1.5 Kápněte 16 µl fixované suspenze na čisté 10 okénkové sklíčko, jak ukazuje obrázek 3, přičemž použijete 2 různé vzorky na jedno sklíčko, a to neředěný a zředěný 1:100 s použitím 10 µl (v 0,01 M PB). Zbývající roztok vzorku (49 µl) může být uložen při teplotě –20 °C po přidání 1 objemového množství 96 % etanolu. V případě, že je třeba FISH metodu opakovat, odstraňte etanol odstředěním a přidejte stejné množství 0,01 M PB (zamíchejte protřepáním).

Obrázek 3. Rozmístění na sklíčku FISH



5.1.6 Nechte sklíčka uschnout na vzduchu (nebo sušičkou sklíček při teplotě 37 °C) a fixujte nad plamenem.

V této fázi je možné postup přerušit a pokračovat v hybridizaci další den. Sklíčka by měla být skladována chráněna před prachem a v suchu při pokojové teplotě.

5.2 **Předhybridizace a hybridizace**

5.2.1 Připravte roztok lyzozymu obsahující 10 mg lyzozymu (Sigma L-6876) v 10 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Tento roztok lze skladovat, ale měl by se pouze jednou zmrazit a nechat roztát. Každý vzorek dobře pokryjte přibližně 50 µl roztoku lyzozymu a inkubujte po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Potom ponořte sklíčka do demineralizované vody, pouze jednou, a osušte filtračním papírem.

Alternativně přidejte místo lyzozymu 50 µl proteinázy K 40–400 µg. ml^{-1} v pufru (20 mM Tris-HCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 7,4) do každé jamky a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.

5.2.2 Sušte buňky ve stupňovaných sériích 50 %, 80 % a 96 % etanolu pokaždé po dobu 1 minuty. Nechte sklíčka uschnout na vzduchu v držáku sklíček.

5.2.3 Připravte vlhkou inkubační komoru zakrytím dna vzduchotěsné krabice tkaninou nebo filtračním papírem namočeným v 1x hybmixu (dodatek 7). Předinkubujte krabici v hybridizační peci při teplotě 55 ° C po dobu alespoň 10 minut.

5.2.4 Připravte hybridizační roztok (dodatek 7) s 45 µl na 1 sklíčko a předinkubujte po dobu 5 minut při teplotě 55 °C.

5.2.5 Umístěte sklíčka na horkou plotnu při teplotě 45 °C a přidejte do každého ze 4 okének na sklíčku/sklíčcích 10 µl hybridizačního roztoku.

5.2.6 Přikryjte každé sklíčko 2 krycími sklíčky (24 × 24 mm) tak, aby pod ně nevnikl vzduch. Umístěte sklíčka do předehřáté vlhké komory a hybridizujte přes noc v peci při teplotě 55 °C v temnu.

5.2.7 Připravte 3 kádinky obsahující 1 l sterilní vody (Ultra pure water = UPW), 1 l 1x hybmixu (334 ml 3x hybmix a 666 ml UPW) a 1 l 1/2x hybmixu (167 ml 3x hybmix a 833 ml UPW). Předinkubujte každou z nich ve vodní lázni při teplotě 55 °C.

5.2.8 Sejměte krycí sklíčka a umístěte podložní sklíčka do držáku sklíček.

5.2.9 Spláchněte nadbytek vzorku inkubací po dobu 15 minut v kádince s 1x hybmixem při teplotě 55 °C.

5.2.10 Přemístěte držák sklíček do promývacího roztoku 1/2 hybmix a nechte inkubovat dalších 15 minut.

▼M1

5.2.11 Ponořte sklíčka krátce do UPW a položte je na filtrační papír. Odstraňte nadbytečnou vlhkost lehkým zakrytím povrchu filtračním papírem. Napipetujte 5–10 µl krycího roztoku (např. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA nebo podobný) do každé jamky a celé sklíčko zakryjte velkým krycím sklíčkem (24 × 60 mm).

5.3 **Hodnocení FISH testu**

5.3.1 Prohlížejte sklíčka ihned s mikroskopem vhodným pro epifluorescenční mikroskopii se zvětšením 630x nebo 1 000x pod olejovou imerzí. S filtrem vhodným pro fluorescein isothiokyanat (FITC) jsou eubakteriální buňky (včetně většiny gramnegativních buněk) ve vzorku zbarveny fluorescenčně zeleně. Použitím filtru pro tetramethylrhodamin-5-isothiokyanat se buňky *C. m.* subsp. *sepedonicus* obarvené Cy3 jeví fluorescenčně červené. Porovnejte buněčnou morfologii s morfologií pozitivních kontrolních vzorků. Buňky musí být jasně fluoreskující a zcela zbarveny. Test FISH (oddíl 9.4) musí být zopakován, pokud je zbarvení odchylné. Prohlížejte okénka napříč dvěma průměry v pravých úhlech a kolem obvodu. U vzorků, kde nejsou pozorovány žádné nebo málo buněk, pozorujte nejméně 40 polí mikroskopu.

5.3.2 Hledejte jasně fluoreskující buňky s morfologií charakteristickou pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* v okénkách testovacích sklíček (viz internetová stránka http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenzita fluorescence musí odpovídat nebo být lepší než u pozitivního kontrolního kmene. Buňky, které nejsou zcela zbarveny nebo vykazují slabou fluorescenci, neberte v úvahu.

5.3.3 Při podezření z jakékoli kontaminace musí být test zopakován. To se může stát, když všechna sklíčka ve skupině vykazují pozitivní buňky díky kontaminaci pufru nebo při zjištění pozitivních buněk (mimo okénka sklíček) na povrchu sklíček.

5.3.4 Existuje několik problémů podstatných pro přesnost FISH testu. V peletách z pupkové části bramboru a částí stonku se mohou se vyskytnout doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s velikostí a morfologií podobnou *C. m.* subsp. *sepedonicus*, ačkoli mnohem méně často než u IF testu.

5.3.5 V úvahu bereme pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií, viz 5.3.2.

5.3.6 Interpretace výsledku testu FISH:

i) Výsledky FISH testu jsou platné, pokud jsou při použití FITC filtru jasně zeleně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* a při použití rhodaminového filtru jasně červeně fluoreskující buňky pozorovány ve všech pozitivních kontrolách a nejsou pozorovány v žádných negativních kontrolách. Pokud jsou přítomné jasně fluoreskující buňky s typickou morfologií, odhadněte průměrný počet typických buněk v 1 mikroskopovém poli a vypočítejte počet typických buněk v 1 ml resuspendované pelety (dodatek 4). Vzorky, které obsahují alespoň 5×10^3 typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za pravděpodobně infikované Cms. Nutné je další testování. Vzorky, které obsahují méně než 5×10^3 typických buněk na 1 ml resuspendované pelety, se považují za negativní.

ii) Výsledek FISH testu je negativní, pokud při použití rhodaminového filtru nejsou pozorovány jasně červeně fluoreskující buňky s velikostí a morfologií typickou pro *C. m.* subsp. *sepedonicus*, jestliže jsou tyto typické jasně červeně fluoreskující buňky při použití rhodaminového filtru pozorovány v pozitivních kontrolách.

6. PCR TEST

Principy

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

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

▼M1

Poznámka:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění 10^3 až 10^4 buněk *C. m.* subsp. *sepedonicus* na 1 ml přidaných do vzorku extraktů, které byly předtím testovány s negativním výsledkem. Pro dosažení maximální citlivosti a přesnosti ve všech laboratořích můžou být vyžadovány optimalizační pokusy.

Používejte validovaná PCR činidla a protokoly. Dávejte přednost metodě s interní kontrolou.

Používejte vhodná bezpečnostní opatření, abyste zabránili kontaminaci vzorku cílovou DNA. PCR test by měli provádět zkušení laboranti v laboratořích specializovaných na molekulární biologii, aby se minimalizovala možnost kontaminace cílovou DNA.

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

PRC test by měl zahrnovat následující negativní kontroly:

— extraktu ze vzorku, který byl předtím testován na *C. m.* subsp. *sepedonicus* s negativním výsledkem,

— kontroly pufru používaného pro extrakci bakterie a DNA ze vzorku,

— reakční směs PCR.

Měly by být zahrnuty následující pozitivní kontroly:

— alikvotní části resuspendovaných pelet, k nimž byl přidán *C. m.* subsp. *sepedonicus* (příprava viz dodatek 2),

— suspenze 10^6 buněk na 1 ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* ve vodě z virulentního izolátu (např. NCPPB 2140 nebo NCPPB 4053),

— pokud možno používejte při provádění PCR testu také DNA extrahovanou z pozitivních kontrolních vzorků.

Abyste zabránili možné kontaminaci, připravte pozitivní kontroly v odděleném prostředí než vzorky, 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 **Metody purifikace DNA**

Používejte výše popsané pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

Připravte kontrolní materiál stejným způsobem jako vzorek (vzorky).

K purifikaci cílové DNA z komplexních substrátů vzorků jsou k dispozici různé metody odstraňující inhibitory PCR dispozici a jiných enzymatických reakcí a koncentrující cílovou DNA v extraktu vzorku.

Následující metoda byla optimalizována pro použití s validovanou metodou PCR, uvedenou v dodatku 6.

6.1a) Metoda podle Pastrika (2000)

1. Napipetujte 220 µl lýzového pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do mikrozkumavky o objemu 1,5 ml.
2. Přidejte 100 µl vzorkového extrakt ze vzorku a umístěte do termobloku nebo vodní lázně o teplotě 95 °C na dobu 10 minut.
3. Vložte mikrozkumavku na 5 min. do ledu.
4. Přidejte 80 µl zásobního roztoku lyzozymu (50 mg lyzozymu na 1 ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) a inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 30 minut.
5. Přidejte 220 µl Easy DNA® roztok A (Invitrogen), dobře promíchejte třepáním a inkubujte při teplotě 65 °C po dobu 30 minut.
6. Přidejte 100 µl Easy DNA® roztok B (Invitrogen), silně míchejte třepáním, až usazenina sama poteče do mikrozkumavky a vzorek začne být stejnoměrně viskózní.
7. Přidejte 500 µl chloroformu a míchejte třepáním, až se viskozita sníží a směs se stane homogenní.
8. Odstřeďujte na 15 000 g po dobu 20 minut při 4 °C pro oddělení fází a vytvoření mezifáze.
9. Přeneste horní fázi do čisté mikrozkumavky.

▼M1

10. Přidejte 1 ml 100 % etanolu (–20 °C), krátce promíchejte třepáním a inkubujte na ledu po dobu 10 minut.
11. Odstřeďujte na 15 000 g po dobu 20 minut při 4 °C a odstraňte z pelety etanol.
12. Přidejte 500 µl 80 % etanolu (–20 °C) a promíchejte převracením mikrozkumavky.
13. Odstřeďujte na 15 000 g po dobu 10 minut při 4 °C, peletu zachovejte a odstraňte etanol.
14. Nechte peletu uschnout na vzduchu nebo v DNA speed vac.
15. Resuspendujte peletu v 100 µl sterilní vody (UPW) a nechte stát nejméně 20 minut při pokojové teplotě.
16. Skladujte při teplotě –20 °C až do upotřebení při PCR.
17. Jakoukoli bílou usazeninu odstraňte odstředěním a pro PCR použijte 5 µl supernatantu obsahujícího DNA.

6.1b) Jiné metody

Jiné metody extrakce DNA (např. Qiagen DNeasy Plant Kit) by se mohly použít, pokud by se prokázalo, že jsou při purifikaci DNA z kontrolních vzorků obsahujících 10^3 až 10^4 patogenních buněk na 1 ml stejně efektivní.

6.2 **PCR**

6.2.1 Připravte testované vzorky a kontroly pro PCR podle validovaného protokolu (dodatek 6). Připravte jeden desetinný roztok vzorku DNA (1:10 ve sterilní vodě).

6.2.2 Připravte příslušnou reakční směs pro PCR v prostředí, kde nehrozí kontaminace, podle zveřejněného protokolu (dodatek 6). Validovaný protokol PCR je multiplexová reakce, která zahrnuje také interní kontrolu PCR.

6.2.3 Přidejte do sterilních PCR mikrozkumavek 5 µl extraktu DNA na 25 µl PCR reakce.

6.2.4 Zahrňte negativní kontrolní vzorek obsahující pouze reakční směs PCR a přidejte stejnou sterilní vodu UPW, která byla použita do směsi PCR namísto vzorku.

6.2.5 Umístěte PCR mikrozkumavky do stejného termocykleru, který byl použit při počátečním testování, a proveďte vhodně optimalizovaný program PCR (dodatek 6).

6.3 **Analýza produktu PCR**

6.3.1 Rozdělte amplikony PCR elektroforézou v agarózovém gelu. Naneste nejméně 12 µl amplifikované reakční směsi DNA z každého vzorku smíchané s 3 µl nanášecího pufru (dodatek 6) do 2,0 % (w/v) agarózového gelu v Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru (dodatek 6) při 5–8 V na cm. Používejte vhodný marker DNA, např. 100 bp ladder.

6.3.2 Detekujte proužky DNA barvením v ethidium bromidu (0,5 mg na l) po dobu 30–45 minut, za použití vhodných bezpečnostních opatření pro zacházení s tímto mutagenem.

6.3.3 V obarveném a UV (krátké vlnové délky, např. 302 nm) prosvíceném gelu hledejte amplifikované produkty PCR o očekávané velikosti a výsledek zdokumentujte.

6.3.4 U všech nových nálezů/případů zkontrolujte pravost amplikonu PCR provedením restrikční enzymové analýzy ve zbývajícím vzorku amplifikované DNA inkubací při optimální teplotě a době s vhodným restrikčním enzymem a pufrem (viz dodatek 6). Rozdělte naštěpené fragmenty elektroforézou vagarózovém gelu a pozorujte charakteristický vzor restrikčního fragmentu pod UV prosvícením po obarvení ethidiumbromidem a porovnejte s neštěpenou a štěpenou pozitivní kontrolou.

Interpretace výsledku PCR testu:

PCR test je negativní, pokud amplikon typický pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* očekávané velikosti nebyl zjištěn v daném vzorku, ale byl zjištěn ve všech pozitivních kontrolních vzorcích (v případě vícenásobné PCR s rostlinnými interními kontrolními primery: druhý produkt PCR očekávané velikosti musí být amplifikován s daným vzorkem).

▼M1

PCR test je pozitivní, pokud byl zjištěn amplikon typický pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* očekávané velikosti a vzoru (pokud se požaduje), za předpokladu, že nebyl amplifikován žádným z negativních kontrolních vzorků. Spolehlivého potvrzení pozitivního výsledku lze dosáhnout také opakováním testu s druhou sadou PCR primerů (oddíl 9.3).

Poznámka:

Lze mít podezření na inhibici PCR, pokud byl očekávaný amplikon získán z pozitivního kontrolního vzorku obsahujícího *C. m.* subsp. *sepedonicus* ve vodě, ale z pozitivní kontroly s *C. m.* subsp. *sepedonicus* v bramborovém extraktu byly negativní. Ve vícenásobných protokolech PCR s interními kontrolami PCR k inhibici reakce došlo, pokud nebyl získán žádný z obou amplikonů.

Lze mít podezření na kontaminaci, pokud byl očekávaný amplikon získán z jedné nebo více negativních zkoušek.

7. BIOTEST

Poznámka:

Předběžné testování touto metodou by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění 10^3 až 10^4 jednotek *C. m.* subsp. *sepedonicus* tvořících kolonie na 1 ml přidaný k extraktům ze vzorku, které původně byly testovány s negativním výsledkem (příprava viz dodatek 2).

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

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

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

Podrobnosti o pěstování viz dodatek 8.

7.1 Rozdělte celý zbytek testované resuspendované pelety z oddílu 3.1.6 nebo 3.2.5 mezi rostliny lilku jednou z níže uvedených metod (7.3 nebo 7.4). Používejte pouze rostliny ve fázi 2–3 listů do úplného rozvinutí třetího pravého listu. Abyste zajistili úplné využití resuspendované pelety i efektivní inokulaci, bude pro níže popsané postupy potřeba 15–25 lilků na vzorek.

7.2 Před inokulací 1 až 2 dny nezalévejte, aby se snížilo vnitřní napětí buněk.

7.3 Inokulace zářezem

7.3.1 Držte rostlinu mezi dvěma prsty a pipetou přeneste na stonek mezi děložními lístky a prvním pravým listem kapku (přibližně 5–10 µl) suspendované pelety.

7.3.2 Pomocí sterilního skalpelu proveďte šikmý zářez dlouhý asi 1,0 cm a hluboký přibližně jako 2/3 průměru stonku, řez začněte od peletové kapky.

7.3.3 Zakryjte zářez sterilní vazelínou z injekční stříkačky.

7.4 Inokulace injekční stříkačkou

Stonky lilku inokulujte těsně nad děložními lístky pomocí injekční stříkačky s podkožní jehlou (ne méně než 23 G). Vzorek rozdělte mezi rostliny lilku.

7.5 Jako pozitivní kontroly inokulujte 5 rostlin vodní suspenzí 10^5 až 10^6 buněk na 1 ml známé kultury *C. m.* subsp. *sepedonicus* a pokud možno s i pletivem z přirozeně infikovaných hlíz bramboru (viz oddíl 4) stejnou inokulační metodou (7.3 nebo 7.4).

7.6 Jako negativní kontrolu inokulujte 5 rostlin sterilním peletovým pufrem stejnou inokulační metodou (7.3 nebo 7.4).

7.7 Inkubujte rostliny v karanténě po dobu až 4 týdnů při teplotě 18–24 °C. Inkubujte rostliny za dostatečného osvětlení a vysoké vlhkosti (70–80 %) a zalévejte je tak, aby nedošlo k nasávání vody nebo vadnutí kvůli nedostatku vody. Buňky *C. m.* subsp. *sepedonicus* odumírají při teplotách nad 30 °C a optimální teplota je 21 °C. Abyste zamezili kontaminaci, inkubujte rostliny pro pozitivní kontroly a negativní kontroly ve skleníku nebo růstové komoře na jasně oddělených poli-

▼M1

cích, anebo při nedostatku místa zajistěte přísné oddělení mezi zacházením s nimi. Pokud musí být rostliny pro různé vzorky inkubovány blízko sebe, oddělte je vhodnými přepážkami. Při hnojení, zalévání, kontrole a jiné manipulaci věnujte maximální pozornost tomu, aby nedošlo ke kontaminaci. Je nezbytné, aby skleníky i růstové komory byly chráněny před veškerým hmyzem, protože by mohl přenášet bakterie z jednoho vzorku na druhý.

7.8 Pravidelně počínaje 8. dnem prověřujte přítomnost příznaků. Počítejte rostliny vykazující příznaky. *C. m.* subsp. *sepedonicus* působí u lilku vejcoplodého vadnutí listů, které může začít jako okrajová nebo mezižilková ochablost. Zvadlé pletivo může zprvu být tmavozelené nebo strakaté, ale než znekrotizuje, zesvětlí. Povadlá místa mezi žilnatinou mívají často mastně vodnatý vzhled. Nekrotická pletiva mívají často jasně žlutý okraj. Rostliny vždy neodumírají; čím déle trvá období do vyvinutí příznaků, tím větší je naděje na přežití. Rostliny mohou infekci odrůst. Mladé rostliny lilku vejcoplodého jsou vnímavější k nízkým koncentracím *C. m.* subsp. *sepedonicus* než starší rostliny, proto je nezbytné používat rostliny ve fázi tří listů a nebo krátce před ní.

Vadnutí mohou také způsobovat populace jiných bakterií nebo hub přítomných v peletě z pletiv hlízy. Patří k nim *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata*, jakož i populace saprofytických bakterií. Zejména *Erwinia chrysanthemi* může způsobit příznaky na listech a vadnutí velmi podobné příznakům *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Jediným rozdílem je zčernání stonků v případě infekcí *Erwinia chrysanthemi*. Jiné případy vadnutí lze odlišit od případů způsobených *C. m.* subsp. *sepedonicus*, jelikož rychle vadnou celé listy nebo celé rostliny. Můžete také připravit Gramovo barvení: tento test rozliší *C. m.* subsp. *sepedonicus* od *Erwinia* spp.

7.9 Jakmile se na lilku vejcoplodém objeví příznaky, mělo by dojít k izolaci za použití částí pletiva zvadlých listů nebo stonků rostlin (macerace pletiv viz 3.1.3). Povrch listů a stonků lilku vejcoplodého dezinfikujte otřením 70 % etanolem. Proveďte test IF nebo PCR na šťávě z lilku a izolujte na vhodná (selektivní) média (viz oddíl 8). Můžete také připravit Gramovo barvení (dodatek 9). Identifikujte čisté kultury podezřelé z přítomnosti *C. m.* subsp. *sepedonicus* a potvrďte patogenitu (viz oddíl 9 a 10).

7.10 Za určitých okolností, zejména pokud nejsou růstové podmínky optimální, se může stát, že *C. m.* subsp. *sepedonicus* zůstává v rostlinách lilku vejcoplodého jako latentní infekce dokonce i po uplynutí inkubační doby až 4 týdnů. Pokud nejsou po 4 týdnech pozorovány žádné příznaky, proveďte test IF/PCR na složeném vzorku částí stonků o délce 1 cm z každé testované rostliny odebraných nad místem inokulace. Pokud je test pozitivní, měla by být provedena izolace na vhodná (selektivní) média postupem podle oddílu 8. Identifikujte čisté kultury podezřelé z přítomnosti *C. m.* subsp. *sepedonicus* a potvrďte patogenitu (viz oddíl 9 a 10).

Interpretace výsledku biotestu:

Platných výsledků biotestu je dosaženo, jestliže rostliny pozitivní kontroly vykazují typické příznaky, z těchto rostlin lze izolovat bakterie a u negativních kontrol nejsou příznaky zjištěny.

Biotest je negativní, jestliže testované rostliny nejsou infikovány *C. m.* subsp. *sepedonicus*, a za předpokladu, že *C. m.* subsp. *sepedonicus* je zjištěn u pozitivních kontrol.

Biotest je pozitivní, jestliže jsou testované rostliny infikovány *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

8. IZOLACE *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Poznámka:

Diagnóza je ukončena pouze v případě, že je *C. m.* subsp. *sepedonicus* izolována, následně identifikována (viz oddíl 9) a potvrzena zkouškou patogenity (oddíl 10). Ačkoliv je *C. m.*. subsp. *sepedonicus* náročný organizmus, je možno ji izolovat z pletiv vykazujících příznaky napadení.

Mohou ji však přerůst rychle rostoucí saprofytické bakterie, a proto je izolace přímo z pelety pletiva hlízy nebo stonku (oddíl 3.1.6 nebo 3.2.5) náročná. Přímá izolace *C. m.* subsp. *sepedonicus* může být možná za použití selektivního média a vhodného ředění resuspendované pelety z pupkové části hlízy nebo ze stonků rostliny.

▼M1

Izolace se provádí ze všech hlíz bramboru nebo částí stonků a z rostlin lilku vejcoplodého, které nevykazují příznaky napadení, ale u nichž byl pozitivní výsledek v testu IF/PCR složených vzorků (viz oddíl 7.10). Pokud je třeba provést maceraci stonků lilku, měla by být provedena podle oddílu 3.1.3.

Jako pozitivní kontroly připravte desetinná ředění suspenze 10^6 cfu na ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* (např. NCPPB 4053 nebo PD 406). Abyste vyloučili nebezpečí kontaminace, připravujte pozitivní kontroly naprosto odděleně od vzorků, které mají být testovány.

Pro každou nově připravenou dávku selektivního média by se měla před použitím k testování obvyklých vzorků přezkoušet jeho vhodnost pro růst patogenu.

Testujte kontrolní materiál stejným způsobem jako vzorek/vzorky.

8.1 **Selektivní roztěr na médium**

8.1.1 Ze 100 µl alikvotní části ze vzorku resuspendované bramborové pelety nebo šťávy z lilku vejcoplodého připravte desetinásobné ředění v peletovém pufru (dodatek 3).

8.1.2 Izolace z neředěné bramborové pelety se obvykle nepodaří kvůli náročným růstovým podmínkám Cms a konkurenci saprofytů. Vzhledem k tomu, že bakterie je obvykle v infikovaných pletivech přítomná ve vysokých koncentracích, lze saprofyty obvykle vyplách-nout ředěním, zatímco patogen zůstává. Proto se doporučuje rozetřít 100 µl z každého vzorku, v ředění 1/100 až 1/10 000 na MTNA médium nebo NCP-88 médium (dodatek 5) (pokud používáte Petriho misky o průměru 90 mm – pro jiné velikosti misky objem přizpů-sobte), za použití pomůcek určených k roztěrům (hokejek) a techniky roztěrů.

Poznámka:

Alternativním postupem je rozetření počátečních 100 µl alikvotní části bramborové pelety na první misku s agarem vhodným nástrojem a následné použití téhož nástroje na druhou misku s agarem, tento postup na závěr zopakujte s třetí miskou, a tím dosáhnete efektu zředění.

8.1.3 Inkubujte desky v temnu při teplotě 21–23 °C.

8.1.4 Počáteční kontrola misek zahrnuje porovnání s kontrolními miskami a počítání všech kolonií podobných *C. m.* subsp. *sepedonicus* se provádějí po třech dnech, s dalším počítáním po 5, 7 a nakonec 10 dnech.

8.2 **Čištění podezřelých kolonií**

Poznámka:

Subkultury kolonií podobných *C. m.* subsp. *sepedonicus* pro inokulaci lilku vejcoplodého a/nebo následnou identifikaci by se měly pěstovat na YGM médiu; inokulace a identifikace by se měly provést dříve, než jsou média příliš přerostlá, tj. nejlépe po 3–5 dnech.

8.2.1 Rozetřete kolonie podobné *C. m.* subsp. *sepedonicus* na jedno z následujících médií: (složení uvedena v dodatku 5):

živný dextrózový agar (pouze pro subkultury),

agar z kvasničné peptonové glukózy,

agar z kvasničného extraktu s minerálními solemi.

Inkubujte při teplotě 21 °C–24 °C po dobu maximálně 10 dní.

C. m. subsp. *sepedonicus* roste pomalu, obvykle tvoří krémově zabar-vené klenuté kolonie velikosti špendlíkové hlavičky během 10 dní. (Fotografie typických kolonií *C. m.* subsp. *sepedonicus* viz internetová stránka http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2 Znovu rozetřete pro zaručení čistoty.

U subkultur se rychlost růstu zlepšuje. Typické kolonie jsou smeta-nově bílé nebo barvy slonoviny, někdy žluté, okrouhlé, hladké, vyvý-šené, konvexně vyklenuté, slizovitě tekuté, s rovnými okraji a obvykle mají v průměru 1–3 mm.

Jednoduché Gramovo barvení (dodatek 9) může pomoci vybrat kolonie pro další testování.

8.2.3 Identifikujte podezřelé kultury (viz oddíl 9) a proveďte zkoušku pato-genity (viz oddíl 10).

▼M1

9. IDENTIFIKACE

Identifikujte čisté kultury pravděpodobné izolované kultury *C. m.* subsp. *sepedonicus* za použití nejméně dvou následujících testů založených na různých biologických principech.

V případě potřeby zahrňte pro každý provedený test známý referenční kmen.

9.1 **Nutriční a enzymatické identifikační testy**

Zjistěte následující fenotypické vlastnosti, které jsou obecně přítomné nebo nepřítomné v *C. m.* subsp. *sepedonicus* podle metod Lelliotta a Steada (1987), Klementa a kol. (1990), Schaada (2001), Anonym (1987).

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

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

Testy	*Očekávaný výsledek*
Oxidačně-fermentační (O/F) testy	Inertní nebo slabě oxidační
Aktivita oxidázy	–
Růst při 37 °C	–
Aktivita ureázy	–
Hydrolýza eskulinu	+
Hydrolýza škrobu	– nebo slabá
Tolerance 7 % NaCl	–
Tvorba indolu	–
Aktivita katalázy	+
Tvorba H_2S	–
Využití citrátu	–
Zkapalnění želatiny	–
Kyselý glycerol	–
Kyselina z laktózy	– nebo slabý
Kyselina z rhamnózy	–
Kyselina ze salicínu	–
Gramovo barvení (dodatek 9)	+

9.2 **IF test**

a) Připravte suspenzi přibližně 10^6 buněk/ml v pufru na IF (dodatek 3).

b) Připravte série dvojnásobného ředění vhodného antiséra.

c) Proveďte IF postup (oddíl 4).

d) Pozitivního výsledku IF testu je dosaženo, jestliže IF titr kultury odpovídá titru pozitivní kontroly.

9.3 **PCR test**

a) Připravte suspenzi přibližně 10^6 buněk na ml ve sterilní vodě (Ultra pure water = UPW).

b) Zahřívejte 100 µl suspenze buněk v uzavřených mikrozkumavkách v ohřívacím bloku nebo vřící vodní lázni při teplotě 100 °C po dobu 4 minut. V případě potřeby můžete lýzu buněk podpořit přidáním čerstvě připraveného NaOH do konečné koncentrace 0,05 M. Vzorky lze potom uložit při teplotě –16 až –24 °C až do použití.

c) Pro amplifikaci *C. m.* subsp. *sepedonicus specific amplicons* použijte vhodné postupy PCR (např. Pastrik, 2000; viz dodatek 4; Li a de Boer, 1995; Mills a kol., 1997; Pastrik a Rainey, 1999; Schaad a kol., 1999).

d) Identifikace *C. m.* subsp. *sepedonicus* je pozitivní, pokud jsou amplikony PCR stejné velikosti a mají stejnou mnohotvárnost délky fragmentu jako pozitivní kontrolní kmen.

▼M1

9.4 **FISH test**

a) Připravte suspenzi přibližně 10^6 buněk na ml v UPW.

b) Proveďte postup FISH (oddíl 5).

c) Test FISH je pozitivní, jsou-li dosaženy stejné reakce kultury a pozitivní kontroly.

9.5 **Analýza mastných kyselin (FAP)**

a) Pěstujte kulturu na tryptikázo-sójovém agaru (Oxoid) po dobu 72 hodin při teplotě 21 °C (+/– 1°).

b) Použijte vhodný postup FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Test FAP je pozitivní, pokud je profil podezřelé kultury identický s profilem pozitivní kontroly. Přítomnost charakteristických mastných kyselin 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 a 17:0 Anteiso jasně svědčí o přítomnosti *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Jiné rody jako *Curtobacterium, Arthrobacter* a *Micrococcus* také obsahují některé z těchto kyselin, ale 15:1 Anteiso A je pro tyto bakterie neobvyklá kyselina, která se však vyskytuje ve všech *Clavibacter* spp. v rozmezí 1–5 %. U *C. m.* subsp. *sepedonicus* se hodnota obvykle pohybuje kolem 5 %.

9.6 **BOX-PCR**

a) Připravte suspenzi přibližně 10^6 buněk na ml v UPW.

b) Proveďte test postupem podle (Smith a kol., 2001).

10. KONFIRMAČNÍ TEST (TEST PATOGENITY)

Pro konečné potvrzení diagnózy *C. m.* subsp. *sepedonicus* a pro stanovení virulence kultur identifikovaných jako *C. m.* subsp. *sepedonicus* musí být provedena zkouška patogenity.

10.1 Připravte inokulum přibližně 10^6 buněk na ml z 3-denních kultur testované izolované látky a vhodného pozitivního kontrolního kmene *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.2 Naočkujte 5–10 stonků mladých semenáčků lilku vejcoplodého ve fázi 3 pravých listů (oddíl 7.3 nebo 7.4).

10.3 Inkubujte při teplotě 18–24 °C při dostatečném světle a vysoké relativní vlhkosti s přiměřeným zaléváním, aby nedošlo k přemokření nebo vyschnutí (oddíl 7.7). U čistých kultur by mělo během 2 týdnů nastat typické vadnutí, avšak rostliny, které po uplynutí této doby nevykazují žádné příznaky infekce (viz oddíl 7.8), by se měly inkubovat až 3 týdny při teplotách příznivých pro růst lilku vejcoplodého, ale nepřesahujících 25 °C (dodatek 8). Jestliže se po 3 týdnech příznaky infekce nevyskytují, nemůže být kultura považována za patogenní formu *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4 Izolujte z rostlin s příznaky infekce odstraněním části stonku 2 cm nad místem inokulace. Rozdrťte a suspendujte v malém množství sterilní destilované vody nebo 50 mM fostátového pufru (dodatek 3). Izolujte ze suspenze rozetřením nebo nanesením na MTNA a YPGA (dodatek 5), inkubujte po dobu 3–5 dní při teplotě 21–23 °C a sledujte vznik kolonií typických pro *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼M1

Dodatek 1

Laboratoře podílející se na optimalizaci a validaci protokolů

Laboratoř [1]	Místo	Země
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Vídeň a Linec	Rakousko
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgie
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglie
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francie
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francie
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Německo
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Německo
State Laboratory	Dublin	Irsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nizozemsko
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norsko
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovinsko
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Španělsko

[1] Kontaktní osoby: viz internetová stránka http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Dodatek 2

Příprava pozitivních a negativních kontrol pro vyšetření výkrojků testy PCR/IF a FISH

Vypěstujte 72-hodinovou kulturu virulentního kmene *C. m.* subsp. *sepedonicus* [NCPPB 4053 nebo PD 406] na základním médiu MTNA a suspendujte v 10 mM fostátového pufru, abyste získali hustotu buněk přibližně 1 až 2×10^8 cfu/ml. Toho obvykle dosáhnete prostřednictvím slabě zakalené suspenze odpovídající optické hustotě 0,20 až 600 nm.

Odstraňte pupkové výkrojky 200 hlíz odebraných z produkce odrůdy s bílou slupkou, o které je jisté, že není napadena *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Zpracujte pupkové výkrojky jako obvykle a resuspendujte peletu v 10 ml.

Připravte 10 sterilních mikrozkumavek o objemu 1,5 ml s 900 µl resuspendované pelety.

Přeneste 100 µl suspenze *C. m.* subsp. *sepedonicus* do první mikrozkumavky. Nechte protřepat.

Vytvořte desetinná ředění v následujících pěti mikrozkumavkách.

Šest kontaminovaných mikrozkumavek se použije jako pozitivní kontrola. Čtyři nekontaminované mikrozkumavky se použijí jako negativní kontroly. Mikrozkumavky proto opatřete štítkem.

Připravte alikvotní části z 100 µl ve sterilních mikrozkumavkách o objemu 1,5 ml, čímž získáte 9 kopií každého kontrolního vzorku. Skladujte při teplotě –16 až –24 °C až do doby použití.

Přítomnost a množství *C. m.* subsp. *sepedonicus* v kontrolních vzorcích by měla být nejprve potvrzena prostřednictvím imunofluorescence.

Pro PCR test proveďte extrakci DNA z pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Pro IF a FISH testy proveďte kvantitativní rozbory pozitivních a negativních kontrolních vzorků pro každou sérii zkušebních vzorků.

Při kvantitativních rozborech IF, FISH a PCR musí být *C. m.* subsp. *sepedonicus* zjištěn v nejméně 10^6 a 10^4 buněk/ml pozitivních kontrol a nesmí být zjištěn v žádné z negativních kontrol.

▼M1

Dodatek 3

Pufry pro testovací postupy

OBECNÉ: Neotevřené sterilizované pufry lze skladovat po dobu až jednoho roku.

1. **Pufry pro extrakci**

1.1 *Extrakční pufr (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0)*

Tento pufr se používá k extrakci bakterie z rostlinných tkání homogenizací nebo protřepáním.

Na_2HPO_4 (bezvodý)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, zkontrolujte pH a sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Užitečné mohou být následující složky:

	Účel	Množství (na litr)
Lubrolové vločky	Protisrážlivý prostředek (*)	0,5 g
DC silikonový odpěňovač	Odpěňovací činidlo (*)	1,0 ml
Tetrasodiumpyrofosfát	Antioxidační činidlo	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP-40)	Vázání inhibitorů PCR	50 g

(*) Pro použití při extrakci homogenizací.

1.2 *Peletový pufr (10 mM fosfátový pufr, pH 7,2)*

Tento pufr se používá pro resuspenzi a ředění extraktů z výkrojků z pupkových částí bramborových hlíz poté, co byly odstřeďováním koncentrovány do pelety.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, zkontrolujte pH a sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

2. **Pufry pro IF test**

2.1 *Pufry pro IF (10 mM fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS), pH 7,2)*

Tento pufr se používá k ředění protilátek.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, zkontrolujte pH a sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

2.2 *IF-pufr-Tween*

Tento pufr se používá k mytí sklíček.

Přidejte 0,1 % Tween 20 k pufru pro IF.

2.3 *Fostátový pufr v glycerolu, pH 7,6*

Tento pufr se používá jako krycí roztok na okénka sklíček na IF testy k zvýšení fluorescence.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destilovaná voda	100 ml

▼**M1**

Krycí roztoky jsou komerčně dostupné, např. Vectashield® (Vector Laboratories) nebo Citifluor® (Leica).

▼M1

Dodatek 4

Stanovení koncentrace IF a FISH pozitivních buněk

1. Vypočítejte průměrný počet typických fluoreskujících buněk v jednom pozorovacím poli (c).
2. Vypočítejte počet typických fluoreskujících buněk v okénku mikroskopického sklíčka (C).

   $C = c \times S/s$

   Kde S = plocha jednoho pole na sklíčku s více jamkami a

   s = plocha pole objektivu

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ kde i = koeficient pole (v rozmezí od 8–24 podle typu okuláru)

   K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25)

   G = zvětšení objektivu (100x, 40x atd.)

3. Vypočítejte počet charakteristických fluoreskujících buněk na 1 ml resuspendované pelety (N).

   $N = C \times 1\,000/y \times F$

   kde y = objem resuspendované pelety v každém okénku a

   F = zřeďovací faktor resuspendované pelety.

▼M1

Dodatek 5

Média pro izolaci a kultivaci C. m. subsp. sepedonicus

a) *Obecná růstová média*

Živný agar (Nutrient Agar = NA)

Živný agar (Difco)	23,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky a sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Živný dextrózový agar (Nutrient dextrose agar = NDA)

Difco bakto živný agar obsahující 1 % D(+) glukózy (monohydrátu). Sterilizujte v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Kvasnično-pepton-glukózový agar (Yeast peptone glucose agar = YPGA)

Kvasnicový extrakt (Difco)	5,0 g
Baktopepton (Difco)	5,0 g
D(+)glukóza (monohydrát)	10,0 g
Baktoagar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky a sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Médium s kvasnicovým extraktem a minerálními solemi (Yeast extract mineral salts medium = YGM)

Kvasničný extrakt (Difco)	2,0 g
D(+)glukóza (monohydrát)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Baktoagar (Difco)	18 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky a sterilizujte 0,5 litru média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

b) *Validovaná selektivní růstová média*

Médium MTNA

Pokud není uvedeno jinak, pocházejí všechny složky médií z BDH.

Kvasnicový extrakt (Difco)	2,0 g
Manit	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4. H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid č. 1)	16,0 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, upravte pH na 7,2. Po autoklávování (při 121 °C po dobu 15 minut) a ochlazení na 50 °C přidejte antibiotika: trimethoprim 0,06 g, nalidixic acid 0,002 g, amphotericin B 0,01 g.

▼**M1**

Mějte v zásobě roztoky antibiotik: trimethoprim (Sigma) a nalidixic acid (Sigma) (obě 5 mg/ml) v 96 % methanolu, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) v dimethyl sulfoxide. Zásobní roztoky jsou sterilizované filtrací.

Poznámka:

Trvanlivost základního média je 3 měsíce. Po přidání antibiotik je trvanlivost 1 měsíc při skladování v chladu.

Médium NCP-88

Živný agar (Difco)	23 g
Kvasničný extrakt (Difco)	2 g
D-manit	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, upravte pH na 7,2. Po autoklávování a ochlazení na 50 °C přidejte následující antibiotika: Polymyxin B sulphate (Sigma) 0,003 g, nalidixic acid (Sigma) 0,008 g, Cycloheximide (Sigma) 0,2 g.

Antibiotika rozpusťte v zásobních roztocích následovně: nalidixic acid v 0,01 M NaOH, cykloheximid v 50 % ethanolu, polymixin B sulfát v destilované vodě. Zásobní roztoky jsou sterilizované filtrací.

Poznámka:

Trvanlivost základního média je 3 měsíce. Po přidání antibiotik je trvanlivost 1 měsíc při skladování v chladu.

▼M1

Dodatek 6

Validované protokoly a činidla pro PCR

Poznámka:

Úvodní testování by mělo umožnit reprodukovatelné zjištění nejméně 10^3 až 10^4 buněk *C. m.* subsp. *sepedonicus na 1 ml vzorkového extraktu*.

Úvodní testování by také nemělo vykazovat žádné falešné pozitivní výsledky se skupinou vybraných kmenů bakterií.

1. **Vícenásobný PCR protokol s interní PCR kontrolou (Pastrik, 2000)**

1.1 *Oligonukleotidní primery*

Primer PSA-1	5′- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3′
Primer PSA -R	5′- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3′
Primer NS-7-F	5′- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3′
Primer NS-8-R	5′- tcc gca ggt tca cct acg ga -3′

Předpokládaná velikost amplikonu z DNA *C. m.* subsp. *sepedonicus* šablony = 502 bp (sada PSA-primerů).

Předpokládaná velikost amplikonu z interní PCR kontroly 18S rRNA = 377 bp (sada NS- primerů).

1.2 *Reakční směs PCR*

Činidlo	Množství na reakci	Konečná koncentrace
Sterilní voda (UPW)	15,725 µl	
10x PCR pufr (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakce V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Směs d-nTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymeráza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Vzorkové množství	5,0 µl	
Celkový objem	25,0 µl	

(1) Metody byly validovány za použití Taq polymerázy Perkin Elmer (AmpliTaq nebo Gold) a Gibco BRL.
(2) Koncentrace primerů NS-7 F a NS-8-R byla optimalizována pro extrakci pupkové části bramboru za použití homogenizační metody a purifikace DNA podle Pastrika (2000) (viz oddíl 6.1 písm. a) a 6.2). Při použití extrakce třepáním nebo jinými metodami izolace DNA bude nutná nová optimalizace koncentrací činidla.

1.3 *Reakční podmínky pro PCR*

Postupujte podle následujícího programu:

1 cyklus:	i)	3 minuty při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
10 cyklů:	ii)	1 minuta při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
	iii)	1 minuta při teplotě 64 °C (připojení primerů)
	iv)	1 minuta při teplotě 72 °C (prodlužování kopie)
25 cyklů:	v)	30 sekund při teplotě 95 °C (denaturace DNA matrice)
	vi)	30 sekund při teplotě 62 °C (připojení primerů)
	vii)	1 minuta při teplotě 72 °C (prodlužování kopie)
1 cyklus:	viii)	5 minut při teplotě 72 °C (závěrečná prodlužování)

▼**M1**

ix) udržujte při teplotě 4 °C.

Poznámka:

Tento program je optimalizován pro použití s tepelným cyklerem MJ Research PTC 200. Při použití jiných modelů bude možná nutná modifikace kroků cyklů ii), iii) iv), v), vi) a vii).

1.4 *Analýzy ampliconu restriktivním enzymem*

Produkty PCR amplifikované z DNA *C. m.* subsp. *sepedonicus* produkují charakteristickou mnohotvárnost délky fragmentu s enzymem *Bgl* II po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Fragmenty získané z fragmentu specifického pro *C. m.* subsp. *sepedonicus* mají rozměry 282 bp a 220 bp.

2. **Příprava nakládacího pufru**

2.1 *Bromfenolová modř (10 % zásobní roztok)*

Bromfenolová modř	5 g
Destilovaná voda	50 ml

2.2 *Nakládací pufr*

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Bromfenolová modř (5,1)	300 µl
Destilovaná voda (bidestilát)	6,2 ml

3. **Pufr 10x Tris Acetát EDTA (TAE) pufr, pH 8,0**

Trojitý pufr	48,4 g
Ledová kyselina octová	11,42 ml
EDTA (sodná sůl)	3,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Před použitím zřeďte na 1x.

Také komerčně dostupné (např. Invitrogen nebo rovnocenné).

▼M1

Dodatek 7

Validovaná činidla pro FISH Test

1. **Oligosondy**

Sonda specifická pro *Cms* CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Nespecifická eubakteriální sonda EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fixační roztok**

[UPOZORNĚNÍ: FIXAČNÍ ROZTOK OBSAHUJE PARAFORMALDEHYD, KTERÝ JE TOXICKÝ! POUŽÍVEJTE RUKAVICE A NEVDECHUJTE. DOPORUČUJE SE PRACOVAT V DIGESTOŘI.]

i) Zahřejte 9 ml molekulárně čisté vody (např. Ultra pure water = (UPW)) na teplotu přibližně 60 °C a přidejte 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd se rozpustí po přidání 5 kapek 1N NaOH a zamíchání magnetickým míchadlem.

ii) Upravte pH na 7,0 přidáním 1ml fosfátového pufru 0,1 M (PB; pH 7,0) a 5 kapek HCl 1N. Zkontrolujte pH indikačním proužkem a v případě potřeby upravte pomocí HCl nebo NaOH.

[UPOZORNĚNÍ: V ROZTOCÍCH S PARAFORMALEDHYDEM NEPOUŽÍVEJTE MĚŘIČ PH!]

iii) Přefiltrujte roztok přes membránový filtr 0,22 µm a skladujte jej chráněný před prachem při teplotě 4 °C do dalšího použití.

iv) *Poznámka:*

Alternativní fixační roztok: 96 % etanol.

3. **3x Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizovaný přes filtr a autoklávovaný)	15 mM

Zřeďte až 1x, podle potřeby.

4. **Hybridizační roztok**

1x Hybmix

Sodium dodecyl sulfát (SDS)	0,01 %
vzorek EUB 338	5 ng/µl
vzorek CMSCY301	5 ng/µl

Připravte množství hybridizačního roztoku podle výpočtů v tabulce. Pro každé sklíčko (obsahující dvojmo 2 různé vzorky) je třeba 90 µl hybridizačního roztoku.

Tabulka: Doporučená množství pro přípravu hybridizační směsi

	2 sklíčka	8 sklíček
Sterilní voda UPW	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
sonda EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
sonda CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Celkový objem (µl)	90,0	360,0

Pozn.: Uchovávejte všechny roztoky obsahující lehké sensitivní oligosondy v temnu při teplotě –20 °C. Během použití chraňte před přímým slunečním zářením nebo elektrickým světlem.

5. **0,1M fosfátový pufr, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g

▼**M1**

KH_2PO_4	5,44 g
Destilovaná voda	1,00 l

Rozpusťte složky, zkontrolujte pH a sterilizujte autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

▼**M1**

Dodatek 8

Pěstování lilku vejcoplodého

Vysejte semena lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*) do sterilního výsevného substrátu. Přepichujte semenáčky s plně rozvinutými děložními lístky (10 až 14 dní) do sterilního pěstebního substrátu.

Lilek by se měl pěstovat ve skleníku za následujících podmínek:

Délka dne:		14 hodin nebo přirozená délka dne, pokud je delší;
Teplota:	den:	21 až 24 °C,
	noc:	15 °C.

Vhodné odrůdy lilku vejcoplodého: „Black Beauty”,

„Long Tom”,

„Rima”,

„Balsas”.

Dodavatel: viz internetová stránka http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Dodatek 9

Gramovo barvení v Huckerově modifikaci (Doetsch, 1981) ([1])

Roztok krystalové violeti

Rozpusťte 2 g krystalové violeti v 20 ml 95 % etanolu.

Rozpusťte 0,8 g šťavelanu amonného v 80 ml destilované vody.

Smíchejte oba roztoky.

Lugolův jódový roztok

Jód	1 g
Jodid draselný	2 g
Destilovaná voda	300 ml

Pevné látky společně rozetřete pomocí tloučku v misce. Nasypte do vody a míchejte v uzavřené nádobě do rozpuštění.

Safraninový roztok kontrastního barviva

Zásobní roztok:

Safranin O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zamíchejte a uložte.

Ředění: 1:10 pro přípravu pracovního roztoku.

Postup barvení

1. Připravte roztěry, vysušte na vzduchu a fixujte zahřátím.
2. Zalijte sklíčko roztokem krystalové violeti a nechte působit 1 minutu.
3. Krátce omyjte pod tekoucí vodou.
4. Zalijte Lugolovým jódovým roztokem a nechejte působit po dobu jedné minuty.
5. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem.
6. Odbarvujte pomocí po kapkách přidávaného 95 % etanolu tak dlouho, pokud se vyplavuje barvivo, nebo ponořte za jemného pohybování do etanolu na dobu 30 sekund.
7. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem.
8. Zalijte safraninovým roztokem a nechte působit 10 s.
9. Opláchněte pod tekoucí vodou a vysušte savým papírem.

Grampozitivní bakterie se zbarví fialově modře, gramnegativní bakterie se zbarví růžovočerveně.

LITERATURA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. V: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
5. Hugh, R. a Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.

([1]) Mohou se také použít komerčně dostupné roztoky nebo barvicí soupravy.

▼**M1**

7. Janse, J. D. a J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., č. 17, 1987, pp. 1–10.

8. Jansing, H. a K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

10. Klement Z.; Rudolph, K a D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.

11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.

12. Lelliott, R. A., E. Billing a A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.

13. Lelliott, R. A. a P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101–106.

14. Li, X. a S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.

15. Mills, D., Russell, B., W. a J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.

16. Pastrik, K. -H. a R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.

17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

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

20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. – 3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 pp.

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.

24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.

25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. a A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.

▼**M1**

PŘÍLOHA II

1. Při každém podezření z výskytu, pro který byl ve vyšetřovacím testu (vyšetřovacích testech) podle metod uvedených v příloze I zjištěn pozitivní výsledek, a dokončením těchto metod by mělo být podezření potvrzeno nebo vyvráceno, je třeba zadržet a vhodným způsobem konzervovat:

   — všechny hlízy, které jsou součástí vzorku, a pokud možno rostliny, které jsou součástí vzorku,

   — jakýkoli zbývající výluh a dodatečně připravený materiál pro vyšetřovací test/y, např. imunofluorescenční sklíčka,

   a

   — všechny příslušné podklady,

   dokud není výše uvedený postup zcela ukončen.

   Zadržení hlíz umožní případné testování odrůd.

2. V případě potvrzení organismu je třeba zadržet a vhodným způsobem konzervovat:

   — materiál uvedený v odstavci 1,

   a

   — vzorek napadeného materiálu lilku vejcoplodého naočkovaného výluhem z hlízy nebo rostliny,

   a

   — izolované kultury organismu

   nejméně do jednoho měsíce od oznamovacího postupu podle čl. 5 odst. 2.

▼**M1**

PŘÍLOHA III

1. Pro určení rozsahu pravděpodobné kontaminace podle čl. 5 odst. 1 písm. b) je třeba zohlednit tyto činitele:

   — hlízy nebo rostliny pěstované v místě produkce označeném za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a),

   — místo/a produkce, které/á mají v rámci produkčního systému vztah k hlízám nebo rostlinám označeným za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a), včetně těch, které užívají společné pěstitelské zařízení a vybavení přímo nebo prostřednictvím společného dodavatele,

   — hlízy nebo rostliny pěstované v místě/ech produkce uvedeném/ých v předchozí odrážce nebo nacházející se v takovém/vých místě/ech produkce během období, kdy se hlízy nebo rostliny označené za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) nacházely v takovém místě produkce uvedeném v první odrážce,

   — provozovny skladující brambory z míst produkce uvedených v odrážkách výše,

   — jakékoli zařízení, vozidlo, plavidlo, sklad, nebo jejich jednotky, a jakékoli jiné předměty včetně obalového materiálu, které mohly přijít do styku s hlízami nebo rostlinami označenými za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a),

   — jakékoli hlízy nebo rostliny, které se skladují nebo jsou v kontaktu s jakýmikoli stavbami nebo předměty vyjmenovanými v předchozí odrážce před očistou a dezinfekcí těchto předmětů a staveb,

   — v důsledku testů uvedených v článku 6 hlízy nebo rostliny, které mají sesterský nebo mateřský vztah k hlízám nebo rostlinám, které byly označeny za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a), a u nichž se, ačkoli výsledek testů na organismus mohl být negativní, zamoření jeví jako pravděpodobné vzhledem ke klonové souvislosti. Pro potvrzení identity zamořených a klonově příbuzných hlíz nebo rostlin lze provést testování odrůd,

   a

   — místo/a produkce hlíz nebo rostlin uvedených v předchozí odrážce.

2. Pro stanovení možného rozšíření podle čl. 5 odst. 1 písm. c) je třeba zohlednit tyto činitele:

   — blízkost ostatních míst produkce, kde se pěstují brambory nebo jiné hostitelské rostliny,

   — společná produkce a použití zásob sadbových brambor.

3. Oznámení uvedená v čl. 5 odst. 2 prvním pododstavci jsou stanovena následovně:

   — Bezprostředně po potvrzení přítomnosti organismu laboratorními testy, za použití metod stanovených v příloze I, alespoň:

      — název odrůdy partie brambor,

      — druh/typ (konzumní, sadba atd.) a v případě potřeby kategorie sadbových brambor.

   — Pokud hrozí riziko zamoření brambor z jiného členského státu/jiných členských států nebo do jiného členského státu/jiných členských států, musí členský stát, v němž byl výskyt potvrzen, neprodleně oznámit dotčenému členskému státu/státům informace nezbytné ke splnění čl. 5 odst. 3, jako např.:

      — název odrůdy partie brambor,

      — název a adresa odesílatele a příjemce,

      — datum dodávky partie brambor,

      — objem/velikost dodávky partie brambor,

      — kopie rostlinolékařského pasu nebo alespoň číslo rostlinolékařského pasu v případě potřeby, nebo popřípadě registrační číslo pěstitele nebo obchodníka a kopie dodacího listu.

   Poskytnutí těchto informací se neprodleně oznámí Komisi.

   — Po ukončení všech vyšetření, v každém případě:

      — datum potvrzení zamoření,

      — stručný popis vyšetření provedeného k zjištění zdroje a možného rozšíření zamoření, včetně stupně provedeného odběru vzorků,

      — informace o zjištěném nebo předpokládaném zdroji/zdrojích zamoření,

▼M1

— podrobnosti o rozsahu označeného zamoření, včetně počtu míst produkce a počtu partií s uvedením odrůdy a u sadbových brambor kategorie,

— podrobnosti o vymezené oblasti, včetně počtu míst produkce, která nebyla označena jako zamořená, ale nacházejí se v této oblasti,

— další informace související s potvrzeným/i ohniskem/y, které si Komise případně vyžádá.

▼**M1**

PŘÍLOHA IV

1. Úředně kontrolovaná opatření uvedená v čl. 7 odst. 1 jsou:

— použití jako krmivo pro zvířata po tepelné úpravě, která vylučuje riziko přežití organismu,

nebo

— likvidace na úředně schváleném místě pro likvidaci odpadu, v němž nehrozí žádné zjistitelné riziko úniku patogena do životního prostředí, např. prosáknutím na zemědělskou půdu,

nebo

— spálení,

nebo

— průmyslové zpracování prostřednictvím přímé a okamžité dodávky na zpracovatelský závod s úředně schváleným zařízením na likvidaci odpadu, u kterého bylo prokázáno, že v něm nehrozí žádné zjistitelné riziko rozšíření organismu, a se systémem očisty a dezinfekce alespoň odvozových vozidel,

nebo

— jiná opatření, pokud bylo prokázáno, že nehrozí žádné zjistitelné riziko rozšíření organismu; tato opatření a jejich odůvodnění se oznamují Komisi a ostatním členským státům.

Jakýkoli zbývající odpad související s výše uvedeným nebo vzniklý z výše uvedeného se musí zlikvidovat úředně schválenými metodami podle přílohy V této směrnice.

2. Vhodné použití nebo vhodná likvidace hlíz nebo rostlin označených za pravděpodobně zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. b) a uvedených v čl. 7 odst. 2 pod dohledem odpovědných úředních subjektů dotyčných členských států při jejich vzájemném informování za účelem zajištění kontroly v kterémkoliv okamžiku a se souhlasem odpovědných úředních subjektů členských států, v nichž se brambory mají balit nebo zpracovávat, s ohledem na zařízení k likvidaci odpadů uvedená v první a druhé odrážce, zahrnuje:

— jejich použití jako konzumních brambor určených ke spotřebě, balených pro přímou dodávku a použití, které nevyžaduje změnu obalu, v místě s vhodným zařízením na likvidaci odpadu. S brambory určenými k pěstování lze ve stejném místě manipulovat pouze v případě, že se tak děje odděleně nebo po očistě a dezinfekci,

nebo

— jejich použití jako konzumních brambor určených k průmyslovému zpracování, a určené pro přímé a okamžité dodání zpracovatelskému závodu s vhodným zařízením na likvidaci odpadu a systémem očisty a dezinfekce alespoň odvozových vozidel,

nebo

— jiné přiměřené využití nebo odstranění, pokud je stanoveno, že nehrozí žádné zjistitelné riziko rozšíření organismu, a že podléhá schválení výše uvedenými odpovědnými úředními subjekty.

3. Příslušnými metodami pro očistu a dezinfekci předmětů uvedených v čl. 7 odst. 3 se rozumí takové metody, u kterých bylo stanoveno, že nehrozí žádné zjistitelné riziko rozšíření organismu, a tyto metody se použijí pod kontrolou odpovědných úředních subjektů členských států.

4. Opatření, která mají členské státy provést uvnitř vymezené oblasti podle čl. 5 odst. 1 písm. c) a uvedené v čl. 7 odst. 4, zahrnují:

4.1 V místech produkce označených za zamořená podle čl. 5 odst. 1 písm. a):

a) na poli označeném za zamořené podle čl. 5 odst. 1 písm. a) buď

i) — během nejméně tří pěstitelských let následujících po roce označení zamoření,

— se přijmou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu,

a

— se nepěstují žádné bramborové hlízy, rostliny ani osivo či jiné planě rostoucí hostitelské rostliny organismu, případně plodiny, pro které hrozí zjistitelné riziko rozšíření organismu;

▼M1

— v prvním sklizňovém období brambor následujícím po období upřesněném v předchozí odrážce, a pod podmínkou, že pole bylo při úředních kontrolách v průběhu alespoň dvou po sobě jdoucích pěstitelských let před výsadbou shledáno prostým planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu, je povolena pouze produkce konzumních brambor a sklizené hlízy se testují postupem podle přílohy I;

— ve sklizňovém období brambor následujícím po období uvedeném v předchozí odrážce a následujícím po příslušném rotačním cyklu, který bude činit alespoň dva roky, pokud se mají pěstovat sadbové brambory, se brambory použijí buď na sadbu nebo jako konzumní brambory a provede se úřední šetření podle čl. 2 odst. 1; nebo

ii) — během čtyř pěstitelských let následujících po roce označení zamoření

— se přijmou opatření na odstranění planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu,

a

— pozemek se ponechá a udržuje ladem nebo jako stálá pastvina s častým nízkým sečením nebo intenzivní pastvou;

— v prvním sklizňovém období brambor následujícím po období upřesněném v předchozí odrážce, a pod podmínkou, že pole bylo při úředních kontrolách v průběhu alespoň dvou po sobě jdoucích pěstitelských let před výsadbou shledáno prostým planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu, je povolena produkce na sadbu nebo konzumní brambory a sklizené hlízy se testují postupem podle přílohy I;

b) na všech ostatních polích v zamořeném místě produkce, a pod podmínkou, že odpovědné úřední subjekty jsou přesvědčeny, že riziko spojené s planě rostoucími rostlinami bramboru a ostatními planě rostoucími hostitelskými rostlinami organismu bylo odstraněno:

— v pěstitelském roce po výše označeném zamoření se žádné bramborové hlízy, rostliny ani osivo nebo jiné planě rostoucí hostitelské rostliny nepěstují, nebo

— se certifikované sadbové brambory mohou pěstovat pouze jako konzumní,

— v druhém pěstitelském roce následujícím po označení zamoření se smí sázet pouze certifikované sadbové brambory nebo sadbové brambory, které byly úředně testovány na nepřítomnost bakteriální kroužkovitosti bramboru a které se pěstují pod úřední kontrolou na místech produkce jiných, než těch, která jsou uvedena v bodu 4.1, a to buď na sadbu nebo jako konzumní brambory,

— alespoň po dobu třetího pěstitelského roku následujícího po označení zamoření se sázejí pouze certifikované sadbové brambory nebo sadbové brambory, vypěstované pod úřední kontrolou z certifikovaných sadbových brambor, buď na sadbu nebo jako konzumní brambory,

— v každém pěstitelském roce uvedeném v předchozí odrážce se provedou opatření na odstranění případně přítomných planě rostoucích rostlin bramboru a ostatních planě rostoucích hostitelských rostlin organismu, a na každém bramborovém poli se provede úřední testování sklizených brambor postupem podle přílohy I;

c) neprodleně po označení zamoření podle čl. 5 odst. 1 písm. a) a po prvním následujícím pěstitelském roce se veškeré stroje a skladovací prostory v místě produkce a používané při produkci brambor vyčistí a dezinfikují podle potřeby a pomocí příslušných metod podle bodu 3;

d) v jednotkách chráněné produkce, kde je možné úplně nahradit pěstební substrát,

— se nesázejí žádné hlízy, rostliny ani osivo, dokud nebyla produkce podrobena úředně sledovaným opatřením na odstranění organismu a na odstranění veškerého materiálu hostitelských rostlin včetně přinejmenším celkové výměny pěstebního

▼M1

substrátu a očisty a dezinfekce produkční jednotky a veškerého zařízení a dokud následně nebyl příslušnými úředními subjekty udělen souhlas k pěstování brambor,

— se brambory pěstují z certifikovaných sadbových brambor nebo z minihlíz či mikrorostlin získaných z testovaných zdrojů.

4.2 Aniž jsou dotčena opatření podle bodu 4.1, členské státy uvnitř vymezené oblasti:

a) neprodleně po označení zamoření se veškeré stroje a skladovací prostory v takových zařízeních, které jsou používány v souvislosti s produkcí brambor, vyčistí a dezinfikují podle potřeby a pomocí příslušných metod podle bodu 3;

b) neprodleně po označení zamoření a po dobu nejméně tří pěstitelských období:

— zajistí vlastními příslušnými úředními subjekty kontrolu zařízení, ve kterých se pěstují nebo skladují bramborové hlízy nebo se s těmito hlízami nakládá, jakož i prostory, které pronajímají pro mechanizaci používanou k produkci brambor,

— vyžadují, aby k výsadbě všech porostů bramboru uvnitř této oblasti byla použita jen certifikovaná sadba nebo sadba vypěstovaná pod úřední kontrolou, a aby se po sklizni testovaly brambory na sadbu vypěstované v místech produkce, která byla označena za pravděpodobně zamořená podle článku 5 odst. 1 písm. b),

— vyžadují ve všech prostorách uvnitř oblasti oddělené nakládání se sklizenými zásobami sadbových brambor od nakládání s konzumními bramborami, nebo provedení systému očisty a dezinfekce mezi nakládáním se zásobami sadbových a konzumních brambor,

— provádí úřední šetření podle čl. 2 odst. 1;

c) vytvoří v případě potřeby program na náhradu všech zásob sadbových brambor po přiměřenou dobu.

▼**M1**

PŘÍLOHA V

Úředně schválené metody odstranění/likvidace odpadu podle přílohy IV odstavce 1 musí splňovat následující ustanovení, aby bylo vyloučeno jakékoli zjistitelné riziko šíření organismu:

i) Bramborový odpad (včetně vyřazených brambor a bramborových slupek) a jiný pevný odpad související s bramborami (včetně půdy, kamenů a jiného odpadového materiálu) se zlikvidují takto:

— buďto likvidací na úředně schváleném místě pro likvidaci odpadu, v němž nehrozí žádné zjistitelné riziko úniku organismu do prostředí, např. prosáknutím na zemědělskou půdu. Odpad musí být přemístěn přímo na místo a přitom být izolován tak, aby nehrozilo žádné riziko ztráty odpadu,

nebo

— spálením,

nebo

— jinými opatřeními, pokud bylo prokázáno, že nehrozí žádné zjistitelné riziko rozšíření organismu; tato opatření se oznamují Komisi a ostatním členským státům.

ii) Tekutý odpad: před likvidací musí být tekutý odpad obsahující na povrchu pevné částice podroben filtraci nebo sedimentaci za účelem likvidace těchto pevných částic. Tyto pevné částice musí být likvidovány podle písm. i).

Pevný odpad musí být buďto:

— zahříván minimálně na 60 °C v jádře po dobu alespoň 30 minut před likvidací,

nebo

— odstraněn jiným způsobem podléhajícím úřednímu schválení a pod úřední kontrolou, tak aby nehrozilo žádné zjistitelné riziko, že by odpad mohl přijít do styku se zemědělskou půdou. Podrobnosti těchto opatření se musí oznámit ostatním členským státům a Komisi.

Možnosti popsané v této příloze se použijí také na odpad spojený s manipulací, likvidací a zpracováním zamořených partií.