Tento dokument slúži čisto na potrebu dokumentácie a inštitúcie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah

►**B**

SMERNICA RADY 93/85/EHS

zo 4. októbra 1993

na kontrolu baktériovej krúžkovitosti zemiaka

(UL L 259, 18.10.1993, str. 1)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
►**M1**	Smernica Komisie 2006/56/ES z 12. júna 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

SMERNICA RADY 93/85/EHS

zo 4. októbra 1993

na kontrolu baktériovej krúžkovitosti zemiaka

RADA MINISTROV EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva, a najmä na jej článok 43,

so zreteľom na návrh Komisie ([1]),

so zreteľom na stanovisko Európskeho parlamentu ([2]),

so zreteľom na stanovisko Hospodárskeho a sociálneho výboru ([3]),

keďže produkcia zemiakov zaujíma v poľnohospodárstve spoločenstva dôležité miesto; keďže výška výnosov zemiakov je neustále ohrozovaná škodlivými organizmami;

keďže ochrana zemiakov a rajčiakov proti týmto škodlivým organizmom nesmeruje len k zachovaniu produkčnej kapacity, ale má podporiť aj rast produktivity poľnohospodárstva;

keďže preventívne ochranné opatrenia proti zavlečeniu škodlivých organizmov na územie ktoréhokoľvek členského štátu by mali iba obmedzený účinok, pokiaľ by sa súčasne a metodicky neuskutočňovala kontrola a prevencia proti rozšíreniu po celom spoločenstve;

keďže jedným zo škodlivých organizmov zemiakov a rajčiakov je *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicum (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al*., ktorý spôsobuje bakté-riovú krúžkovitosť zemiakov; keďže toto ochorenie sa už v niektorých častiach spoločenstva vyskytlo a niektoré obmedzené zdroje nákazy sa ešte stále existujú;

keďže pokiaľ nebudú pri týchto plodinách prijaté účinné opatrenia na zistenie ohnísk a rozšírenia tejto choroby, aby sa zabránilo jej výskytu a zavlečeniu a aby sa po zistení jej výskytu zabránilo šíreniu a aby sa šírenie potláčalo s cieľom jej eradikácie, bude pestovanie zemiakov v celom spoločenstve naďalej výrazne ohrozené;

keďže členské štáty spoločenstva musia mať navyše možnosť v prípade potreby prijať ďalšie alebo prísnejšie opatrenia, a to za podmienok vylúčenia akéhokoľvek obmedzenia v obchode so zemiakmi v rámci spoločenstva, ak už neboli uvedené v ustanoveniach smernice Rady 77/93/EHS z 21. decembra 1976 o ochranných opatreniach proti zavlečeniu škodlivých organizmov a ich šíreniu ([4]); keďže tieto opatrenia sa musia oznámiť ostatným členským krajinám spoločenstva a Komisii;

keďže smernica Rady 80/665/EHS zo 24. júna 1980 na zvládnutie baktériovej krúžkovitosti zemiaka ([5]) stanovila minimálne opatrenia, ktoré sú členské štáty spoločenstva povinné prijať proti baktériovej krúžkovitosti zemiaka;

keďže odvtedy došlo k významnému rozvoju poznatkov o baktériovej krúžkovitosti zemiaka a zisťovaní patogéna spôsobujúceho baktériovú krúžkovitosť zemiaka;

keďže použitie fytosanitárneho režimu spoločenstva na jeho území, ako oblasti bez vnútorných hraníc, vyvolalo potrebu opäť preskúmať a revidovať ustanovenia smernice Rady 80/665/EHS;

keďže na základe výsledkov tohto skúmania sa zistilo, že ustanovenia smernice Rady 80/65/EHS už nevyhovujú a je potrebná ďalšia špecifikácia opatrení;

([1]) Ú. v. ES C 93, 2.4.1993, s. 12.
([2]) Ú. v. ES C 176, 28.6.1993, s. 210.
([3]) Ú. v. ES C 161, 14.6.1993, s. 18.
([4]) Ú. v. ES L 26, 31.1.1977, s. 20. Smernica novelizovaná smernicou Komisie 92/103/EHS (Ú. v. ES L 363, 11.12.1992, s. 1).
([5]) Ú. v. ES L 180, 14.7.1980, s. 30.

▼B

keďže v takejto situácii je potrebné zrušiť smernicu Rady 80/665/EHS a prijať potrebné opatrenia;

keďže pri prijímaní týchto opatrení treba po prvé zobrať do úvahy, že choroba môže ostať v latentnom štádiu a nepozorovaná ako v rastúcej plodine, tak aj v skladovaných hľuzách a možno tomu zabrániť len výrobou a použitím zemiakovej sadby bez výskytu infekcie a po druhé, že na určenie miesta jej výskytu sú potrebné systematické úradné prieskumy; keďže rozširovanie tohto patogéna v rastúcej plodine nie je najdôležitejším činiteľom, ale keďže tento patogén môže prezimovať v samovysadených rastlinách zemiaka, ktoré predstavujú hlavný zdroj pokračovania nákazy z jedného rastového obdobia do ďalšieho; keďže tento patogén sa šíri najmä kontamináciou zemiakov pri dotyku s napadnutými hľuzami a mechanizáciou pri sadení, zbere a pozberovej manipulácii, ako aj prevoznými a skladovacími kontajnermi, ktoré sa týmto organizmom kontaminovali pri predchádzajúcom styku s napadnutými hľuzami; keďže takto napadnuté predmety môžu istý čas od svojho napadnutia ostať infekčnými; keďže šírenie tohto patogéna možno obmedziť alebo mu možno dezinfekciou takýchto predmetov zabrániť; keďže takáto kontaminácia zemiakovej sadby predstavuje pri šírení patogéna hlavné riziko;

keďže pri stanovovaní podrobností takýchto všeobecných, ako aj prísnejších opatrení, prijatých zo strany členských krajín spoločenstva s cieľom zabrániť zavlečeniu tohto škodlivého organizmu na svoje územie, od členských krajín spoločenstva sa v rámci Stáleho výboru pre zdravie rastlín (ďalej len „výbor") vyžaduje úzka spolupráca s Komisiou,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Táto smernicou sa týka opatrení, ktoré treba prijať v rámci členských štátov spoločenstva proti *Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicum (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al*., pôvodcovi baktériovej krúžkovitosti zemiaka (ďalej len „organizmus") s cieľom:

a) objaviť a určiť jeho výskyt a rozšírenie;

b) predchádzať jeho výskytu a rozšíreniu;

c) v prípade zistenia jeho výskytu, zabrániť jeho ďalšiemu výskytu a bojovať pri nemu s cieľom jeho eradikácie.

Článok 2

1. Členské štáty spoločenstva sú každoročne povinné vykonávať systematické úradné zisťovanie výskytu organizmov na hľuzách zemiakov *(Solanum tuberosum L.)* pochádzajúcich z ich územia, aby sa potvrdilo, že sa na nich tento organizmus vyskytuje.

Pre toto zisťovanie sa musia odoberať vzorky hľúz zemiakov ako sadbových, tak aj ostatného určenia, a to predovšetkým zo skladovaných partií, ktoré sú priamo úradne alebo pod úradným dozorom laboratórne testované, pri ktorom sa používajú postupy stanovené v prílohe I s cieľom zistiť prítomnosť a diagnostikovať tento organizmus. Navyše sa podľa potreby môžu na iných vzorkách vykonávať vizuálne prehliadky úradné alebo pod úradným dozorom, a to prerezávaním hľúz.

Na rastlinách sa tento prieskum má vykonávať primeranými postupmi a z nich odobraté vzorky sa musia testovať úradne alebo pod úradným dozorom.

O počte, pôvode, priestorovom rozložení a načasovaní odberu vzoriek musia rozhodnúť zodpovedné úradné orgány v zmysle ustanovení smernice 77/93/EHS, a to podľa uznávaných vedeckých a štatistických zásad a podľa biológie tohto organizmu s tým, že sa bude brať ohľad na osobitosti systémov pestovania zemiakov príslušnej členského štátu spoločenstva. Podrobnosti týchto prieskumov sa musia každoročne predkladať príslušným členským štátom spoločenstva a Komisii, aby sa tak zabezpečila porovnateľná úroveň istoty medzi členskými krajinami pri potvrdzovaní neprítomnosti tohto organizmu.

▼B

2. Výsledky úradného prieskumu sa podľa odseku 1 tohto článku musia najmenej jedenkrát ročne oznamovať ostatným členským štátom spoločenstva a Komisii. Podrobnosti súvisiace s týmto oznámením sú dôvernej povahy. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa môžu predložiť výboru.

3. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS by sa mali prijať nasledujúce ustanovenia:

— podrobnosti týkajúce sa prieskumu uvedeného v odseku 1 tohto článku, sa musia vykonávať podľa uznávaných vedeckých a štatistických zásad,

— podrobnosti vyššie uvedeného oznámenia v odseku 2 tohto článku.

4. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa musia prijať nasledujúce ustanovenia:

— primerané postupy na vykonávanie prieskumov a testovanie uvedené v treťom pododseku odseku 1 tohto článku.

Článok 3

Členské štáty sú povinné zabezpečiť, aby sa v prípade podozrenia alebo potvrdeného výskytu tohto organizmu buď na rastlinách a hľuzách zemiakov, alebo na hľuzách skladovaných a uvedených na trh na území pod ich správou, o tom podala správa zodpovedným úradným orgánom.

Článok 4

1. V prípadoch podozrenia z výskytu sú zodpovedné úradné orgány toho členského štátu spoločenstva, kde sa takéto podozrenia vyskytli, povinné zabezpečiť úradné alebo pod úradným dozorom vykonané laboratórne testovanie, a to s použitím postupov stanovených prílohou I a za podmienok stanovených v bode 1 prílohy II, aby sa potvrdilo alebo vyvrátilo podozrenie na výskyt. V prvom prípade sa musia splniť požiadavky stanovené v bode 2 prílohy II.

2. Kým sa potvrdí alebo vyvráti podozrenie na výskyt v zmysle odseku 1 sa v prípadoch podozrenia:

i) keď sa na základe vizuálneho pozorovania zistili prejavy tohto ochorenia alebo

ii) sa na základe pozitívneho výsledku imunofluorescenčného testu uvedeného v prílohe I, či iného primeraného testu toto ochorenie identifikovalo,

sú zodpovedné úradné orgány členských štátov spoločenstva povinné:

a) zakázať pohyb partií alebo zásielok, z ktorých sa vzorky odobrali, okrem prípadov, že sa tak deje pod ich kontrolou, alebo že nedôjde k žiadnemu identifikovateľnému riziku šírenia tohto organizmu;

b) podniknúť kroky na vysledovanie pôvodu podozrivého výskytu;

c) na základe odhadnutej miery rizika zaviesť primerané dodatočné, preventívne opatrenia, aby sa zabránilo šíreniu tohto organizmu: medzi takéto opatrenia sa môže zaradiť úradná kontrola pohybu všetkých ostatných hľúz v rámci podniku alebo spojených z podozrenia z výskytu.

3. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa môžu prijať nasledujúce opatrenia:

— opatrenia, uvedené v predchádzajúcom odseku 2 c).

4. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS sa prijmú nasledujúce opatrenia:

— iný primeraný test, uvedený v predchádzajúcom odseku 2 ii).

Článok 5

1. Ak sa úradným alebo pod úradným dozorom vykonaným laboratórnym testovaním pri použití metódy stanovenej prílohou I potvrdí prítomnosť tohto organizmu vo vzorke hľúz, rastlín alebo ich častí, sú zodpovedné úradné orgány členského štátu spoločenstva, vzhľadom na

▼B

uznané vedecké zásady, biológiu tohto organizmu a osobitne výrobné, marketingové a spracovateľské systémy tohto členského štátu spoločenstva povinné:

a) označiť za kontaminované hľuzy alebo rastliny, zásielku alebo partiu, ako aj mechanizačné či dopravné prostriedky, nádoby, sklady a ich jednotky, ako aj iné predmety vrátane obalového materiálu, z ktorého boli vzorky odobraté a ak je to potrebné, tak aj miesto produkcie a polia, z ktorých boli hľuzy či rastliny pozbierané;

b) určiť rozsah pravdepodobnej kontaminácie počas predzberového a pozberového styku s kontaminovaným materiálom alebo vo výrobných linkách v súvislosti s ustanoveniami bodu 1 prílohy III;

c) ohraničiť zónu kontaminácie v zmysle označenia uvedeného v odseku a), určenia rozsahu možnej kontaminácie v zmysle odseku b), ako aj možného rozšírenia tohto organizmu vzhľadom na bod 2 prílohy III.

2. Členské štáty spoločenstva v súlade s ustanoveniami bodu 3 prílohy III ihneď oznámia ostatným členským štátom a Komisii akúkoľvek kontamináciu označenú podľa odseku 1 a) a podrobnosti vyznačenia bezpečnostného pásma podľa odseku 1 c).

Podrobnosti, súvisiace s týmto oznámením, sú dôvernej povahy. Podľa postupov, určených článkom 16a smernice 77/93/EHS sa musia predložiť výboru.

3. V dôsledku oznámenia vykonaného podľa odseku 2 a v ňom uvedených podrobností ostatné, v oznámení uvedené členské krajiny podľa potreby a v súlade s ustanoveniami odseku 1 a), b) a c) označia kontamináciu, určia rozsah možnej kontaminácie a vyznačia bezpečnostné pásmo.

Článok 6

Členské štáty spoločenstva nariadia, aby sa tam, kde boli v zmysle článku 5, odseku (1) a) hľuzy alebo rastliny označené v zmysle článku 4 (1) za kontaminované, vykonalo testovanie zásob zemiakov, klonovo príbuzných s tými, ktoré sú kontaminované. Toto testovanie sa musí vykonať na takých množstvách hľúz alebo rastlinách, aké sú na určenie pravdepodobného prvotného zdroja infekcie a pravdepodobného rozsahu kontaminácie potrebné, najlepšie stupeň rizika v rádovom vyjadrení.

V dôsledku výsledku testovania sa podľa potreby a v zmysle ustanovení článku 5 odseku (1) a), b) a c) musia vykonať ďalšie označenie kontaminácie, určiť rozsahu pravdepodobnej kontaminácie a vyznačiť bezpečnostné pásmo.

Článok 7

1. Členské štáty spoločenstva sú povinné nariadiť, aby sa hľuzy alebo rastliny, v zmysle článku 5 odseku (1) a) označené za kontaminované nevysádzali a že pod kontrolou ich zodpovedných úradných orgánov budú:

— zničené alebo

— iným spôsobom zlikvidované v zmysle úradných opatrení prijatých v súlade s ustanoveniami bodu 1 prílohy IV a pod podmienkou, že nepríde k žiadnemu identifikovateľnému riziku šírenia tohto organizmu.

2. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa hľuzy alebo rastliny, označené v zmysle článku 5 odsek (1) b) za pravdepodobne kontaminované, nevysádzali bez toho, aby boli dotknuté výsledky testovania, ktoré sú spomenuté v článku 6 ohľadom klonovo príbuzných rastlín a aby sa pod kontrolou príslušných zodpovedných úradných orgánov primeraným spôsobom využili alebo zlikvidovali, podľa ustanovenia v bode 2 prílohy IV, a to takým spôsobom, aby nevzniklo žiadne identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu.

3. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa akékoľvek mechanizačné či dopravné prostriedky, nádoby, sklady a ich jednotky, ako aj iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré boli v zmysle článku 5 (1) a) označené ako kontaminované alebo v zmysle článku 5 (1) b) za prav-

▼B

depodobne kontaminované sa buď zničili, alebo umyli a dezinfikovali s použitím primeraných postupov, ktoré boli špecifikované v bode 3 prílohy IV. Po dezinfekcii sa už žiaden z takýchto predmetov nebude považovať za kontaminovaný.

4. Bez toho, aby boli dotknuté opatrenia, zavedené v zmysle odsekov 1, 2 a 3 tohto článku členské štáty spoločenstva ustanovia, aby sa v bezpečnostnom pásme vyznačenom podľa ustanovení článku 5 (1) c), uplatňoval rad opatrení, ktoré sú špecifikované v bode 4 prílohy IV.

Článok 8

1. Členské štáty spoločenstva ustanovia, aby zemiaková sadba spĺňala požiadavky, stanovené smernicou 77/93/EHS a aby v priamej línii pochádzala z materiálu získaného v rámci schváleného programu, o ktorom sa v rámci úradného alebo pod úradným dozorom vykonaného testovania s použitím postupov stanovených prílohou I zistilo, že je bez výskytu tohto organizmu.

Vyššie spomenuté testovanie sa musí vykonať:

— v prípadoch, keď kontaminácia nepriaznivo vplýva na produkciu zemiakovej sadby na rastlinách počiatočného klonového výberu,

— v ostatných prípadoch buď na rastlinách počiatočného klonového výberu, alebo na reprezentatívnej vzorke základného alebo vyšších množiteľských stupňov zemiakovej sadby.

2. V súlade s postupom stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS by sa mali prijať nasledujúce ustanovenia:

— podrobne vypracované pravidlá na použitie prvej zarážky druhého pododseku odseku 1 tohto článku,

— pravidlá vzhľadom na reprezentatívne vzorky, ako je to stanovené pod druhou zarážkou druhého pododseku odseku 1 tohto článku.

Článok 9

Členské štáty spoločenstva zakážu držanie tohto organizmu a narábanie s ním.

Článok 10

Bez toho, aby boli dotknuté ustanovenia smernice 77/93/EHS, môžu členské štáty spoločenstva schváliť zrušenie opatrení, uvedených v článkoch 6, 7 a 9 tejto smernice, a to pre pokusné a vedecké ciele, ako aj pre práce v odrodovom výbere a pod podmienkou, že takéto zrušenie nebude na ujmu boja proti tomuto organizmu a nevytvorí sa riziko šírenia tohto organizmu.

Článok 11

Členské štáty spoločenstva môžu prijať takéto dodatočné alebo prísnejšie opatrenia vtedy, keď si to vyžiada boj proti tomuto organizmu, alebo aby sa zabránilo jeho rozširovaniu, pokiaľ sú v súlade s ustanoveniami smernice 77/93/EHS.

Dodatočné opatrenia, uvedené v prvom odseku tohto článku môžu obsahovať nariadenie, že sa môže vysádzať len uznaná zemiakovú sadba, ktorá je buď úradne uznaná, alebo bola úradne prehliadnutá a spĺňa fytosanitárne požiadavky. Prehliadka by sa mala osobitne uplatniť len vtedy, keď majú farmári na svojich farmách povolené používať zemiakovú sadbu z ich vlastnej úrody a v iných prípadoch, keď sa vysádzajú sadbové zemiaky pochádzajúce z vlastnej výroby.

Podrobnosti týchto opatrení sa musia oznámiť ostatným členským štátom spoločenstva a Komisii.

Článok 12

Zmeny v prílohách k tejto smernici, ktoré treba vykonať v súvislosti s vývojom v oblasti vedecko - technických poznatkov sa musia schváliť v súlade s postupom, stanoveným článkom 16a smernice 77/93/EHS.

▼B

Článok 13

1. Od 15. novembra 1993 členské štáty spoločenstva prijmú a uverejnia ustanovenia, potrebné na zosúladenie s touto smernicou. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

Keď členské štáty prijmú tieto ustanovenia, musia v nich uviesť odkaz na túto smernicu alebo sa k nim takýto odkaz pripojí pri príležitosti ich úradného uverejnenia. Členské štáty stanovia spôsob vykonania tohto odkazu.

Členské štáty spoločenstva budú uplatňovať tieto ustanovenia od 16. novembra 1993.

2. Členské štáty spoločenstva bezodkladne informujú Komisiu o opatreniach štátu, ktoré prijmú v súlade s touto smernicou, v oblasti na ktorú sa vzťahuje táto smernica. Európska komisia o tom informuje ostatné členské štáty spoločenstva.

Článok 14

Týmto sa ruší smernica 80/665/EHS, a to s účinnosťou od 16. novembra 1993.

Článok 15

Táto smernica je určená členským štátom spoločenstva.

▼M1

PRÍLOHA I

TESTOVACIA SCHÉMA NA DIAGNOSTIKU, URČOVANIE PRÍTOMNOSTI A IDENTIFIKÁCIU BAKTÉRIE, KTORÁ SPÔSOBUJE KRÚŽKOVITOSŤ ZEMIAKA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **ssp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann et Kotthoff) Davis** *et al.*

ROZSAH TESTOVACEJ SCHÉMY

Predložená schéma opisuje rozličné postupy používané pri:

i) diagnóze baktériovej krúžkovitosti zemiaka v zemiakových hľuzách a rastlinách zemiaka;

ii) určovaní prítomnosti *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* vo vzorkách zemiakových hľúz a rastlín zemiaka;

iii) identifikácii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus (C. m.* subsp. *sepedonicus*).

VŠEOBECNÉ ZÁSADY

Optimalizované protokoly pre rôzne metódy, validované činidlá a podrobnosti o príprave materiálu potrebného na testy sa stanovujú v dodatkoch. Zoznam laboratórií, ktoré boli zaradené do optimalizácie a validovania protokolov, sa stanovuje v dodatku 1.

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

Parametre testovania musia zaručiť pevné a opakovateľné zistenie prítomnosti úrovní *C. m.* subsp. *sepedonicus* na prahoch stanovených pre vybrané metódy.

Presná príprava pozitívnych kontrol je nevyhnutná.

Testovanie v súlade s požadovanými prahmi zahŕňa aj správne nastavenia, údržbu a kalibráciu zariadenia, starostlivé zaobchádzanie s činidlami a ich uchovávanie, ako aj všetky opatrenia na zabránenie kontaminácii medzi vzorkami, napr. oddelenie pozitívnych kontrol od testovaných vzoriek. Musia sa uplatňovať normy na kontrolu kvality, aby nedošlo k administratívnym či iným omylom, najmä pokiaľ ide o označovanie a dokumentáciu.

Pozitívny výskyt, ako sa uvádza v článku 4 ods. 2 smernice 93/85/EHS, znamená pozitívny výsledok v diagnostických alebo skríningových testoch, ktoré sa vykonali na vzorke, ako sa uvádza v diagramoch.

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

Pozitívna reakcia na IF test, ako sa uvádza v článku 4 ods. 2, sa teda definuje ako pozitívna reakcia na IF test, ktorá sa potvrdila v druhom skríningovom teste (PCR/FISH).

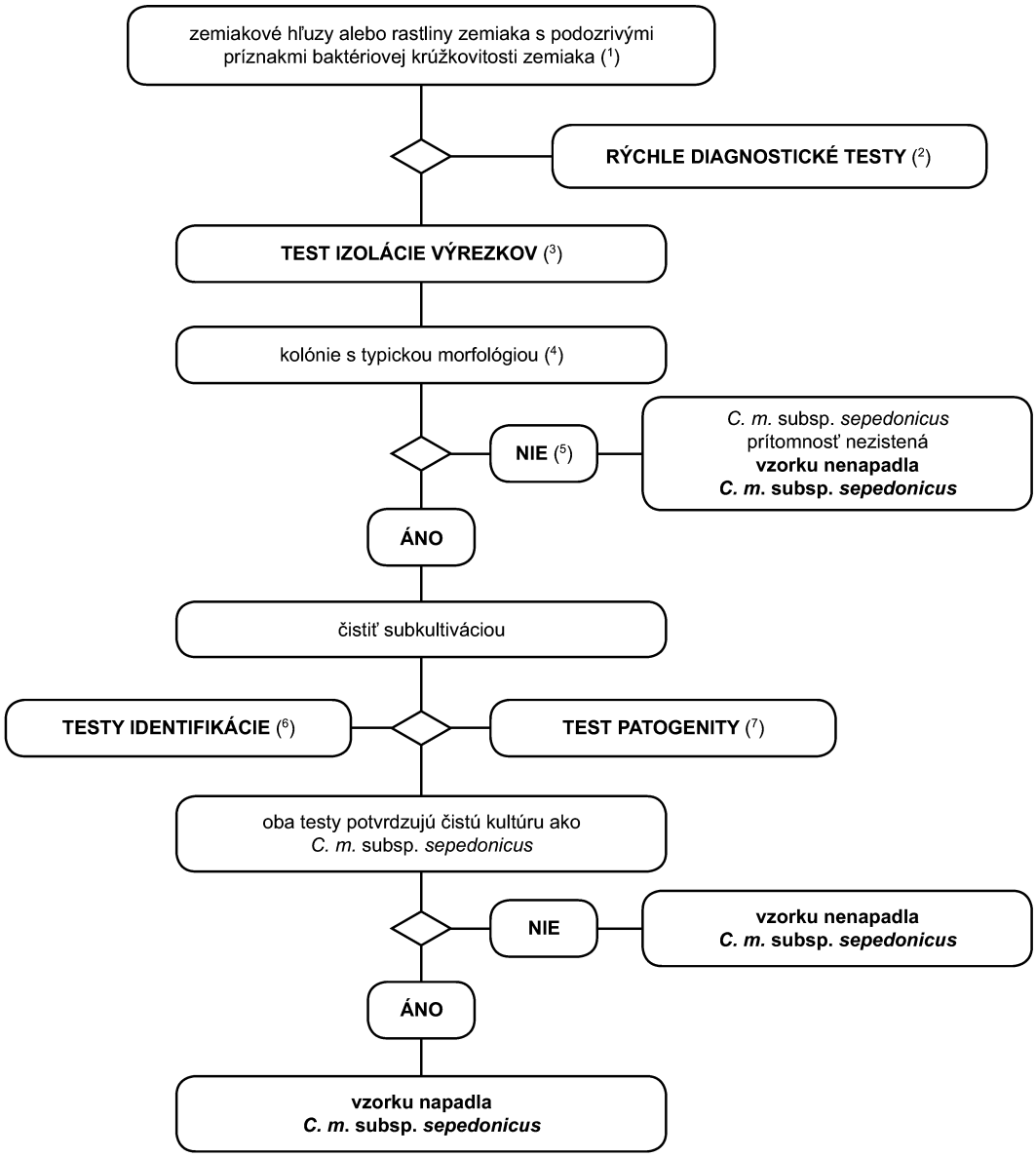
Potvrdená prítomnosť, ako sa uvádza v článku 5 ods. 1 smernice 93/85/EHS, znamená izolovanie a identifikáciu čistej kultúry *C. m.* subsp. *sepedonicus* s potvrdením patogenity.

1. ZNÁZORNENIE VÝVOJOVÝM DIAGRAMOM

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

Postup testovania sa týka zemiakových hľúz a rastlín s typickými alebo podozrivými príznakmi baktériovej krúžkovitosti zemiaka. Patrí sem rýchly skríningový test, izolácia patogénu z infikovaného cievneho pletiva na diagnostických médiách a v prípade pozitívneho výsledku identifikácia kultúry ako *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼M1



(1) Opis príznakov sa uvádza v oddiele 2.

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

(3) Hoci je izolovanie patogénu riedením a platňovým rozterom z rastlinného materiálu s typickými príznakmi jasné, kultivovanie môže zlyhať v pokročilých fázach infikovania. Saprofytické baktérie rastúce na chorom pletive môžu rásť oveľa rýchlejšie ako patogén alebo môžu potlačiť jeho rast na izolačnom médiu. Preto sa odporúča použiť zároveň neselektívne aj selektívne médiá, pokiaľ možno MTNA (oddiel 8) alebo biotest (oddiel 7).

(4) Opis typickej morfológie kolónie sa uvádza v oddiele 8.

(5) Ak je test izolácie negatívny, no príznaky ochorenia sú typické, musí sa izolácia zopakovať.

(6) Spoľahlivá identifikácia čistej kultúry *C. m.* subsp. *sepedonicus* sa dosiahne použitím testov uvedených v oddiele 9.

(7) Test patogenity sa opisuje v oddiele 10.

▼M1

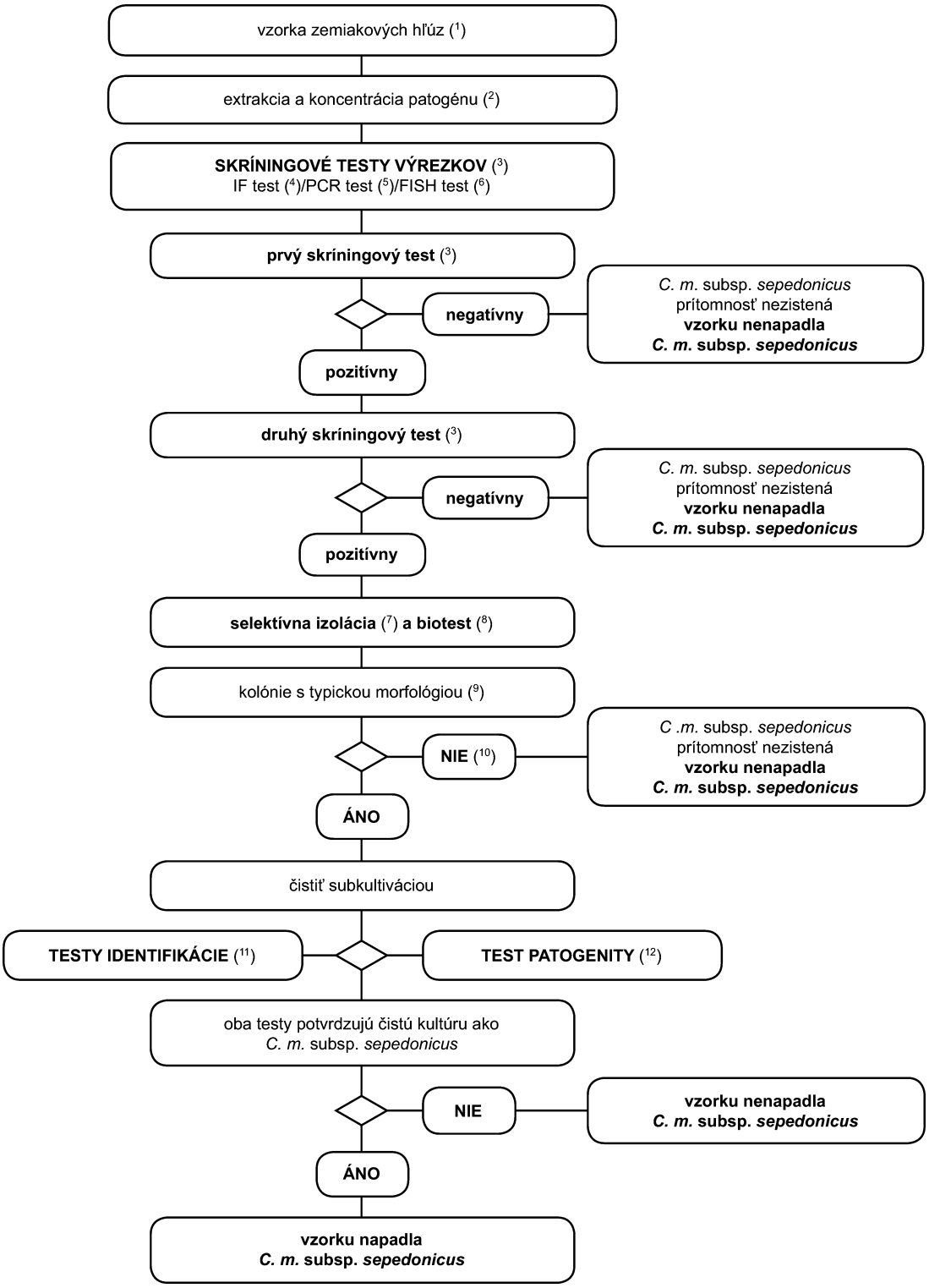
1.2. **Schéma na určenie prítomnosti a identifikáciu** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **vo vzorkách bezpríznakových zemiakových hľúz**

Princíp

Cieľom testovacieho postupu je zistiť prítomnosť skrytých infekcií v zemiakových hľuzách. Pozitívny výsledok najmenej dvoch skríningových testov založených na rôznych biologických princípoch musí dopĺňať izolácia patogénu a následne v prípade izolácie typických kolónií potvrdenie čistej kultúry ako *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Pozitívny výsledok iba jedného zo skríningových testov nie je dostatočný na to, aby sa vzorka považovala za podozrivú.

Skríningové testy a izolačné testy musia umožniť prah zistenia prítomnosti 10^3 až 10^4 buniek/ml resuspendovaného peletu a zahrnujú sa ako pozitívne kontroly v každej sérii testov.

▼M1


vzorka zemiakových hľúz (1)
extrakcia a koncentrácia patogénu (2)
SKRÍNINGOVÉ TESTY VÝREZKOV (3)
IF test (4)/PCR test (5)/FISH test (6)
prvý skríningový test (3)
negatívny
C. m. subsp. sepedonicus prítomnosť nezistená vzorku nenapadla C. m. subsp. sepedonicus
pozitívny
druhý skríningový test (3)
negatívny
C. m. subsp. sepedonicus prítomnosť nezistená vzorku nenapadla C. m. subsp. sepedonicus
pozitívny
selektívna izolácia (7) a biotest (8)
kolónie s typickou morfológiou (9)
NIE (10)
C .m. subsp. sepedonicus prítomnosť nezistená vzorku nenapadla C. m. subsp. sepedonicus
ÁNO
čistiť subkultiváciou
TESTY IDENTIFIKÁCIE (11)
TEST PATOGENITY (12)
oba testy potvrdzujú čistú kultúru ako C. m. subsp. sepedonicus
NIE
vzorku nenapadla C. m. subsp. sepedonicus
ÁNO
vzorku napadla C. m. subsp. sepedonicus

▼**M1**

([1]) Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz, postup sa však dá použiť aj s menšími vzorkami, ak 200 hľúz nie je k dispozícii.

([2]) Extrakcia patogénu a metódy koncentrácie sa opisujú v oddiele 3.1.

([3]) Ak najmenej dva testy založené na rôznych biologických princípoch sú pozitívne, musí sa vykonať izolácia a potvrdenie. Vykonajte najmenej jeden skríningový test. Ak je tento test negatívny, vzorka sa považuje za negatívnu. V prípade, že je test pozitívny, vyžaduje sa druhý alebo ďalšie skríningové testy založené na rôznych biologických princípoch s cieľom overiť prvý pozitívny výsledok. Ak druhý alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.

([4]) Imunofluorescenčný (IF) test.
Pre IF skríning vždy použite polyklonálnu protilátku, s dodatočnými monoklonálnymi protilátkami je možné získať viac špecifickosti (pozri oddiel 4).

([5]) Test PCR.
Použite náležite validované PCR činidlá a protokoly (pozri oddiel 6).

([6]) Test Fish.
Použite náležite validované činidlá a protokoly (pozri oddiel 5).

([7]) Selektívna izolácia.
S médiom MTNA alebo NCP-88 a 1/100 riedením resuspendovaného peletu je to v mnohých prípadoch vhodná metóda pre priamu izoláciu *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Typické kolónie je možné získať 3 – 10 dní po platňovom roztere. Patogén sa dá čistiť a identifikovať. Test si na plné využitie svojho potenciálu vyžaduje starostlivú prípravu výrezkov pupkových koncov hľúz, aby sa predišlo kontaminácii druhotnými bakériami, ktoré sa spájajú so zemiakovou hľuzou a sú konkurenčnými organizmami *C. m.* subsp. *sepedonicus* na médiu a môžu prerásť patogén. Ak platňový test zlyhá, izolácia sa musí vykonať z rastlín použitých na biotest (pozri oddiel 8).

([8]) Biotest sa používa na izoláciu *C. m.* subsp. *sepedonicus* z peletov zo zemiakového extraktu selektívnym obohatením v rastlinách baklažánu (*Solanum melongena*). Test si vyžaduje optimálne inkubačné podmienky tak, ako sú uvedené v rámci tejto metódy. Baktérie inhibujúce *C. m.* subsp. *sepedonicus* na médiu MTNA alebo NCP-88 do tohto testu najpravdepodobnejšie nebudú zasahovať (pozri oddiel 7).

([9]) Typická morfológia kolónie sa opisuje v oddiele 8.

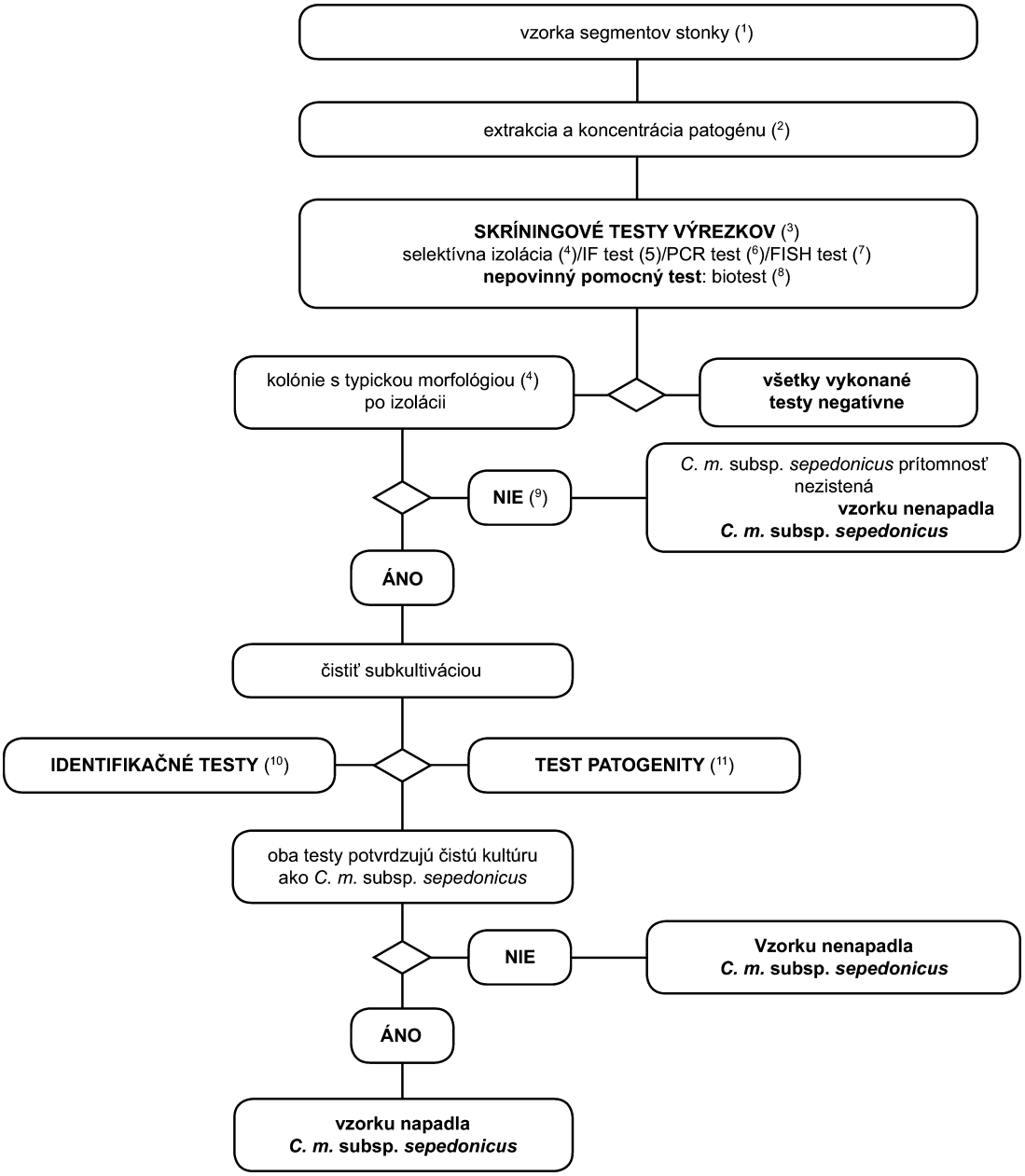
([10]) Kultivovanie alebo biotesty môžu zlyhať z dôvodu konkurencie alebo inhibície saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch dosiahnu pozitívne výsledky, no izolačné testy sú negatívne, zopakujte izolačné testy z toho istého peletu alebo odobratím dodatočného cievneho pletiva pri pupkovom konci z rozrezaných hľúz z tej istej vzorky a, ak je to potrebné, testujte dodatočné vzorky.

([11]) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *C. m.* subsp. *sepedonicus* sa dosiahne použitím testov opísaných v oddiele 9.

([12]) Test patogenity sa opisuje v oddiele 10.

▼M1

1.3. **Schéma na určovanie prítomnosti a identifikáciu** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **vo vzorkách bezpríznakových rastlín zemiaka**



▼**M1**

([1]) Pozri oddiel 3.2 pre odporúčanú veľkosť vzorky.

([2]) Extrakcia patogénu a metódy koncentrácie sa opisujú v oddiele 3.2.

([3]) Ak najmenej dva testy založené na rôznych biologických princípoch sú pozitívne, musí sa vykonať izolácia a potvrdenie.
Vykonajte najmenej jeden skríningový test. Ak je tento test negatívny, vzorka sa považuje za negatívnu. V prípade, že je tento test pozitívny, vyžaduje sa druhý alebo ďalšie skríningové testy založené na rôznych biologických princípoch s cieľom overiť prvý pozitívny výsledok. Ak druhý alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.

([4]) Test selektívnej izolácie a typická morfológia kolónie sa opisujú v oddiele 8.

([5]) IF test sa opisuje v oddiele 4.

([6]) Testy PCR sa opisujú v oddiele 6.

([7]) Test FISH sa opisuje v oddiele 5.

([8]) Biotest sa opisuje v oddiele 7.

([9]) Kultivácia alebo biotesty môžu zlyhať z dôvodu konkurencie alebo inhibície saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch dosiahnu pozitívne výsledky, no izolačné testy sú negatívne, zopakujte izolačné testy a, ak je to potrebné, testujte dodatočné vzorky.

([10]) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *C. m.* subsp. *sepedonicus* sa dosiahne použitím testov opísaných v oddiele 9.

([11]) Test patogenity sa opisuje v oddiele 10.

▼M1

2. VIZUÁLNE HODNOTENIE PRÍZNAKOV BAKTÉRIOVEJ KRÚŽKOVITOSTI ZEMIAKA

2.1. **Rastliny zemiaka**

V európskych klimatických podmienkach sa príznaky nájdu v teréne len zriedka a často len na konci sezóny. Príznaky sa navyše často ukrývajú za príznaky iných chorôb, starnutie alebo mechanické poškodenie, alebo sa s nimi zamieňajú. Môže sa preto ľahko stať, že pri inšpekciách v teréne zostanú príznaky bez povšimnutia. Príznaky starnutia sa veľmi odlišujú od príznakov baktériovej hnedej hniloby; vädnutie je spravidla pomalé a spočiatku sa obmedzuje na okraje listov. Mladé infikované listy sa často naďalej vyvíjajú, ale na infikovaných miestach menej výrazne. Listy tak nadobúdajú nepravidelný tvar. Listy postihnuté blokovaním cievnych zväzkov stonky, nachádzajúce sa nižšie na stonke, často rozvíjajú chlorotické, žlté až oranžové interkostálne oblasti. Infikované lístočky, listy a dokonca stonky môžu prípadne odumrieť. Listy a hľuzy často len zmenšia svoju veľkosť. Príležitostne sa vývin rastlín zastaví. Farebné obrázky celého radu príznakov sa nachádzajú na webovej stránke http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

2.2. **Zemiakové hľuzy**

Prvými príznakmi sú jemná sklovitosť alebo priesvitnosť pletiva bez zmäknutého okolia cievneho systému, predovšetkým blízko pupkového konca. Sfarbenie prstenca cievnych zväzkov na pupkovom konci môže byť oproti normálnemu stavu mierne tmavšie. Prvými ľahko identifikovateľnými príznakmi sú žltkasté sfarbenie prstenca cievnych zväzkov a vytekanie stĺpčekov látky syrovitej konzistencie z ciev pri jemnom stlačení hľuzy. Tento výlučok obsahuje milióny baktérií. Môže sa objaviť hnednutie cievneho pletiva a príznaky na hľuze sa v tomto štádiu podobajú na príznaky hnedej hniloby, ktorú spôsobuje *Ralstonia solanacearum.* Tieto príznaky sa najprv môžu obmedzovať na jednu časť prstenca, nemusí to však byť nevyhnutne pri pupkovom konci, a postupne sa môžu rozširovať na celý prstenec. S postupujúcou infekciou dochádza k rozkladu cievnych pletív; vonkajšia vrstva zásobného pletiva sa môže oddeľovať od vnútornej. V pokročilých štádiách infekcie sa na povrchu hľúz objavujú priehlbiny, ktoré majú často červeno-hnedé sfarbenie okrajov. V Európe sa nedávno vyskytlo niekoľko prípadov hniloby strednej vrstvy zásobného pletiva a zároveň aj prstenca cievnych zväzkov, v dôsledku čoho dochádza k druhotnej invázii prostredníctvom vnútorného vpadnutia a nekrózy. Druhotné napadnutie hubami alebo baktériami môže tieto príznaky prekryť a rozlíšenie pokročilejších štádií tohto ochorenia od ostatných hnilobných ochorení sa môže sťažiť, ba až znemožniť. Možné sú aj netypické príznaky. Farebné obrázky celého radu príznakov sa nachádzajú na webovej stránke Komisie http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

3. PRÍPRAVA VZORIEK

3.1. **Zemiakové hľuzy**

Poznámka:

— Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz na každý test. Intenzívnejší odber vzoriek znamená viac testov na vzorkách tejto veľkosti. Väčšie počty hľúz vo vzorke povedú k inhibícii alebo zložitej interpretácii výsledkov. Postup sa však môže bez ťažkostí uplatniť aj na vzorky s menej ako 200 hľuzami, keď je k dispozícii menej hľúz.

— Overenie všetkých metód na určovanie prítomnosti opísaných nižšie sa zakladá na testovaní vzoriek 200 hľúz.

— Extrakt zemiaka, ktorý sa opisuje nižšie, sa môže použiť aj na určovanie prítomnosti baktériovej hnedej hniloby zemiaka, *Ralstonia solanacearum.*

Nepovinné predbežné spracovanie, ktoré predchádza príprave vzorky:

Hľuzy očistite. Použite vhodný dezinfekčný prostriedok (zlúčeniny chlóru, ak sa má použiť test PCR s cieľom odstrániť prípadný patogén DNA) a čistiaci prostriedok medzi každou vzorkou. Hľuzy nechajte na vzduchu vyschnúť. Tento čistiaci postup je užitočný (nie je však povinný) predovšetkým pre vzorky s nadbytočným obsahom pôdy a tiež keď sa má vykonať test PCR alebo priama izolácia.

▼M1

3.1.1. Čistým a dezinfikovaným skalpelom alebo nožom na zeleninu odstráňte šupku hľuzy na jej pupkovom konci, aby bolo vidieť cievne pletivo. Z cievneho pletiva na pupkovom konci každej hľuzy opatrne vyrežte malý kúsok, dbajte pritom na to, aby sa vyrezalo čo najmenej necievneho pletiva (pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Poznámka:

Akékoľvek hľuzy s podozrivými príznakmi baktériovej krúžkovistosti odložte nabok a testuje oddelene.

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

3.1.2. Výrezky pupkových koncov hľúz umiestnite do nepoužitých jednorazových nádob, ktoré sa dajú uzatvoriť a/alebo utesniť (v prípade opätovného použitia sa nádoby musia dôkladne vyčistiť a dezinfikovať pomocou chlórových zlúčenín). Výrezky pupkových koncov hľúz by sa mali spracovať pokiaľ možno čo najskôr. Ak to nie je možné, skladujte ich v nádobe bez pridania pufra, ochladené nie dlhšie ako 72 hodín, alebo pri izbovej teplote nie dlhšie ako 24 hodín. Sušenie a suberizácia (zahojenie reznej rany) výrezkov, ako aj rast saprofytov počas skladovania môžu byť prekážkou pri určovaní prítomnosti baktérie, ktorá spôsobuje krúžkovitosť zemiaka.

3.1.3. Výrezky pupkových koncov hľúz spracujte jedným z nasledujúcich postupov, a to buď:

a) pokryte výrezky dostatočným množstvom (približne 40 ml) extrakčného pufra (dodatok 3) a vložte do rotačnej trepačky (50 – 100 otáčok za minútu) na 4 hodiny pri teplote nižšej ako 24 °C, alebo ochladené na 16–24 hodín,

alebo

b) výrezky zhomogenizujte s dosatočným množstvom (približne 40 ml) extračného pufra (dodatok 3) buď v mixéri (napr. Waring alebo Ultra Thurax), alebo drvením v utesnenom jednorazovom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba strong guage polythene, 150 mm × 250 mm; sterilizované ožiarením) s použitím gumeného kladivka alebo vhodného drviaceho zariadenia (napr. Homex).

Poznámka:

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

3.1.4. Dekantujte supernatant. Ak je nadmerne kalný, prečistite ho buď nízkou rýchlosťou odstreďovania (pri odstredivej sile nie väčšej ako 180 g počas 10 minút pri teplote medzi 4–10 °C), alebo vákuovou filtráciou (40–100 µm), filter premyte dodatočným (10 ml) extrakčným pufrom (dodatok 3).

3.1.5. Skoncentrujte bakteriálnu frakciu odstreďovaním pri odstredivej sile 7 000 g počas 15 minút (alebo 10 000 g počas 10 minút) pri teplote medzi 4–10 °C a supernatant vylejte tak, aby ste neporušili vzniknutý pelet.

3.1.6. Pelet resuspendujte v 1,5 ml peletového pufru (dodatok 3). Použite 500 µl a test pre *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 µl pre *Ralstonia solanacearum* a 500 µl na referenčné účely. Pridajte sterilný glycerín do konečnej koncentrácie 10–25 % (objem/objem) k 500 µl referenčného alikvotného podielu a k zostávajúcemu testovanej alikvotnému podielu, pretrepte a skladujte pri teplote –16 až –24 °C (niekoľko týždňov), alebo pri teplote –68 až –86 °C (niekoľko mesiacov). Počas testovania uchovávajte testované alikvotné podiely pri teplote 4–10 °C.

Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie sa neodporúča.

▼M1

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

3.1.7. Je nevyhnutné, aby sa so všetkými pozitívnymi kontrolami a vzorkami *C. m.* subsp. *sepedonicus* zaobchádzalo oddelene, aby nedošlo ku kontaminácii. Platí to pre podložné sklíčka pre IF test a pre všetky testy.

3.2. **Rastliny zemiaka**

Poznámka:

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

3.2.1. Čistým dezinfikovaným nožom alebo záhradníckymi nožnicami odoberte 1–2 cm segment zo spodnej časti každej stonky, tesne nad úrovňou pôdy.

Segmenty stonky krátko dezinfikujte 70 % etanolom a okamžite ich usušte na hodvábnom papieri.

Segmenty stonky vložte do uzatvorenej sterilnej nádoby v súlade s nasledujúcimi postupmi odoberania vzoriek:

3.2.2. Segmenty stonky spracujte podľa jedného z nasledujúcich postupov, a to buď:

a) segmenty pokryte dostatočným množstvom (približne 40 ml) extrakčného pufra (dodatok 3) a vložte do rotačnej trepačky (50 – 100 otáčok za minútu) na 4 hodiny pri teplote nižšej ako 24 °C, alebo ochladené na 16 – 24 hodín,

alebo

b) segmenty okamžite spracujte drvením v pevnom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba) s náležitým množstvom extrakčného pufra (dodatok 3) s použitím gumeného kladivka alebo vhodného drviaceho zariadenia (napr. Homex). Ak to nie je možné, uchovajte segmenty stoniek ochladené nie dlhšie ako 72 hodín alebo pri izbovej teplote nie dlhšie ako 24 hodín.

3.2.3. Dekantujte supernatant po usadzovaní počas 15 minút.

3.2.4. Ďalšie čistenie extraktu alebo koncentrácie bakteriálnej frakcie sa spravidla nevyžaduje, no dá sa dosiahnuť filtráciou a/alebo odstreďovaním, ako sa opisuje v oddiele 3.1.4 – 3.1.6.

3.2.5. Rozdeľte neriedený alebo koncentrovaný extrakt zo vzorky na dve rovnaké časti. Jednu časť uchovajte počas testovania pri teplote 4 – 10 °C a druhú časť uskladnite pomocou 10 – 25 % (objem/objem) sterilného glycerínu pri teplote –16 až –24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote –68 až –86 °C (niekoľko mesiacov) v prípade, že sa vyžaduje ďalšie testovanie.

4. IF TEST

Princíp

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

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

Poznámka:

Keď sa používa IF test ako hlavný skríningový test, vždy používajte polyklonálnu protilátku. V prípade pozitívneho výsledku IF testu s polyklonálnou protilátkou môžu ďalšie skríningy vzorky s monoklonálnou protilátkou poskytnúť viac špecifickosti, no môžu byť tiež menej citlivé.

Použite protilátky k referenčnému kmeňu *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Odporúča sa, aby sa titer určil pre každú novú dávku protilátok. Titer sa definuje ako najvyšší roztok, pri ktorom nastane optimálna reakcia pri testovaní suspenzie obsahujúcej 10^5 až 10^6 buniek na ml homologického kmeňa *C. m.* subsp. *sepedonicus* a s použitím vhodného konjugátu fluorescenčného izotiokyanátu (FITC) podľa odporúčania výrobcu. Surové polyklonálne alebo monoklonálne protilátky by mali

▼M1

mať titer IF najmenej 1:2000. Počas testovania by sa protilátky mali používať v pracovnom riedení (riedeniach) blízkom alebo na úrovni titra. Používajte overené protilátky (pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Test by sa mal vykonať na čerstvo pripravených extraktoch vzoriek. V prípade potreby sa môže úspešne vykonať na extraktoch uskladnených v glyceríne pri teplote –68 až –86 °C. Glycerín sa dá zo vzorky odstrániť pridaním 1 ml peletového pufra (dodatok 4), opätovným odstreďovaním počas 15 minút pri odstredivej sile 7 000 g a resuspenzii v rovnakom objeme peletového pufra. Často to nie je nevyhnutné, najmä ak sa vzorky upevnia na podložných sklíčkach flambovaním (pozri 2.2).

Pripravte osobitné kontrolné pozitívne podložné sklíčka homologického kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *C. m.* subsp. *sepedonicus*, v suspenzii zemiakového extraktu, ako sa uvádza v dodatku 2, a prípadne v pufri.

Prirodzene infikované pletivo (udržiavané v lyofilizovanej forme alebo zmrazené pri teplote –16 až –24 °C) by sa malo použiť, keď je to možné, ako podobná kontrola na rovnakom podložnom sklíčku.

Pokiaľ ide o negatívne kontroly, použite alikvotné podiely extraktu vzorky, ktoré mali pri predchádzajúcom testovaní negatívny výsledok.

Použite viacobjektové podložné sklíčka, podľa možnosti s desiatimi jamkami s minimálnym priemerom 6 mm.

Testujte kontrolný materiál rovnakým spôsobom ako vzorky.

4.1. Podložné sklíčka pripravte jedným z nasledujúcich postupov:

i) Pri peletoch s relatívne malým škrobovým sedimentom:

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

ii) Pre iné pelety:

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

4.2. Kvapky nechajte vyschnúť pri teplote okolitého prostredia alebo zohriatím na teplotu 40 až 45 °C. Baktériové bunky fixujte na podložnom sklíčku buď zahriatím (15 minút pri 60 °C), flambovaním, 95 % etanolom alebo podľa špecifických pokynov od dodávateľov protilátok.

V prípade potreby sa môžu fixované sklíčka potom uskladniť zmrazené vo vysušenej schránke pokiaľ možno čo najkratší čas (maximálne tri mesiace) pred ďalším testovaním.

4.3. Postup pri IF

i) Pri príprave podložného sklíčka podľa 4.1 i):

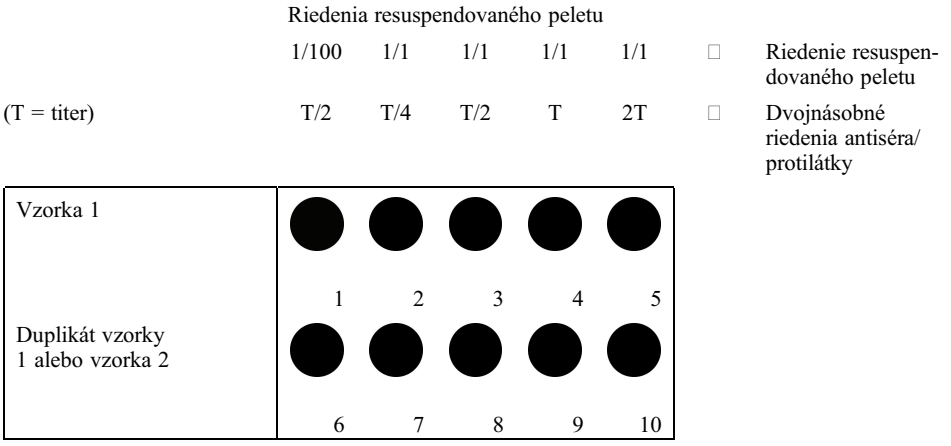
Pripravte sadu dvojnásobných riedení protilátky v pufri IF. V prvej jamke by mala byť 1/2 titra (T/2), v ostatných 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) a dvojnásobok titra (2T).

ii) Pri príprave podložného sklíčka podľa 4.1 ii):

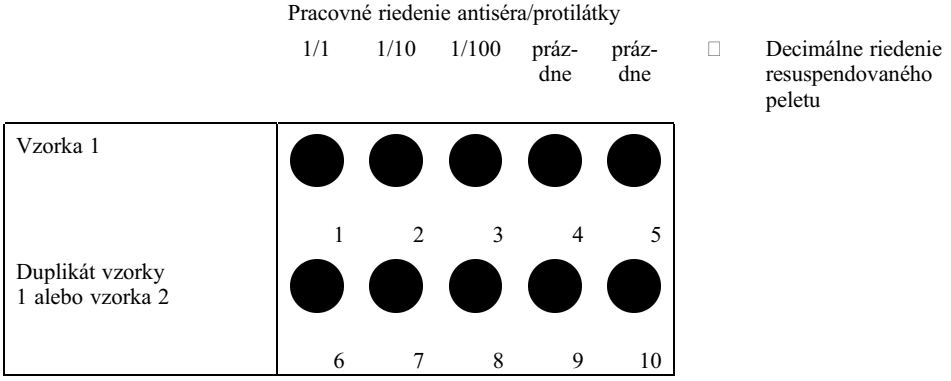
Pripravte pracovné riedenie protilátky v pufri IF. Pracovné riedenie ovplyvní špecifickosť.

▼**M1**

Obrázok 1 Príprava podložného sklíčka postupom podľa 4.1 i) a 4.3 i)



Obrázok 2 Príprava podložného sklíčka podľa 4.1 ii) a 4.3 ii)



4.3.1. Podložné sklíčka uložte na vlhký papier. Všetky testovacie jamky úplne pokryte riedeniami protilátky. Objem protilátky nanášaný na každú jamku musí prinajmenšom zodpovedať objemu naneseného extraktu.

Nasledujúci postup by sa mal vykonať v prípade, že dodávatelia protilátok neposkytli špecifické pokyny:

4.3.2. Podložné sklíčka na vlhkom papieri nechajte zakryté počas 30 minút pri teplote okolitého prostredia (18 – 25 °C).

4.3.3. Z každého podložného sklíčka opatrne straste kvapky a podložné sklíčka opatrne opláchnite pufrom IF. Preplachujte 5 minút v roztoku IF-pufer-Tween (dodatok 3) a potom 5 minút v pufri IF. Zabráňte vytváraniu aerosolu alebo prenosu kvapôčok, ktoré by mohli spôsobiť krížovú kontamináciu. Prebytočnú vlhkosť starostlivo odstráňte pijavým papierom.

4.3.4. Podložné sklíčka položte na vlhký papier. Testovacie jamky pokryte riedením konjugátu FITC použitým na stanovenie titra. Objem konjugátu nanášaný na jamky musí zodpovedať objemu aplikovanej protilátky.

4.3.5. Podložné sklíčka na vlhkom papieri nechajte zakryté počas 30 minút pri teplote okolitého prostredia (18 – 25 °C).

4.3.6. Kvapky konjugátu opatrne straste z podložného sklíčka. Opláchnite a prepláchnite rovnako ako v bode 4.3.3.

Prebytočnú vlhkosť starostlivo odstráňte.

4.3.7. Na každú jamku napipetujte 5 – 10 µl 0,1 M glycerínu pufrovaného fosfátom (dodatok 3) alebo komerčnú kryciu kvapalinu na udržanie signálu a priložte krycie sklíčko.

4.4. Hodnotenie testu IF:

▼**M1**

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

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

4.4.2. V testovacích jamkách podložných sklíčok pozorujte jasne fosforeskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *C. m.* subsp. *sepedonicus* (pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenzita fluorescencie musí byť rovnaká alebo lepšia ako pozitívny kontrolný kmeň pri rovnakom riedení protilátky. Bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou neberte na zreteľ.

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

4.4.3. Existuje viacero problémov súvisiacich so špecifickosťou imunofluorescenčného testu. Nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s atypickou morfológiou a saprofytických baktérií spôsobujúcich krížové reakcie s veľkosťou a morfológiou podobnou *C. m. sepedonicus* sa pravdepodobne vyskytnú v peletoch výrezkov pupkovitých koncov hľúz a segmentov stoniek.

4.4.4. Do úvahy zoberte iba fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou pri titri alebo pracovnom riedení protilátok, ako sa uvádza v bode 4.3.

4.4.5. Vyhodnotenie výsledkov testu IF:

i) Ak sa nájdu jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, odhadnite priemerný počet typických buniek na mikroskopické pole a vypočítajte počet typických buniek na ml resuspendovaného peletu (dodatok 4).

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

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

5. TEST FISH

Princíp

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

Poznámka:

Použite overené špecifické oligopróby *C. m.* subsp. *sepedonicus* (dodatok 7). Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti najmenej 10^3–10^4 buniek *C. m.* subsp. *sepedonicus* na ml pridaných do extraktov vzoriek, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom.

Nasledujúci postup by sa mal podľa možnosti vykonať na čerstvo pripravenom extrakte vzorky, no dá sa úspešne vykonať na extrakte vzorky, ktorý bol uchovaný v glyceríne pri teplote –16 až –24 °C alebo –68 až –86 °C.

Pokiaľ ide o negatívne kontroly, použite alikvotné podiely extraktu vzorky, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom pre *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Pokiaľ ide o pozitívne kontroly, pripravte suspenzie s obsahom 10^5 až 10^6 buniek na ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* (napr. kmeň NCPPB 4053 alebo PD 406) v 0,01 M fosfátového pufra (PB) z 3 – 5-dňovej kultúry (príprava: pozri dodatok 2). Osobitne pripravte kontrolné pozi-

▼M1

tívne podložné sklíčka homologického kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *C. m.* subsp. *sepedonicus* v suspenzii zemiakového extraktu, ako sa uvádza v dodatku 2.

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

Testujte kontrolný materiál rovnakým spôsobom ako vzorku (vzorky).

5.1. **Fixovanie zemiakového extraktu**

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

5.1.1. Pripravte fixačný roztok (pozri dodatok 7).

5.1.2. Pipetou naneste 100 µl z každého extraktu vzorky do Eppendorfovej skúmavky a odstreďujte pri odstredivej sile 7 000 g počas 8 minút.

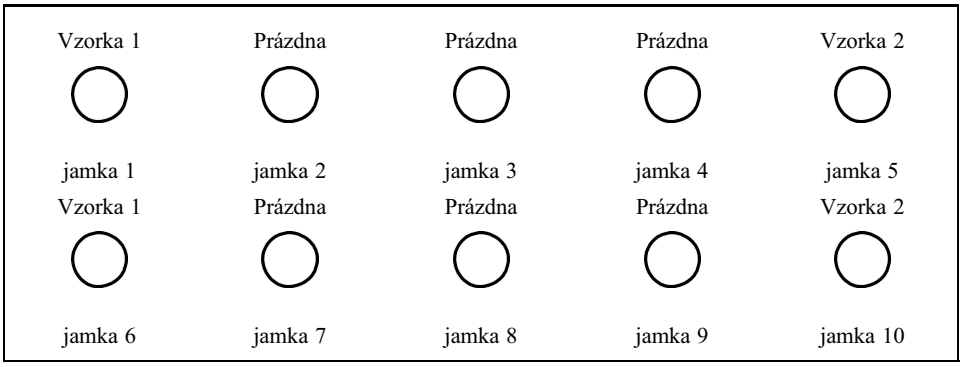
5.1.3. Odoberte supernatant a rozpustite pelet v 500 µl fixatívu pripraveného < 24 hodín vopred. Pretrepte a inkubujte cez noc pri teplote 4 °C.

Je možné použiť ako fixatív aj 96 % etanol. V taktomto prípade rozpustite pelet opísaný v bode 5.1.2 v zmesi pozostávajúcej z 50 µl 0,01 M PB a 50 µl 96 % etanolu. Zmiešajte pretrepaním a inkubujte pri teplote 4 °C počas 30 až 60 minút.

5.1.4. Odstreďujte počas 8 minút pri odstredivej sile 7 000 g, odoberte supernatant a resuspendujte pelet v 75 µl 0,01M PB (pozri dodatok 3).

5.1.5. Naneste 16 µl fixačných suspenzií na čisté multitestové podložné sklíčko, ako znázorňuje obr. 3. Aplikujte 2 rôzne neriedené vzorky na každé sklíčko a použite 10 µl na vytvorenie riedenia 1:100 (v 0,01 M PB). Zvyšný roztok vzorky (49 µl) sa môže uskladniť pri teplote – 20 °C po pridaní 1 objemovej jednotky 96 % etanolu. V prípade, že si skúška FISH vyžaduje opakovanie, odstráňte etanol odstredením a pridajte rovnaké množstvo 0,01 M PB (zmiešajte pretrepaním).

Obrázok 3 Usporiadanie podložného sklíčka pre test FISH



5.1.6. Nechajte podložné sklíčka usušiť na vzduchu (alebo v sušičke pri teplote 37 °C) a zafixujte ich flambovaním.

V tomto štádiu je možné postup prerušiť a s hybridizáciou pokračovať nasledujúci deň. Podložné skíčka by sa mali uložiť na suchom mieste, chránené pred prachom, pri izbovej teplote.

5.2. **Predhybridizácia a hybridizácia**

5.2.1. Pripravte lyzozýmový roztok s obsahom 10 mg lyzozýmu (Sigma L-6876) v 10 ml pufri (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Tento roztok je možné uskladniť, no smie sa zmraziť a rozmraziť len raz. Každú vzorku pokryte približne 50 µl lyzozýmového roztoku a inkubujte počas 10 minút pri izbovej teplote. Potom namočte podložné sklíčka jeden raz do demineralizovanej vody a vysušte pomocou filtračného papiera.

Iná možnosť: v každej jamke pridajte namiesto lyzozýmu do pufra 50 µl proteinázy K 40 – 400µg ml^{-1} (20 mM Tris-HCl, 2mM $CaCl_2$, pH 7,4) a inkubujte pri teplote 37 °C počas 30 minút.

5.2.2. Dehydratujte bunky postupným ponáraním do etanolu 50 %, 80 % a 96 %, do každého na 1 minútu. Podložné sklíčka usušte na vzduchu v stojane.

▼M1

5.2.3. Pripravte vlhkú inkubačnú komoru tak, že vysteliete dno hermetickej škatule absorpčným papierom alebo filtračným papierom nasiaknutým hybmixom 1x (dodatok 7). Predinkubujte škatuľu v hybridizačnej peci pri teplote 55 °C počas najmenej 10 minút.

5.2.4. Pripravte hybridizačný roztok (dodatok 7) v množstve 45 µl na každé podložné sklíčko a predinkubujte počas 5 minút pri teplote 55 °C.

5.2.5. Podložné sklíčka umiestnite na platňu zohriatu na teplotu 45 °C a naneste 10 µl hybridizačného roztoku na každú zo 4 jamiek na podložnom sklíčku (sklíčkach).

5.2.6. Každé podložné sklíčko zakryte 2 krycími sklíčkami (24 × 24 mm) tak, aby v nich nezostal vzduch. Tieto podložné sklíčka umiestnite do predhriatej vlhkej komory a hybridizujte cez noc v peci pri teplote 55 ° C v tme.

5.2.7. Pripravte 3 kadičky s obsahom 1 l ultra čistej vody (UPW), 1 l 1x hybmixu (334 ml 3x hybmixu a 666 ml UPW) a 1 l 1/2x hybmixu (167 ml 3x hybmixu a 833 ml UPW). Predinkubujte každú z nich vo vodnom kúpeli pri teplote 55 °C.

5.2.8. Odstráňte krycie sklíčka z podložných sklíčok a podložné sklíčka uložte na stojan.

5.2.9. Odstráňte zvyšok sondy inkubovaním počas 15 minút v kadičke s 1x hybmix pri teplote 55 °C.

5.2.10. Presuňte držiak podložného sklíčka do umývacieho roztoku 1/2 hybmix a inkubujte počas ďalších 15 minút.

5.2.11. Podložné sklíčka krátko ponorte do UPW a položte ich na filtračný papier. Odstráňte prebytočnú vlhkosť tak, že povrch opatrne pokryjete filtračným papierom. Napipetujte 5 – 10 µl roztoku krycej kvapaliny na udržanie signálu (napr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA alebo jej ekvivalent) na každú jamku a položte veľké krycie sklíčko (24 × 60 mm) cez celé podložné sklíčko.

5.3. **Hodnotenie testu FISH**

5.3.1. Podložné sklíčka okamžite preskúmajte mikroskopom prispôsobeným na epifluorescenčnú mikroskopiu pri zväčšení 630 alebo 1 000x pod olejovou imerziou. S filtrom vhodným na fluorescenčný izotiokyanát (FITC) sa eubakteriálne bunky (vrátane väčšiny gram negatívnych buniek) vo vzorke sa sfarbia na fluorescenčnú zelenú. S použitím filtra pre tetrametylrodamín-5-izotiokyanát, Cy3-sfarbené bunky *C. m.* subsp. *sepedonicus* sa ukážu ako fluorescenčné červené. Porovnajte morfológiu buniek s morfológiou pozitívnych kontrol. Bunky musia byť jasne fluoreskujúce a úplne sfarbené. Test FISH (oddiel 9.4) sa musí zopakovať, ak je sfarbenie odlišné. Každé pole mikroskopicky prehliadnite vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a taktiež po obvode. V prípade vzoriek, ktoré neukazujú žiadny alebo ukazujú len malý počet buniek, preskúmajte najmenej 40 mikroskopických polí.

5.3.2. V testovacích jamkách podložných sklíčok pozorujte jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *C. m.* subsp. *sepedonicus* (pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenzita fluorescencie musí byť rovnaká alebo lepšia ako intenzita fluorescencie pozitívneho kontrolného kmeňa. Bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou neberte na zreteľ.

5.3.3. Ak existuje podozrenie na akúkoľvek kontamináciu, test sa musí zopakovať. Tento prípad môže nastať, keď všetky podložné sklíčka v dávke ukazujú pozitívne bunky kvôli kontaminácii pufra alebo keď sa zistia pozitívne bunky (mimo jamiek podložných sklíčok) na krycej vrstve podložného sklíčka.

5.3.4. Existuje viacero problémov súvisiacich so špecifickosťou testu FISH. Môžu sa objaviť nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s atypickou morfológiou a saprofytické baktérie spôsobujúce krížové reakcie s veľkosťou a morfológiou podobnou *C. m.* subsp. *sepedonicus*, je to však menej časté ako v IF teste, v peletoch pupkovitých koncov hľúz a segmentov stoniek.

5.3.5. Do úvahy sa berú len fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou, pozri 5.3.2.

5.3.6. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH:

i) Platné výsledky testu FISH sa dosiahnu, ak sa nájdu jasnozeleno fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *C. m.* subsp. *sepedonicus* s použitím filtra FITC a jasnočerveno fluo-

▼M1

reskujúce bunky s použitím rodaminového filtra vo všetkých pozitívnych kontrolách, avšak v žiadnej negatívnej kontrole. Ak sa zistia jasno fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, odhadnite priemerný počet typických buniek na každé mikroskopické pole a vypočítajte počet typických buniek na ml resuspendovaného peletu (dodatok 4). Vzorky s najmenej 5×10^3 typických buniek na ml resuspendovaného peletu sa považujú za potenciálne kontaminované. Vyžaduje sa ďalšie testovanie. Vzorky s menej ako 5×10^3 typických buniek na ml resuspendovaného peletu sa považujú za negatívne.

ii) Test FISH je negatívny, ak sa jasnočerveno fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *C. m.* subsp. *sepedonicus* nenájdu s použitím rodaminového filtra za predpokladu, že typické jasnočerveno fluoreskujúce bunky sa nájdu v preparátoch pozitívnych kontrol s použitím rodaminového filtra.

6. TEST PCR

Princípy

Keď sa test PCR používa ako základný skríningový test a má pozitívny výsledok, test IF sa musí vykonať ako druhý povinný skríningový test. Keď sa test PCR používa ako druhý skríningový test a má pozitívny výsledok, vyžaduje sa ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu na dokončenie diagnostiky.

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

Poznámka:

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

Používajte validované činidlá a protokoly PCR. Podľa možnosti vyberte metódu s internou kontrolou.

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

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

Do testu PCR by sa mali zaradiť tieto negatívne kontroly:

— extrakt vzorky, ktorý sa predtým testoval s negatívnym výsledkom pre *C. m.* subsp. *sepedonicus*,

— kontroly pufra používané na extrakciu baktérie a DNA zo vzorky,

— reakčná zmes určená na PCR.

Mali by sa zaradiť aj tieto pozitívne kontroly:

— alikvotné podiely resuspendovaných peletov, ku ktorým sa pridal *C. m.* subsp. *sepedonicus* (pre prípravu pozri dodatok 2),

— suspenzia 10^6 buniek na ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* vo vode z virulentného izolátu (napr. NCPPB 2140 alebo NCPPB 4053),

— ak je to možné, použite aj DNA získanej zo vzoriek pozitívnych kontrol pri vykonávaní testu PCR.

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

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

6.1. **Metódy čistenia DNA**

Použite vzorky pozitívnych a negatívnych kontrol podľa opisu v predchádzajúcom texte.

Pripravte kontrolný materiál rovnakým spôsobom ako vzorky.

▼M1

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

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

6.1.a) Metóda podľa Pastrika (2000)

1. Napipetujte 220 µl lyzovacieho pufra (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky.
2. Pridajte 100 µl extraktu vzorky a vložte do ohrievacieho bloku alebo vodného kúpeľa s teplotou 95 °C na 10 minút.
3. Skúmavku položte na ľad na 5 minút.
4. Pridajte 80 µl koncentrovaného roztoku lyzozýmu (50 mg lyzozýmu na ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) a inkubujte pri teplote 37 °C počas 30 minút.
5. Pridajte 220 µl Easy DNA® roztoku A (Invitrogen), dobre premiešajte pretrepaním a inkubujte pri teplote 65 °C počas 30 minút.
6. Pridajte 100 µl Easy DNA® roztoku B (Invitrogen), riadne pretrepte tak, aby zrazenina v skúmavke voľne obiehala a vzorka bola rovnomerne viskózna.
7. Pridajte 500 µl chloroformu a pretrepte tak, aby sa viskozita znížila a zmes bola homogénna.
8. Odstreďujte s odstredivou silou 15 000 g počas 20 minút pri teplote 4 °C, aby sa oddelili fázy a vytvorilo sa rozhranie.
9. Premiestnite hornú fázu do novej Eppendorfovej skúmavky.
10. Pridajte 1 ml 100 % etanolu (–20 °C), krátko pretrepte a inkubujte na ľade počas 10 minút.
11. Odstreďujte s odstredivou silou 15 000 g počas 20 minút pri teplote 4 °C a odstráňte etanol z peletu.
12. Pridajte 500 µl 80 % etanolu (–20 °C) a premiešajte obrátením skúmavky.
13. Odstreďujte s odstredivou silou 15 000 g počas 10 minút pri teplote 4 °C, uchovajte pelet a odstráňte etanol.
14. Nechajte pelet usušiť na vzduchu alebo v DNA speed vac.
15. Resuspendujte pelet v 100 µl sterilnej UPW a nechajte pri izbovej teplote počas najmenej 20 minút.
16. Uchovajte pri teplote –20 °C, až kým sa nebude požadovať pre PCR.
17. Odstreďte ku dnu akúkoľvek bielu zrazeninu a použite 5 µl supernatantu obsahujúceho DNA pre PCR.

6.1.b) Iné metódy

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

6.2. **PCR**

6.2.1. Pripravte testové a kontrolné matrice pre PCR v súlade s validovaným protokolom (dodatok 6). Pripravte jedno decimálne riedenie z extraktu vzorky DNA (1:10 v UPW).

6.2.2. Pripravte vhodnú reakčnú zmes PCR v prostredí zbavenom akejkoľvek kontaminácie v súlade s uverejneným protokolom (dodatok 6). Validovaný protokol PCR je viacnásobnou reakciou a patrí tam aj interná PCR kontrola.

6.2.3. Pridajte 5 µl extraktu DNA na 25 µl PCR reakcie v sterilných PCR skúmavkách.

6.2.4. Vytvorte vzorku negatívnej kontroly, ktorá obsahuje iba reakčnú zmes PCR, a pridajte namiesto vzorky ultračistú vodu UPW z rovnakého zdroja, ako sa použil v zmesi PCR.

6.2.5. Skúmavky vložte do toho istého termocykléra, ktorý sa použil v predbežnom testovaní, a spustite náležitý optimalizovaný program PCR (dodatok 6).

▼M1

6.3. **Analýza produktu PCR**

6.3.1. Dekódujte amplikóny PCR agarózovou gélovou elektroforézou. Uveďte pod napätie s hodnotou 5 až 8 V/cm najmenej 12 µl amplifikovanej DNA reakčnej zmesi z každej vzorky zmiešanej s 3 µl nanášacieho pufra (dodatok 6) na 2,0 % (hmotnosť/objem) agarózových géloch v tris-octanovom-EDTA (TAE) pufri (dodatok 6). Použite príslušný markér DNA, napr. 100 bp ladder.

6.3.2. Na odhalenie pásikov DNA použite sfarbenie etidiumbromidom (0,5 mg/l) počas 30 – 45 minút, pričom dodržiavajte náležité *opatrenia na zaobchádzanie s týmto mutagénom.*

6.3.3. Pozorujte sfarbený gél pod transiluminániou krátkymi ultrafialovými vlnami (napr. $\lambda = 302$ nm) v prípade amplifikovaných produktov PCR s očakávanou veľkosťou (dodatok 6) a zaznamenajte výsledky.

6.3.4. Vo všetkých nových nálezoch/prípadoch overte autentickosť amplikónu PCR vykonaním analýzou enzymatickej reštrikcie na zvyšnej vzorke amplifikovanej DNA inkubovaním pri optimálnej teplote a počas optimálnej doby s použitím vhodného enzýmu a pufra (pozri dodatok 6). Digerované fragmenty dekódujte agarózovou gélovou elektroforézou podľa postupu opísaného vyššie a pozorujte charakteristické usporiadanie fragmentov po enzymatickej reštrikcii pod ultrafialovou transiluminániou po sfarbení etidiumbromidom a porovnajte s nedigerovanou a digerovanou pozitívnou kontrolou

Vyhodnotenie výsledkov testu PCR:

Test PCR je negatívny, ak sa nezistí prítomnosť špecifického amplikónu PCR *C. m.* subsp. *sepedonicus* s očakávanou veľkosťou v danej vzorke, no zistí sa vo všetkých vzorkách pozitívnych kontrol (v prípade viacnásobného PCR so špecifickými primermi vnútornej kontroly pre rastlinu: druhý produkt PCR s očakávanou veľkosťou sa musí amplifikovať s danou vzorkou).

Test PCR je pozitívny, ak sa zistí prítomnosť špecifického amplikónu PCR *C. m.* subsp. *sepedonicus* s očakávanou veľkosťou a v prípade potreby s očakávaným usporiadaním po reštrikcii, pod podmienkou, že sa neamplifikuje zo žiadnej zo vzoriek negatívnych kontrol. Spoľahlivé potvrdenie pozitívneho výsledku je možné získať aj zopakovaním testu s druhým súborom primerov PCR (oddiel 9.3).

Poznámka:

Je možné mať podozrenie na inhibíciu PCR, ak sa očakávaný amplikón získa zo vzorky pozitívnej kontroly s obsahom *C. m.* subsp. *sepedonicus* vo vode, no negatívne výsledky sa získajú z pozitívnych kontrol s *C. m.* subsp. *sepedonicus* v zemiakovom extrakte. Vo viacnásobných protokoloch PCR s internými kontrolami PCR sa inhibícia reakcie ukazuje, keď sa nedosiahne žiadny z dvoch amplikónov.

Je možné mať podozrenie na kontamináciu, ak sa očakávaný amplikón získa z jednej alebo viac negatívnych kontrol.

7. BIOTEST

Poznámka:

Predbežné testovanie s touto metódou by malo umožniť reprodukovateľné zistenie 10^3 až 10^4 kolónotvorných jednotiek *C. m.* subsp. *sepedonicus* na ml pridaných do vzorkových extraktov, ktoré boli v predchádzajúcich testoch negatívne (prípravu pozri v dodatku 2).

Najvyššiu citlivosť zistenia môžete očakávať, keď použijete čerstvo pripravený vzorkový extrakt a podmienky pre optimálny rast. Metóda sa však môže úspešne použiť pri extraktoch, ktoré boli uskladnené pod glycerínom pri teplote od –68 do –86 °C.

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

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

Ohľadom podrobností o pestovaní rastlín na test pozri dodatok 8.

7.1. Rozdeľte celý zostávajúci testový alikvotný podiel resuspendovaného peletu z kapitoly 3.1.6 alebo 3.2.5 medzi rastliny baklažánu pomocou jednej z nižšie uvedených metód (7.3 alebo 7.4). Použite len rastliny v rastovej fáze 2 – 3 až do úplnej expanzie tretej skutočnej rastovej

▼M1

fázy. Aby sa zabezpečilo úplné využitie resuspendovaného peletu, ako aj účinné naočkovanie, postupy uvedené nižšie si budú vyžadovať 15 – 25 rastlín baklažánov na každú vzorku.

7.2. Rastliny baklažánu 1 až 2 dni pred očkovaním nepolievajte, aby ste znížili ich vnútorné napätie.

7.3. Naočkovanie pozdĺžneho rezu

7.3.1. Rastlinu baklažánu uchopte medzi dva prsty a napipetujte kvapku (asi 5 až 10 µl) rozptýleného peletu na stonku medzi klíčne listy a prvý list.

7.3.2. Skalpelom urobte do stonky priečny rez asi 1 cm dlhý, približne do hĺbky 2/3 hrúbky stonky, počnúc pri kvapke očkovacej látky.

7.3.3. Rez uzavrite sterilnou vazelínou z injekčnej striekačky.

7.4. Naočkovanie injekčnou striekačkou

Stopky rastlín baklažánu naočkujte presne nad klíčnymi listami pomocou injekčnej striekačky vybavenej hypodermickou ihlou (najmenej 23 G). Vzorku rozdeľte medzi rastliny baklažánu.

7.5. Ako pozitívne kontroly naočkujte 5 rastlín s alikvotným podielom 10^5 to 10^6 buniek na ml známej kultúry *C. m.* subsp. *sepedonicus* a v možnom prípade prirodzene infikovaným hľuzovým vláknom (pozri kapitolu 4) pomocou tej istej očkovacej metódy (7.3 alebo 7.4).

7.6. Ako negatívny kontrolu naočkujte 5 rastlín sterilným peletovým pufrom pomocou tej istej očkovacej metódy (7.3 alebo 7.4).

7.7. Rastliny inkubujte v karanténnych zariadeniach počas 4 týždňov pri teplote 18 – 24 °C. Rastliny inkubujte pri dostatočnom svetle a vysokej vlhkosti (70 – 80 %) a zalievajte ich tak, aby nedochádzlo k podmokaniu alebo vädnutiu v dôsledku nedostatku vody. Bunky *C. m. sepedonicus* odumierajú pri teplotách nad 30 °C a optimálna teplota predstavuje 21 °C. Aby ste sa vyhli kontaminácii, inkubujte rastliny s pozitívnou a negatívnou kontrolou na jasne oddelených častiach v skleníku alebo v miestnosti na pestovanie, alebo v prípade obmedzeného priestoru zabezpečte prísne oddelenie medzi jednotlivými postupmi. Ak musia byť rastliny na rôzne vzorky inkubované v tesnej blízkosti, oddeľte ich vhodnými clonami. Pri oplodňovaní, zalievaní, kontrole a iných manipuláciách musíte dávať veľký pozor, aby nedošlo ku vzájomnej kontaminácii. Je potrebné, aby sa skleníky a miestnosti na pestovanie udržiavali chránené pred škodiacim hmyzom, ktorý môže preniesť baktériu zo vzorky na vzorku.

7.8. Po týždni začnite pravidelne sledovať symptómy. Vypočítajte počet rastlín, na ktorých s prejavujú symptóny *C. m.* subsp. *sepedonicus*, ktoré spôsobujú vädnutie listov na rastlinách baklažánu, ktoré sa môže začať buď okrajovým, alebo medzižilovým ochabnutím. Zvädnuté pletivá sa najprv sfarbujú do tmavozelena alebo sa na nich vytvárajú škvrny, pred odumieraním často blednú. Medzižilové vädnutie má mazľavý vodou nasiaknutý vzhľad. Odumierajúce tkanivo má často svetložlté okraje. Rastliny nemusia byť nutne mŕtva; čím dlhšie je obdobie, keď sa začínajú objavovať symptómy, tým vyššia je možnosť prežitia. Rastliny môžu infekciu prekonať. Mladšie rastliny baklažánu sú aj voči menším populáciám *C. m.* subsp. *sepedonicus* oveľa citlivejšie ako staršie rastliny, preto treba použiť rastliny pred dosiahnutím rastovej fázy 3.

Vädnutie môže byť taktiež vyvolané aj populáciami iných baktérií či húb, ktoré sú v pletivách hľúz zemiaka prítomné. Patrí medzi ne *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* supsp. *carotovora* a *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica, Phoma exigua* var. *foveata*, ako aj populáciami saprofytických baktérií. Predovšetkým *Erwinia chrysanthemi* môže spôsobiť symptómy na listoch a vädnutie, ktoré je veľmi podobné symptómom *Clavibacter michiganensis sepedonicus*. Jediný rozdiel spočíva v sčernetí stopiek v prípade infekcií *Erwinia chrysanthemi*. Ďalšie vädnutie sa od vädnutia spôsobeného *Clavibacter michiganensisssp* subsp. *sepedonicus* dá odlíšiť, pretože dochádza k rýchlemu vädnutiu celých listov alebo celých rastlín. Rovnako sa môže pripraviť farbenie podľa Grama: týmto testom sa odlíši *C. m.*, subsp. *sepedonicus* od *Erwinia* spp.

7.9. Hneď ako sa začnú prejavovať symptómy na rastlinách baklažánu, mala by sa zabezpečiť opätovná izolácia pomocou častí zvädnutého listového tkaniva alebo tkaniva stopky z rastlín (pozri 3.1.3 v súvislosti s maceráciou). Povrch listov a stopiek baklažánu dezinfikujte potretím 70 %-ným etanolom. Uskutočnite test IF alebo test PCR na miazge rastliny baklažánu a izolujte do vhodného (selektívneho) média (pozri

▼M1

oddiel 8). Rovnako sa môže pripraviť farbenie podľa Grama (dodatok 9). Identifikujte čisté kultúry predpokladaného *C. m.* subsp. *sepedonicus* a potvrďte patogenecitu (pozri oddiel 9 a 10).

7.10. Za určitých podmienok, najmä keď rastové podmienky nie sú optimálne, môže *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v rastlinách baklažánu prežívať v podobe latentnej infekcie až 4 týždne po naočkovaní. Ak po 4 týždňoch nepozorujete žiadne symptómy, uskutočnite IF/PCR testy na zmiešanej vzorke z centimetrových častí stonky každej testovanej rastliny, ktoré odoberiete nad miestom očkovania. Ak je test pozitívny, mala by sa zabezpečiť opätovná izolácia na vhodnom (selektívnom) médiu podľa postupu v oddiele 8. Identifikujte čisté kultúry predpokladaného *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a potvrďte patogenitu (pozri oddiel 9 a 10).

Vyhodnotenie výsledkov biotestu:

Platné výsledky biotestu získate, keď sa na rastlinách s pozitívnou kontrolou prejavujú typické symptómy, baktéria sa môže opätovne izolovať z týchto rastlín a neprejavujú sa žiadne symptómy pri negatívnych kontrolách.

Biotest je negatívny, ak testované rastliny nie sú infikované *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a pod podmienkou, že *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* sa zistí pri pozitívnych kontrolách.

Biotest je pozitívny, ak sú testované rastliny nainfikované baktériou *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

8. IZOLÁCIA *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Poznámka:

Diagnóza je kompletná len vtedy, ak je *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* izolované, následne identifikované (pozri oddiel 9) a potvrdené testom patogenity (oddiel 10). Hoci je *C. m.* subsp. *sepedonicus* organizmom citlivým, možno ho izolovať z pletív vykazujúcich príznaky ochorenia.

Môžu ho však prerásť rýchlorastúce saprofytické baktérie, a preto sú priame izolácie z peletu pochádzajúceho z hľúz zemiaka alebo stopkového tkaniva (oddiel 3.1.6 alebo 3.2.5) zložité. Priama izolácia *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* sa môže uskutočniť pomocou selektívneho média a primeraného riedenia resuspendovaného peletu z výrezkov pupkových koncov alebo stopiek zemiakov.

Uskutočnia sa izolácie zo všetkých symptomatických zemiakových hľúz alebo častí stopiek a z rastlín baklažánu, pri ktorých sa neprejavili žiadne symptómy, ale test IF/PCR zo zmiešanej vzorky bol pozitívny (pozri oddiel 7.10). V prípade potreby možno maceráciu stoniek rastlín baklažánu vykonať podľa postupov uvedených v oddiele 3.1.3.

Ako pozitívne kontroly pripravte decimálne riedenia zo suspenzie s 10^6 cfu na ml *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (napr. NCPPB 4053 alebo PD 406). Aby sa vylúčila akákoľvek možnosť kontaminácie, pozitívne kontroly pripravte úplne oddelene od vzoriek určených na testovanie.

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

Kontrolný materiál otestujeme úplne rovnakým spôsobom ako pri vzorke/vzorkách.

8.1. **Selektívny platňový rozter**

8.1.1. Zo 100 µl alikvotného podielu vzorky resuspendovaného rajčiakového peletu alebo miazgy baklažánu pripravte 10-násobné riedena v peletovom pufri (dodatok 3).

8.1.2. Izolácia z neriedeného peletu obyčajne nie je úspešná z dôvodu prieberčivých rastových zvyklostí Cms a konkurenčného pôsobenia saprofytov. Keďže baktéria je obyčajne prítomná v rozsiahlych populáciách v infikovaných tkanivách, saprofyty sa obyčajne môžu riedením odstrániť, zatiaľ čo patogén zostáva. Preto sa odporúča rozdeliť 100 µl z každej zo vzoriek, 1/100 až 1/10 000 riedení na médium MTNA alebo médium NCP-88 (dodatok 5) (pri použití Petriho misiek s priemerom 90 mm, pre misky s alternatívnou veľkosťou upravte množstvo), pomocou nanášačiek (hokejkového tvaru) a techniky platňového nanášania.

▼M1

Poznámka:

Alternatívna stratégia spočíva v nanesení počiatočného alikvotného podielu 100 µl rajčiakového peletu na prvú platničku s agarom pomocou nanášačky a potom presunúť nanášačku do druhej platničky s agarom, vystriekať akýkoľvek zvyšok z nanášačky; nakoniec zopakovať tento postup pri tretej platničke, a tak zabezpečiť efekt riedenia na platničke pomocou nanášačky.

8.1.3. Platničky inkubujte na tmavom mieste pri teplote 21 – 23 °C.

8.1.4. Počiatočné preskúmanie platničiek vrátane s odkazom na kontrolné platničky a počítanie pravdepodobne tvoriacich sa kolónií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* začnite po 3 dňoch a následne spočítajte pravdepodobne tvoriace sa kolónie po 5, 7, príp. 10 dňoch.

8.2. **Čistenie podozrivých kolónií**

Poznámka:

Preočkovávanie pravdepodobne tvoriacich sa kolónií *C. m.* subsp. *sepedonicus* by malo prebiehať na médiách YGM pri naočkovaní rastlín baklažánu a/alebo následnej identifikácii; malo by sa tak urobiť predtým, ako sa začne na platničkách prejavovať intenzívny rast, t. j. najlepšie po 3 – 5 dňoch.

8.2.1. Kolónie s pravdepodobným *C. m.* subsp. *sepedonicus* vstreknite na jedno z nasledujúcich médií (vzorce sú uvedené v dodatku 5):

živný dextrózový agar (len pre subkultúry),

kvasnicovo-glukózový peptónový agar,

kvasnicový agar s výluhom minerálnych solí.

Inkubujte počas až 10 dní pri teplote 21 – 24 °C.

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* rastie pomaly, zvyčajne v priebehu 10 dní vytvára bodové, smotanovo sfarbené a kupolovité kolónie. Fotografie typických kolónií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (pozri webovú stránku: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Kultúru opätovným rozterom prečistíme.

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

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

8.2.3 Určite predpokladané kultúry (pozri oddiel 9) a urobte test patogenity (pozri oddiel 10).

9. IDENTIFIKÁCIA

Pomocou najmenej dvoch z nasledujúcich testov založených na rozličných biologických princípoch identifikujte čisté kultúry izolátov predpokladaného *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

V potrebných prípadoch zahrňte pre každý uskutočňovaný test známe referenčné kmene.

9.1. **Nutričné a enzymatické identifikačné testy**

Určite nasledujúce fenotypické vlastnosti, ktoré sú všeobecne prítomné alebo neprítomné v *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, na základe metód podľa Lelliotta a Steada (1987), Klementa a kol. (1990), bez uvedenia autora (1987).

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

▼M1

Všetky testy musia obsahovať známe kontroly s *C. m.* subsp. *sepedonicus*. V nutričných a fyziologických testoch by sa mali použiť očkovacie látky zo subkultúr vypestovaných na živných agaroch. Morfologické porovnávanie sa musí vykonávať s kultúrami vypestovanými na živných dextrózových agaroch.

Testy	*Očakávaný výsledok*
oxidačno-fermentačný test (O/F)	Inertný alebo slabo oxidatívny
aktivita oxidázy	–
rast pri 37 °C	–
aktivita ureázy	–
hydrolýza eskulínu	+
hydrolýza škrobu	– alebo slabá
tolerancia 7 % NaCl	–
tvorba indolu	–
katalázová aktivita	+
tvorba H_2S	–
využitie citranov	–
skvapalňovanie želatíny	–
kyselina glycerolová	–
kyselina z laktózy	– alebo slabá
kyselina z ramnózy	–
kyselina z glycerínu	–
farbenie podľa Grama (dodatok 9)	+

9.2. **Imunofluorescenčný test (IF test)**

a) Pripravte suspenziu približne z 10^6 buniek na ml v pufri IF (dodatok 3).

b) Pripravte sériu dvojnásobného riedenia príslušného antiséra.

c) Použite metódu IF (oddiel 4).

d) Pozitívny test IF dosiahnete, ak je IF titer kultúry ekvivalentný s titrom pozitívnej kontroly.

9.3. **Polymerázová reťazová reakcia (test PCR)**

a) Pripravte suspenziu približne 10^6 buniek na ml v pufri.

b) Zahrejte 100 µl bunkovej suspenzie v uzavretých skúmavkách v zahrievacom bloku alebo vo vriacom vodnom kúpeli pri teplote 100 °C na 4 minúty. Ak je to potrebné, pomôcť môže pridanie čerstvo pripraveného NaOH s konečnou koncentráciou 0,05 M na získanie bunkového lysátu. Vzorky môžete následne uložiť pri teplote –16 až –24 °C, až kým ich nebudete potrebovať.

c) Aplikujte vhodné postupy PCR na amplifikáciu *C. m.* subsp. *sepedonicus specific amplicons* (e. g. Pastrik, 2000; see Appendix 4; Li and de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

d) Pozitívnu identifikáciu *C. m.* subsp. *sepedonicus* dosiahnete, ak majú PCR amplikóny rovnakú veľkosť a to isté skrátenie dĺžky polymorfného fragmentu ako pri pozitívnej kontrole kmeňa.

9.4. **Fluorescenčná hybridizácia in situ (test FISH)**

a) Pripravte suspenziu približne 10^6 buniek na ml v UPW.

b) Použite metódu FISH (oddiel 5).

c) Pozitívny test FISH dosiahnete, ak sa rovnaké reakcie dosiahnú pri kultúre aj pri pozitívnej kontrole.

9.5. **Profilovanie mastných kyselín (FAP)**

a) Kultúru pestujte na tryptikázovom sójovom agare (Oxoid) 72 hodín pri teplote 21 °C.

b) Uskutočnite príslušné postupy FAP (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Pozitívny test FAP dosiahnete, ak je profil predpokladanej kultúry totožný s profilom pozitívnej kontroly. Prítomnosť charakteristických mastných kyselín je 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 a 17:0 Anteiso je vysoko indikačná pre *C. m. sepe-*

▼M1

donicus. Ostatné rody ako *Curtobacterium, Arthrobacter* a *Micrococcus* tiež obsahujú niektoré z týchto kyselín, ale 15:1 Anteiso A je vzácna v týchto baktériách, ale vyskytuje sa vo všetkých *Clavibacter* spp. na úrovni medzi 1 – 5 %. V *C. m. sepedonicus* je hodnota obyčajne okolo 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

a) Pripravte suspenziu približne 10^6 buniek na ml v UPW.

b) Aplikujte tento test podľa daného postupu (Smith *et al.*, 2001)

10. POTVRDZOVACÍ TEST

Test patogenity sa musí vykonať ako konečné potvrdenie diagnózy *C. m.* subsp. *sepedonicus* a pre zhodnotenie virulencie kultúr identifikovaných ako *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.1. Pripravte očkovaciu látku približne z 10^6 buniek na ml z 3-dňových kultúr z izolátu, ktorý sa má testovať, ako aj vhodnú pozitívnu kontrolu kmeňa *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.2. Naočkujte 5 – 10 stoniek baklážanu mladých semenáčov na úrovni listov (oddiel 7.3 alebo 7.4).

10.3. Inkubujte pri teplote 18 – 24 °C pri dostatočnom svelte a relatívne vysokej vlhkosti s dostatočným zavlažovaním, aby sa predišlo strestu z podmokania alebo sucha (oddiel 7.7) U čistých kultúr by sa typické vädnutie malo získať do 2 týždňov, ale rastliny, ktoré nebudú po tomto období preukazovať symptómy (pozri 7.8), by sa mali inkubovať až do 3 týždňov pri teplotách prospievajúcich rastu baklažánov, ale nepresahujúcich teplotu 25 °C (dodatok 8). Ak sa po 3 dňoch príznaky tohto ochorenia neprejavia, kultúra sa nemôže potvrdiť za patogénnu formu *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4. Odstránením izolujte zo symptomických rastlín česť stopky asi 2 cm nad bodom očkovania. Pokračujte a rozptýľte v malom množstve sterilnej destilovanej vody alebo 50 mM fosfátového pufra (dodatok 3). Izolujte od suspenzie nanášaním alebo nanášaním v pruhoch riedenia na MTNA a YPGA (dodatok 5), inkubujte po dobu 3 – 5 dní pri teplote 21 – 23 °C a pozorujte tvorbu kolónií typických pre *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼**M1**

Dodatok 1

Laboratóriá zapojené do optimalizácie a validácie protokolov

Laboratórium ([1])	Miesto	Krajina
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viedeň a Linz	Rakúsko
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgicko
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglicko
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škótsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francúzsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francúzsko
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Nemecko
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Nemecko
State Laboratory	Dublin	Írsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holandsko
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Nórsko
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Nacionalni institut za biologijo	Ľubľana	Slovinsko
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španielsko

([1]) Kontaktní vedeckí odborníci: pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

▼M1

Dodatok 2

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

Vyrobte 72 hodinovú kultúru virulentného kmeňa *C. m.* subsp. *sepedonicus* (NCPPB 4053 alebo PD 406) na základnom médiu SMSA a suspendujte v 10 mM fosforečnanového pufra, aby ste dosiahli bunkovú hustotu približne 2×10^8 cfu na ml. Toto sa obyčajne dosiahne pomocou slabo zakalenej suspenzie, ktorá je ekvivalentná s optickou hustotou 0,20 pri 600 nm.

Odstráňte kužeľovité výrezky pupkových koncov z 200 hľúz pochádzajúcich z produkcie odrody s bielou šupkou, o ktorej vieme, že neobsahuje *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Pupkové konce upravte ako obyčajne a pelet resuspendujeme v 10 ml.

Pripravte 10 sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek s 900 µl resuspendovaného peletu.

Umiestnite 100 µl suspenzie *C. m.* subsp. *sepedonicus* do prvej mikroskúmavky. Pretrepte.

Stanovte desiatkové úrovne kontaminácie pomocou ďalšieho riedenia v ďalších piatich mikroskúmavkách.

Šesť kontaminových mikroskúmaviek použite ako pozitívne kontroly. Štyry nekontaminové mikroskúmavky použite ako negatívne kontroly. Mikroskúmavky príslušne označte.

Pripravte alikvotný podiel 100 µl v sterilných mikroskúmavkách s objemom 1,5 ml a získate tak 9 replík každej kontrolnej vzorky. Uskladnite pri teplote –16 až –24 °C až do použitia.

Prítomnosť a kvantifikácia *C. m.* subsp. *sepedonicus* v kontrolných vzorkách by sa mala najskôr potvrdiť pomocou testu IF.

Pre test PCR uskutočnite extrakciu DNA zo vzoriek pozitívnej a negatívnej kontroly pre každú sériu testovaných vzoriek.

Pre testy IF a FISH uskutočnite skúšky na vzorkách pozitívnej a negatívnej kontroly pre každú sériu testovaných vzoriek.

Pre skúšky IF, FISH a PCR sa *C. m.* subsp. *sepedonicus* musí identifikovať v najmenej 10^6 a 10^4 buniek/ml pozitívnych kontrol a nesmie byť v žiadnej negatívnej kontrole.

▼M1

Dodatok 3

Pufre pre testovacie postupy

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

1. **Pufre pre extrakčný postup**

1.1. *Extrakčný pufer (50 mM fosfátový pufer, pH 7,0)*

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

Na_2HPO_4 (bezvodný)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilovaná voda	1,00 L

Rozpustite prísady, skontrolujte pH a sterilizujte v autokláve pri 121 ° C počas 15 min.

Dodatočné zložky môžu byť užitočné nasledujúcim spôsobom:

	Účel	Množstvo (na L)
vločky Lubrol	antivločkovací prípravok (*)	0,5 g
DC silicone antifoam (protipenový prípravok)	protipenové činidlo (*)	1,0 ml
tetrasodium pyrofosfát	antioxidant	1,0 g
polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP-40)	viazanie inhibítorov PCR	50 g

(*) Na použitie pri homogenizačnej extrakčnej metóde.

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

Tento pufer sa používa pri resuspenzácii a riedení extraktov výrezkov pupkových koncov zemiakových hľúz podľa koncentrácie do peletu pomocou odstreďovania.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
destilovaná voda	1,00 L

Rozpustite prísady, skontrolujte pH a sterilizujte v autokláve pri 121 ° C počas 15 min.

2. **Pufre pre test IF**

2.1. *Pufer IF [10 mM fosfátový pufer NaCl (PBS), pH 7,2]*

Tento pufer sa používa na riedenie protilátok.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda	1,0 L

Rozpustite prísady, skontrolujte pH a sterilizujte v autokláve pri 121 ° C počas 15 min.

2.2. *IF-pufer-tween*

Tento pufer sa používa na umývanie podložných sklíčok.

Pridáme 0,1 % tween 20 do pufra IF.

2.3. *Glycerín pufrovaný fosfátom, pH 7,6*

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

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

▼**M1**

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

▼**M1**

Dodatok 4

Určovanie stupňa kontaminácie pri testoch IF a FISH

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

   $C = c \times S/s$

   kde S = povrchová plocha poľa viacjamkového podložného sklíčka

   s = povrchová plocha poľa objektívu:

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ kde I = koeficient poľa (v rozsahu 8 – 24 v závislosti od optického typu)

   K = tubusový koeficient (1 alebo 1,25)

   G = zväčšenie objektívu (100x, 40x atď.)

3. Vypočítajte počet typických fluoreskujúcich buniek na jeden ml resuspendovaného peletu (N).

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

   kde y = množstvo resuspendovaného peletu na každom poli a

   F = dilučný faktor resuspendovaného peletu.

▼**M1**

Dodatok 5

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

a) *Všeobecné médiá rastu*

živný agar (NA)

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

Rozpustite prísady a sterilizujte v autokláve pri 121 °C počas 15 min.

Živný dextrózový agar (NDA)

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

Kvasnicovo-peptónovo-glukózový agar (YPGA)

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

Rozpustite prísady a sterilizujte v autokláve pri 121 °C počas 15 min.

Kvasnicový výluh s obsahom minerálnych solí (YGM)

kvasnicový extract (Difco)	2,0 g
monohydrát D(+) glukózy	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
Bacto-agar (Difco)	18 g
Destilovaná voda	1,0 L

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

b) *Validované selektívne médiá rastu*

Médium MTNA

Ak sa neuvádza inak, všetky zložky média pochádzajú z BDH

kvasnicový extract (Difco)	2,0 g
manitol	2,5 g
K_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	1,0 L

Rozpustite prísady, ustáľte hodnotu pH na 7,2. Po sterilizovaní v autokláve (pri teplote 121 °C počas 15 minút) a ochlaďte na 50 °C, pridajte antibiotiká: trimetoprim 0,06 g, kyselinu nalidixínovú 0,002 g, amfotericín B 0,01 g.

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

▼**M1**

Poznámka:

Doba použiteľnosti základného média je 3 mesiace. Po pridaní antibiotík je doba trvania použiteľnosti 1 mesiac pri skladovaní v chlade.

Médium NCP-88

živný agar (Difco)	23 g
kvasnicový extract (Difco)	2 g
D-manitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
destilovaná voda	1,0 L

Rozpustite prísady, ustáľte hodnotu pH na 7,2. Po sterilizovaní v autokláve a ochladení na 50 °C pridajte tieto antibiotiká: polymyxín B sulfát (Sigma) 0,003 g, kyselina nalidixínová (Sigma) 0,008 g, Cycloheximid (Sigma) 0,2 g.

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

Poznámka:

Doba použiteľnosti základného média je 3 mesiace. Po pridaní antibiotík je doba trvania použiteľnosti 1 mesiac pri skladovaní v chlade.

▼M1

Dodatok 6

Validované PCR protokoly a činidlá

Poznámka:

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

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

1. **Viacnásobný protokol PCR s internou kontrolou PCR (Pastrik a kol., 2000)**

1.1. *Oligonukleotídne primery*

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

Predpokladaná veľkosť amplikónu z matrice DNA *Clavibacter michiganensis*, subsp. *sepedonicus* = 502 bp (PSA-primer).

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

1.2. *Reakčná zmes PCR*

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
sterilné UPW	15,725 µl	
10x PCR pufer (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP zmes (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
Objem vzorky	5,0 µl	
Celkový objem:	25,0 µl	

(1) Metódy boli validované pomocou *Taq* polymerázy od Perkin Elmer (AmpliTaq) a Gibco BRL.
(2) Koncentrácie primerov NS-7-F a NS-8-R boli optimalizované pre extrakciu výrezkov pupkových koncov zemiakových hľúz pomocou metódy homogenizácie a čistenia DNA podľa Pastrika (2000) (pozri oddiel 6.1.a.). Reoptimalizácia koncentrácií činidiel sa bude vyžadovať, ak sa použije extrakcia potrepaním alebo iné metódy izolácie DNA.

1.3. *Reakčné podmienky PCR*

Spustite nasledujúci program:

1 cyklus:	i)	3 minúty pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA)
10 cyklov:	ii)	1 minúta pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA)
	iii)	1 minúta pri teplote 64 °C (pripájanie primerov)
	iv)	1 minúta pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
25 cyklov:	v)	30 sekúnd pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA)
	vi)	30 sekúnd pri teplote 62 °C (pripájanie primerov)

▼**M1**

	vii)	1 minúta pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
1 cyklus:	viii)	5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
	ix)	držte pri teplote 4 °C

Poznámka:

Tento program je optimalizovaný na použitie s teplotným cyklérom MJ Research PTC 200. Zmena v trvaní krokov cyklov ii), iii), iv), v), vi) a vii) sa môže vyžadovať pri použití iných modelov.

1.4. *Analýza enzýmovej reštrikcie amplikónu.*

Produkty PCR amplifikované z DNA *C.m.* subsp. *sepedonicus* tvoria skrátenie dlĺžky polymorfného fragmentu s enzýmom *Bgl* II po inkubácii pri teplote 37 °C počas 30 minút. Obmedzené fragmenty získané z *C.m.* subsp. *sepedonicus* -špecifického fragmentu majú veľkosť 282 bp ad 220 bp.

2. **Príprava nanášacieho pufra**

2.1. *Bromfenolová modrá (10 %-zásobný roztok)*

bromfenolová modrá	5 g
destilovaná voda (bidest)	50 ml

2.2. *Nanášací pufer*

glycerín (86 %)	3,5 ml
bromfenolová modrá (5,1)	300 µl
destilovaná voda (bidest)	6,2 ml

3. **10x Tris acetát EDTA (TAE) pufer, pH 8,0**

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

Zriedime na 1x pred použitím.

Tiež komerčne dostupný (napr. invitrogén alebo ekvivalent).

▼M1

Dodatok 7

Validované reagenty pre FISH test

1. **Oligopróby**

Cms-špecifická próba CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Nešpecifická eubakteriálna próba EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt -3'

2. **Fixatívny roztok**

[UPOZORNENIE! FIXATÍVUM OBSAHUJE PARAFORMALDEHYD, KTORÝ MÁ TOXICKÉ ÚČINKY. NASAĎTE SI RUKAVICE A NEVDYCHUJTE. ODPORÚČAME PRACOVAŤ V DIGESTORE.]

i) Zahrejte 9 ml vody molekulárneho gradienta (napr. ultra čistá voda (UČW) na teplotu asi 60 °C a pridáme 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd sa rozpúšťa po pridaní 5 kvapiek 1N NaOH a miešaním s magnetickým miešadlom.

ii) Upravte pH na 7,0 pridaním 1 ml 0,1,1M fosfátového puferu (PB; pH 7,0) a 5 kvapiek 1N HCl. Skontrolujte pH pomocou indikačných pásikov a podľa potreby upravte pomocou HCl alebo NaOH.

[UPOZORNENIE! NEPOUŽÍVAJTE PH METER V ROZTOKOCH S PARAFORMALDEHYDOM.]

iii) Roztok prefiltrujte cez 0,22 µm membránový filter, zamedzte prístupu prachu a uložte pri teplote 4 °C na ďalšie použitie.

iv) *Poznámka:*

Alternatívny fixačný roztok: 96 % etanol.

3. **3x Hybmix**

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

Zrieďte na 1x, ako sa vyžaduje.

4. **Hybridizačný roztok**

1x Hybmix

Sódium dodecyl sulfát (SDS)	0,01 %
probe EUB 338	5 ng/µl
próba CMSCY301	5 ng/µl

Pripravte množstvá hybridizačného roztoku na základe výpočtov v tabuľke 1. Pre každé podložné sklíčko (obsahujúce 2 rôzne vzorky dvojmo) treba 90 µl hybridizačného roztoku.

Tabuľka: Navrhované množstvá na prípravu hybridizačnej zmesi.

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

Pozn.: Všetky roztoky, ktoré obsahujú oligopróby citlivé na svetlo, skladujte na tmavom mieste pri teplote –20 °C. Počas používania ich chráňte pred priamym slnečným svetlom a elektrickým svetlom.

5. **0,1M fosforečnanový pufer, pH 7,0**

Na_2HPO_4	8,52 g

▼**M1**

KH_2PO_4	5,44 g
destilovaná voda	1,00 L

Rozpustite prísady, skontrolujte pH a sterilizujte v autokláve pri 121 °C počas 15 min.

▼M1

Dodatok 8

Kultivácia rastlín baklažánu

Osivo baklažánu (*Solanum melongena*) vysejeme do pasterizovaného kompostu. Semenáče s plne vyvinutými klíčnymi listami (10 až 14 dní staré) presaďte do kvetináčov s pasterizovaným kompostom.

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

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

Vnímavé odrody baklažánu:
- „Black Beauty”
- „Long Tom”
- „Rima”
- „Balsas”

Dodávateľ: pozri webovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Dodatok 9

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

Roztok kryštálovej violete

V 20 ml 95 %-ného etanolu rozpustíme 2 g kryštálovej violety.

V 80 ml destilovanej vody rozpustíme 0,8 g oxalátu amónneho.

Obidva roztoky zmiešame.

Jódová tinktúra podľa Lugola

jód	1 g
jodid draselný	2 g
destilovaná voda	300 ml

Obidve pevné chemikálie zmiešame, spolu ich rozotrieme v trecej miske. Pridáme do destilovanej vody, nádobu uzavrieme a premiešame.

Safranínový odfarbovací roztok

Zásobný roztok:

safranín O	2,5 g
95 % etanol	100 ml

Zmes premiešame a odložíme.

Zriedime v pomere 1:10 na pracovnú koncentráciu.

Postup pri farbení

1. Pripravíme si rozter, fixujeme ho sušením na vzduchu a teplom.
2. Podložné sklíčko zalejeme roztokom kryštálovej violete na 1 minútu.
3. Krátko umývame pod tečúcou vodou z vodovodu.
4. Na minútu zalejeme jódovou tinktúrou podľa Lugola.
5. Opäť omyjeme pod tečúcou vodou a osušíme pijavým papierom.
6. Odfarbujeme buď kvapkaním 95 %-ného etanolu až dovtedy, kým sa nevylučuje farbivo, alebo ponorením a miernym miešaním v ňom po dobu 30 sekúnd.
7. Omyjeme pod tečúcou vodou a osušíme pijavým papierom.
8. Zalejeme na 10 sekúnd safranínom.
9. Opäť omyjeme pod tečúcou vodou a osušíme pijavým papierom.

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

BIOBLIOGRAGIA

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicus* 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 sepedonicus* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and 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]) Tiež možno použiť komerčne dostupné roztoky a farbiace sady.

▼**M1**

7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicus*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.

8. Jansing, H. and 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 and 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 and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

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

14. Li, X. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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**

PRÍLOHA II

1. V prípade každého podozrivého výskytu získaného z výsledkov skríningového testu, vykonaného podľa postupu v prílohe I, pri ktorých sa očakáva potvrdenie alebo vyvrátenie tvrdenia po dokončení postupu, mali by sa uchovať alebo primerane zakonzervovať:

   — všetky hľuzy zemiakov a v možných prípadoch, všetky testované rastliny,

   — všetky zostávajúce extrakty a dodatočný pripravený materiál pre skríningový(é) test(y) napr. imunofluorescentné sklíčka,

   a

   — celá príslušná dokumentácia,

   až kým sa tento postup neukončí.

   Zadržanie zemiakových hľúz umožní v potrebných prípadoch uskutočniť rôzne testy.

2. V prípade pozitívneho potvrdenia tohto organizmu by sa mali zadržať alebo primeraným spôsobom zachovať:

   — materiály uvedené v odseku 1,

   — vzorka infikovaných rastlín baklažánu naočkovaných extraktom z hľúz alebo rastlín,

   a

   — izolované kultúry tohto organizmu

   najneskôr do jedného mesiaca po uplynutí oznamovaného obdobia podľa článku 5 ods. 2.

▼**M1**

PRÍLOHA III

1. Pri stanovení pravdepodobného rozsahu kontaminácie podľa článku 5 ods. 1 písm. b) by sa mali zvážiť nasledujúce prvky:

   — hľuzy a rastliny pestované na mieste produkcie označenom v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) za kontaminované,

   — miesta produkcie, výrobným spôsobom spojené s hľuzami alebo rastlinami, označenými v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) za kontaminované vrátane tých, ktoré s nimi užívajú spoločnú mechanizáciu alebo výrobné zariadenia, a to buď priamo, alebo prostredníctvom spoločného dodávateľa,

   — hľuzy alebo rastliny vypestované v miestach produkcie spomenutých v predchádzajúcej zarážke alebo nachádzajúce sa na takýchto miestach produkcie v období, keď sa na miestach produkcie uvedených v prvej zarážke nachádzali hľuzy alebo rastliny označené v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) za kontaminované,

   — priestory, v ktorých dochádza k manipulácii so zemiakmi z vyššie spomenutých miest produkcie,

   — všetky strojové zariadenia, vozidlá, lode, skladovacie priestory alebo ich časti a akékoľvek iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré mohli prísť do styku s hľuzami alebo rastlinami, ktoré boli podľa článku 5 ods. 1 písm. a) označené za kontaminované,

   — akékoľvek hľuzy alebo rastliny, ktoré sa skladovali alebo sa dostali do styku so stavbami alebo predmetmi uvedenými v predchádzajúcej zarážke, a to pred ich vyčistením alebo dezinfekciou,

   — v dôsledku testov podľa článku 6 tie hľuzy alebo rastliny, ktoré majú súrodenecký alebo rodičovský klonový vzťah k hľuzám alebo rastlinám, ktoré boli podľa článku 5 ods. 1 písm. a) označené za kontaminované a pri ktorých sa i v prípade negatívneho výsledku skúmania prítomnosti organizmu na základe klonovej príbuznosti kontaminácia zdá byť pravdepodobnou. Testovanie odrôd sa môže uskutočniť, aby sa overila zhodnosť kontaminovaných alebo klonovo príbuzných hľúz alebo rastlín,

   — miesto(a) produkcie uvedeného rastlinného materiálu, ktorý sa spomína v predchádzajúcej zarážke,

2. Pri stanovení pravdepodobného rozšírenia podľa článku 5 ods. 1 písm. c) by sa mali zvážiť nasledujúce prvky:

   — blízkosť iných miest produkcie, v ktorých sa pestujú zemiaky alebo iné hostiteľské rastliny,

   — bežná produkcia a použitie porastov sadivových zemiakov.

3. Podrobnosti oznámenia uvedeného v prvom pododseku článku 5 ods. 2 musia byť poskytnuté takto:

   — okamžite po potvrdení prítomnosti organizmu laboratórnymi testami pomocou metód uvedených v prílohe I, minimálne:

      — názov odrody danej partie,

      — typ (sadivové, konzumné atď.) a v potrebnom prípade kategória sadivových zemiakov,

   — v prípade rizika kontaminácie zemiakov pochádzajúcich z iného členského štátu/štátov alebo dovozu do iného/iných členských štátov, kde sa potvrdil výskyt, príslušné členské štáty bezodkladne informujú Komisiu v nevyhnutnej záležitosti tak, aby sa dosiahol súlad s článkom 5 ods. 3, ako napr.

      — názov odrody danej partie,

      — názov a adresa odosielateľa a príjemcu,

      — dátum doručenia partie zemiakov,

      — objem doručenej partie zemiakov,

      — kópia pasu rastlinného materiálu alebo v potrebnom prípade minimálne číslo pasu rastlinného materiálu a v potrebnom prípade registračné číslo pestovateľa alebo obchodníka a kópia oznámenia o doručení.

   Komisia bude informovaná ihneď potom, ako budú tieto informácie poskytnuté.

   — Po ukončení všetkých vyšetrovaní pre každý prípad:

      — dátum, kedy sa kontaminácia potvrdila,

      — stručný opis vyšetrovania, ktoré prebehlo s cieľom určiť zdroj a možné rozšírenie kontaminácie, vrátane uskutočnenej úrovni odberu vzoriek

      — informácie o zistených alebo predpokladaných zdrojoch kontaminácie,

▼**M1**

— podrobné informácie o rozsahu označenej kontaminácie, vrátane počtu miest produkcie a pri zemiakoch počtu partií s označením odrody a pri sadivových zemiakoch, kategória,

— podrobné informácie o bezpečnostnom pásme, vrátane počtu miest výroby, ktoré neboli označené za kontaminované, ale ktoré sú zahrnuté v pásme,

— iné údaje týkajúce sa potvrdeného výskytu škodlivého organizmu, ktoré môže Komisia požadovať.

▼**M1**

PRÍLOHA IV

1. Opatrenia uvedené v článku 7 ods. 1, vykonané pod úradným dozorom, musia obsahovať:

— použitie ako krmivo pre zvieratá po tepelnom spracovaní, ktoré vylučuje nebezpečenstvo prežitia škodlivého organizmu,

alebo

— likvidácia na úradne schválených miestach, pri ktorých neexistuje zistiteľné žiadne riziko úniku patogénov do prostredia napr. prostredníctvom priesaku na poľnohospodársky využívané plochy,

alebo

— spálenie,

alebo

— priemyselné spracovanie, a to priamou a bezprostrednou dodávkou spracovateľskému závodu vybavenému úradne schválenými zariadeniami odpadového hospodárstva, pre ktoré sa stanovilo, že neexistuje žiadne rozpoznateľné riziko šírenia tohto organizmu, a ktoré je vybavené systémom čistenia a dezinfekcie minimálne odvozových vozidiel,

alebo

— iné opatrenia, ak preukázateľne neexistuje žiadne rozpoznateľné riziko šírenia škodlivého organizmu; takéto opatrenia a ich odôvodnenie sa bezodkladne oznámi Komisii a ostatným členským štátom.

Akýkoľvek ostávajúci odpad, ktorý má súvislosť s uvedenými faktami alebo vzniká na ich základe, sa likviduje prostredníctvom úradne schválených metód v súlade s prílohou V k tejto smernici.

2. Za vhodné využitie alebo zneškodnenie uvedených hľúz a rastlín, ktoré boli podľa článku 5 ods. 1 písm. a) označené za kontaminované, podľa článku 7 ods. 2 pod dohľadom zodpovedných orgánov príslušných členských štátov pri vzájomnom informovaní zodpovedných orgánov s cieľom zabezpečiť takýto dohľad v ktoromkoľvek okamihu a so súhlasom zodpovedného orgánu členského štátu, v ktorom sa zemiaky majú baliť alebo spracovávať v zariadeniach na zneškodňovanie odpadu uvedených v prvej a druhej zarážke, sa považuje:

— použitie ako konzumných zemiakov pestovaných pre konzumáciu, už zabalených na priame doručenie a použitie bez opätovného balenia, v mieste s vhodným zariadením odpadového hospodárstva. So zemiakmi pestovanými na sadbu sa môže manipulovať len na rovnakom mieste, ak sa tak robí oddelene alebo po čistení a dezinfekcii,

alebo

— použitie konzumných zemiakov na priemyselné spracovanie a ich určenie na priame a bezprostredné dodanie spracovateľskému závodu vybavenému vhodnými zariadeniami odpadového hospodárstva a systémom čistenia a dezinfekcie minimálne odchádzajúcich vozidiel,

alebo

— iné využitie alebo zneškodnenie, ak preukázateľne neexistuje žiadne rozpoznateľné riziko šírenia škodlivého organizmu a po schválení uvedenými zodpovednými orgánmi.

3. Pod primeraným postupom čistenia a dezinfekcie predmetov, ktoré sa uvádzajú v článku 7 ods. 3, sa rozumie ten, pre ktorý je stanovené, že neexistuje identifikovateľné riziko šírenia tohto organizmu a že sa použije pod dohľadom zodpovedných úradných orgánov členského štátu Spoločenstva.

4. Do radu opatrení, ktoré majú vykonať členské štáty Spoločenstva v rámci bezpečnostného pásma vyznačeného v zmysle článku 5 ods. 1 písm. c), o ktorom pojednáva článok 7 ods. 4, je zahrnuté nasledujúce:

4.1. na miestach produkcie označených v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) za kontaminované:

a) na poli označenom v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) za kontaminované, buď:

i) — v priebehu najmenej troch rokov pestovania po roku označenej kontaminácie,

▼M1

— sa musia prijať opatrenia na elimináciu samovysadených zemiakových rastlín a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu,

a

— nesmú sa vysádzať žiadne hľuzy, rastliny a pravé semená zemiaka alebo iné, prirodzene sa vyskytujúce hostiteľské rastliny tohto organizmu alebo plodín, pri ktorých existuje identifikované riziko šírenia tohto organizmu,

— v prvom vegetačnom období zemiakov nasledujúcom po období upresnenom v predchádzajúcej zarážke a pod podmienkou, že pole bolo bez rastlín zemiakov vyrastených zo samovýsadby/samovýsevu, ako i bez iných hostiteľských rastlín počas úradných inšpekcií počas najmenej dvoch po sebe nasledujúcich pestovateľských rokov pred zasadením, povoľuje sa len produkcia konzumných zemiakov a zozbierané hľuzy sa budú testovať podľa postupu podrobne opísaného v prílohe I,

— vo vegetačnom období zemiakov nasledujúcom po vegetačnom období uvedenom v predchádzajúcej zarážke a pri dodržaní vhodného osevného cyklu, ktorý je aspoň dva roky, ak sa majú vypestovať sadivové zemiaky, zemiaky sa môžu pestovať buď len s cieľom produkcie sadivových zemiakov, alebo produkcie konzumných zemiakov a vykoná sa úradný prieskum podľa podrobných ustanovení v článku 2 ods. 1; alebo

ii) — počas štyroch pestovateľských rokov nasledujúcich po roku označenia pozemkov za kontaminované,

— sa musia prijať opatrenia na likvidáciu samovysadených zemiakových rastlín a iných, prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu,

a

— pole sa musí ponechať či udržiavať úhorom alebo ako trvalý pasienok s častou nízkou kosbou, alebo intenzívnym spásaním

— v prvom vegetačnom období zemiakov nasledujúcom po období upresnenom v predchádzajúcej zarážke a pod podmienkou, že pole bolo bez rastlín zemiakov vyrastených zo samovýsadby/samovýsevu, ako i bez iných prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín počas úradných inšpekcií počas najmenej dvoch po sebe nasledujúcich pestovateľských rokov pred zasadením, povoľuje sa produkcia sadivových alebo konzumných zemiakov a zozbierané hľuzy sa budú testovať podľa postupu podrobne opísaného v prílohe I;

b) na všetkých ďalších poliach s kontaminovaným miestom produkcie a pod podmienkou, že zodpovedné úradné orgány súhlasia s tým, že riziko samovysadených rastlín zemiaka a ďalších prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu bolo eliminované:

— v pestovateľskom roku, ktorý nasleduje po roku, keď bola označená kontaminácia, žiadne zemiakové hľuzy alebo pravé semená zemiaka alebo iné hostiteľské rastliny daného organizmu sa nezasadania, alebo

— certifikované sadivové zemiaky sa môžu sadiť len pre konzumnú spotrebu,

— v druhom pestovateľskom roku, ktorý nasleduje po roku, keď bola označená kontaminácia, len úradne potvrdené sadivové zemiaky, ktoré boli úradne testované na neprítomnosť latentnej krúžkovitosti a pestované pod úradnou kontrolou na miestach produkcie iných, ako tie, ktoré sa uvádzajú v bode 4.1, sa budú sadiť buď na produkciu sadivových, alebo konzumných zemiakov,

— v minimálne treťom pestovateľskom roku, ktorý nasleduje po roku, keď bola označená kontaminácia, len potvrdené sadivové zemiaky alebo sadivové zemiaky pestované pod kontrolou z úradne certifikovaných sadivových zemiakov, sa budú sadiť buď na produkciu sadivových, alebo konzumných zemiakov,

— v každom pestovateľskom roku, ktorý sa uvádza v predchádzajúcich zarážkach, sa prijmú opatrenia na elimináciu prípadne sa vyskytujúcich samovysadených rastlín zemiaka alebo iných prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín

▼M1

organizmov a na každom zemiakovom poli sa uskutoční úradné testovanie úrody zemiakov v súlade s postupom podrobne uvedeným v prílohe I;

c) bezprostredne po označenej kontaminácii v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) a po prvom nasledujúcom pestovateľskom roku sa všetka mechanizácia a skladovacie priestory v mieste produkcie a v jeho rámci zapojené do výroby zemiakov musia vyčistiť a vydezinfikovať podľa potreby pomocou primeraných metód, ako sa uvádza v odseku 3;

d) v jednotke chránenej rastlinnej produkcie, pri ktorej je možná úplná výmena pestovateľského substrátu,

— sa nesmú vysádzať žiadne hľuzy, rastliny alebo semená, okrem prípadu, že sa výrobná jednotka podrobila pod úradným dohľadom vykonaným opatreniam eliminácie tohto organizmu a odstránenia akéhokoľvek hostiteľského rastlinného materiálu, vrátane aspoň úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a dezinfekcie výrobnej jednotky a všetkého vybavenia, a že tejto výrobnej jednotke bol zo strany zodpovedných úradných orgánov udelený súhlas na pestovanie zemiakov,

a

— produkcia zemiakov sa musí uskutočňovať z uznanej zemiakovej sadby alebo z minihľúz, príp. minirastlín pochádzajúcich z testovaných zdrojov.

4.2. V rámci vyznačeného bezpečnostného pásma, bez toho, aby boli dotknuté opatrenia podrobne opísané v odseku 4.1, sú členské štáty povinné:

a) ihneď po označení kontaminácie zabezpečiť vyčistenie a vydezinfikovanie, podľa potreby, všetky stroje a skladovacie priestory a také, ktoré sú spojené s výrobou, a použiť príslušné metódy, ako sa uvádza v bode 3;

b) bezprostredne po označenej kontaminácii a v priebehu najmenej troch vegetačných období po nej nasledujúcich:

— zabezpečiť zo strany svojich zodpovedných úradných orgánov dozor nad podnikmi pestujúcimi zemiaky a skladujúcimi zemiakové hľuzy a manipulujúcimi s nimi, ako aj podnikmi poskytujúcimi zemiakársku mechanizáciu dodávateľským spôsobom,

— vyžadovať, aby v takomto bezpečnostnom pásme boli všetky porasty zemiakov vysádzané výlučne z úradne certifikovaného sadiva alebo aby bolo používané sadivo vypestované pod úradným dozorom a aby sadivové zemiaky, ktoré boli pestované na miestach produkcie, ktoré boli podľa článku 5 ods. 1 písm. b) označené za pravdepodobne napadnuté, boli po zbere testované,

— požadovať osobitnú manipuláciu s uskladnenými sadivovými zemiakmi a konzumnými zemiakmi vo všetkých priestoroch v rámci pásma alebo systém čistenia a dezinfekciu, ktorá sa uskutoční medzi manipuláciou so sadivovými a konzumnými skladovanými zemiakmi,

— v zmysle článku 2 ods. 1 vykonávať úradné prieskumy,

c) v priebehu primeraného obdobia a podľa potreby zaviesť program výmeny všetkého zemiakového sadivového materiálu.

▼**M1**

PRÍLOHA V

Úradne schválené metódy likvidácie odpadu uvedené v prílohe IV ods. 1 musia spĺňať nasledujúce ustanovenia, aby sa predišlo akémukoľvek zistiteľnému riziku šírenia organizmu:

i) Zemiakový odpad (vrátane vyradených zemiakov a zemiakových šupiek) a iný pevný odpad súvisiaci so zemiakmi (vrátane pôdy, kameňov a iného odpadového materiálu) sa odstráni takto:

— likvidáciou na úradne schválených miestach určených na likvidáciu odpadu, pri ktorých neexistuje žiadne zistiteľné riziko úniku organizmov do prostredia, napr. presakovaním do poľnohospodárskej pôdy. Odpad sa musí premiestniť priamo na miesto určené na likvidáciu odpadov, pričom sa musí kontrolovať, aby nevzniklo riziko straty odpadu,

alebo

— spálením,

alebo

— prostredníctvom iných opatrení za predpokladu, že neexistuje žiadne zistiteľné riziko rozšírenia organizmu, tieto opatrenia treba oznámiť Komisii a ostatným členským štátom.

ii) Tekutý odpad: pred likvidáciou sa musí tekutý odpad obsahujúci rozptýlené pevné častice prefiltrovať alebo sedimentovať, aby sa odstránili tieto pevné častice. Tieto pevné častice sa zlikvidujú tak, ako sa stanovuje v pododseku i).

Tekutý odpad treba buď:

— zahriať na minimum 60 °C po dobu 30 minút, celý jeho obsah, predtým, ako sa zlikviduje,

alebo

— zlikvidovať iným spôsobom, ktorý je úradne schválený a pod úradnou kontrolou, aby nevzniklo žiadne zistiteľné riziko, že by odpad mohol prísť do styku s poľnohospodárskou pôdou. Súvisiace podrobnosti sa musia oznámiť členským štátom a Komisii.

Možnosti opísané v tejto prílohe sa uplatňujú aj na odpad spojený s manipuláciou, odstraňovaním alebo spracovaním kontaminovaných partií.