

Diagnostyka
Diagnostic

PM 7/20(2)* *Erwinia amylovora*

Zakres

Standard ten opisuje protokół diagnostyczny dla bakterii *Erwinia amylovora*¹.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Standard ten powstał w ramach projektu EU DIAGPRO Project (SMT 4-CT98-2252) oraz EUPHRESO projekt sterujący (ERWINDECT) przy współudziale współpracujących laboratoriów. Przeprowadzone testy zostały wykonane przez różne laboratoria w latach: 2002, 2009 i 2010.

Zatwierdzony jako Standard EPPO w 2003-09. Rewizja przyjęta w 2012-09.

Wprowadzenie

Erwinia amylovora jest czynnikiem sprawczym zarazy ogniowej dla wielu gatunków podrodziny *Maloideae* rodziny *Rosaceae*. Najważniejszymi z punktu widzenia ekonomicznego roślinami żywicielskimi są: *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Cydonia* spp., *Eriobotrya japonica*, *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Pyracantha* spp. i *Sorbus* spp. Pozostałe rośliny żywicielskie to: *Chaenomeles*, *Mespilus* oraz *Photinia*. Forma specjalna została opisana dla *Rubus* spp. (Starr *et al.*, 1951; Bradbury, 1986). Wyczerpująca lista porażanych roślin łącznie z roślinami wykazującymi wrażliwość w wyniku inokulacji została opublikowana przez van der Zwet i Keil (1979). Zawiera ona ponad 180 gatunków z 39 rodzajów *Rosaceae*. *E. amylovora* jest pierwszą z bakterii, która została opisana przez Burrill (1883) jako czynnik wywołujący chorobę roślin. Doniesienie pochodziło z Ameryki Północnej, a następnie wykrycie potwierdzono również w 1920 roku w Nowej Zelandii. W Europie zarazę ogniową odnotowano po raz pierwszy w 1957 roku w Wielkiej Brytanii i od tego czasu była identyfikowana na większości terenów gdzie były uprawy wrażliwych roślin żywicielskich. W chwili obecnej *E. amylovora* jest obecna w więcej niż czterdziestu krajach (van der Zwet, 2002; CABI/EPPO, 2007), lecz nie została jeszcze odnotowana w Ameryce Południowej, Azji lub w krajach Afryki (Sahara). Natomiast została odnotowana w niektórych krajach Afryki Północnej i tylko raz w Australii (Bonn i van der Zwet, 2000). Oznacza to niebezpieczeństwo dla przemysłu owocowego we wszystkich krajach. Szczegóły dotyczące rozprzestrzenienia

¹Nazwy użytych w tym Standardzie EPPO odczynników lub wyposażenia nie wykluczają zastosowania innych, które również mogą być odpowiednie.

* Numer protokołu został poprawiony elektronicznie 25 kwietnia 2013r.

geograficznego można znaleźć za pomocą systemu wyszukiwania EPPO Plant Quarantine (PQR, 2012).

Zaraza ogniowa jest w wielu krajach prawdopodobnie najpoważniejszą chorobą atakującą uprawy *Pyrus* spp (grusze) oraz *Malus* spp (jabłonie). Pomimo tego, że cykl rozwojowy bakterii nie jest nadal w pełni poznany, wiadomo, że bakteria może przeżyć jako endofit lub epifit przez zmienny okres czasu w zależności od czynników środowiskowych (Thomson, 2000). Rozwój objawów chorobowych powodowanych przez zarazę ogniową jest związany z sezonowym wzrostem rośliny żywicielskiej. Rozpoczyna się wiosną produkcją pierwotnego inokulum i infekcją kwiatów, następnie latem następuje infekcja gałązek i owoców, a na koniec jesienią rozwijają się zrakowacenia. Patogen jest w stanie uśpienia w okresie spoczynku rośliny żywicielskiej (van der Zwet i Beer, 1995).

Schemat blokowy przedstawiony na ryc. 1 i 2 opisuje procedurę diagnostyczną dla bakterii *E. amylovora* w przypadku materiału roślinnego wykazującego objawy chorobowe i nie wykazującego objawów chorobowych.

Tożsamość

Nazwa: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*

Synonimy: *Micrococcus amylovorus* Burrill

Bacillus amylovorus (Burrill) Trevisan

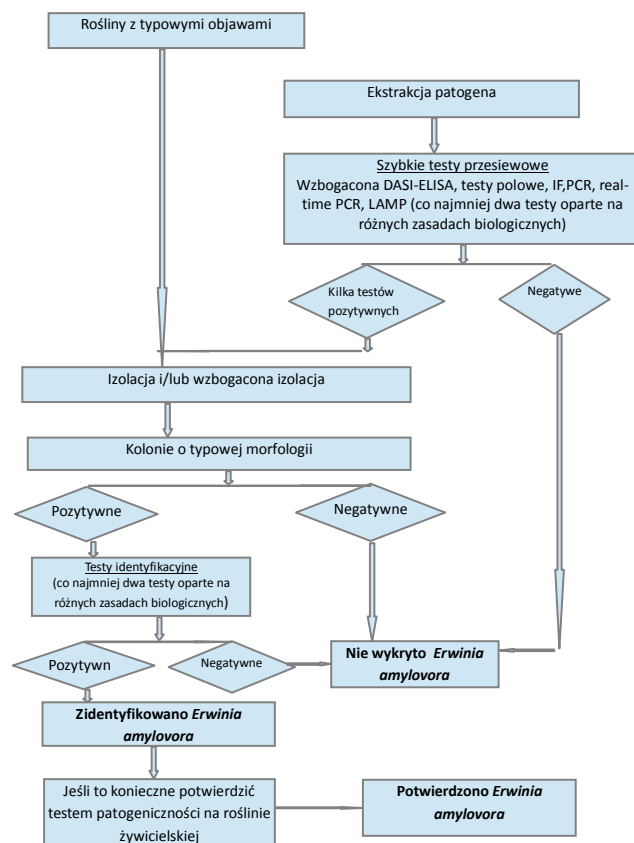
Bacterium amylovorus (Burrill) Chester

Erwinia amylovora f.sp. *rubi* Starr, Cardona i Falson

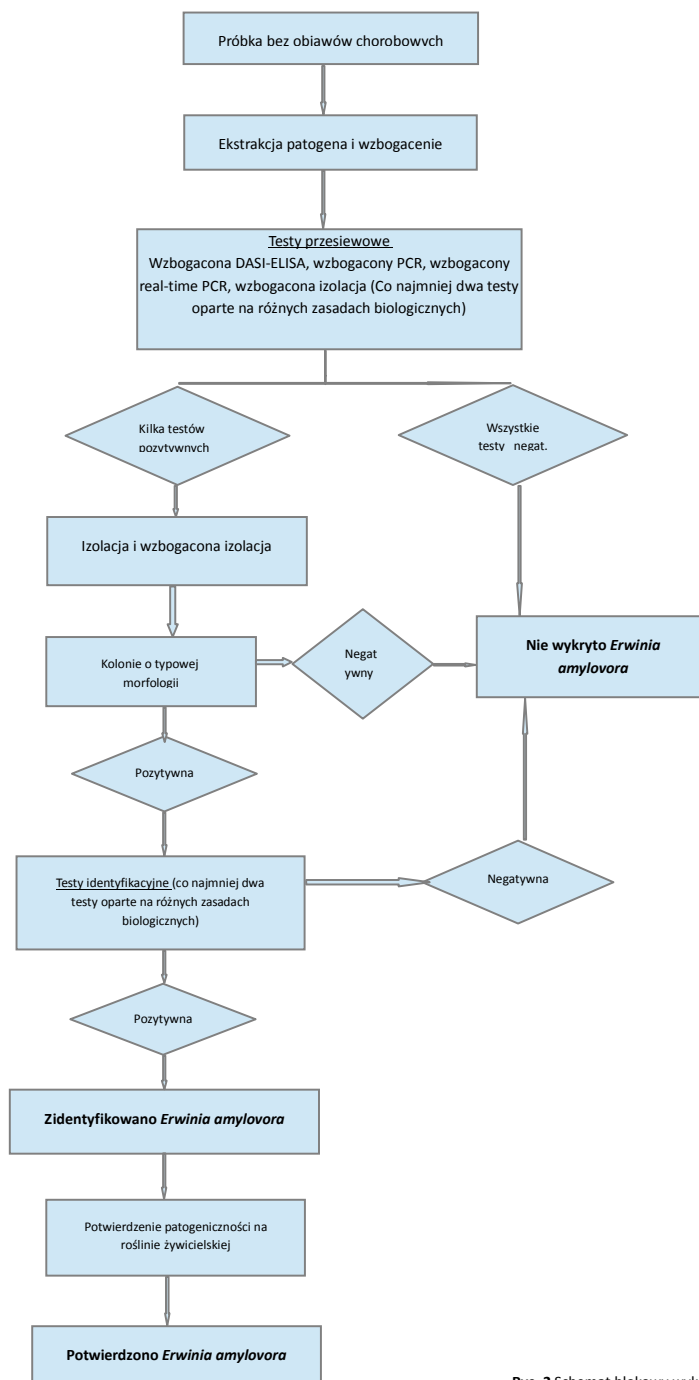
Pozycja taksonomiczna: Bacteria, Proteobacteria, Subdivision, *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*

Kod komputerowy EPPO: ERWIAM

Klasyfikacja fitosanitarna: EPPO A2 list no. 52, EU opis w załączniku II/A2



Ryc. 1 Schemat blokowy wykrywania zarazy ogniowej w roślinach wykazujących objawy chorobowe.



Ryc. 2 Schemat blokowy wykrywania zarazy ogniowej w roślinach nie wykazujących objawów chorobowych.

Wykrywanie

Objawy chorobowe

Objawy chorobowe powodowane przez zarazę ogniową, występujące na głównych roślinach żywicielskich są stosunkowo podobne i łatwe do rozpoznania (ryc. 3, 4 i 5). Nazwa choroby pochodzi od najbardziej charakterystycznych cech: aspektu brązowienia gałązek, kwiatów i liści, które wyglądają jak spalone ogniem. Typowe objawy chorobowe na drzewkach owocowych to objawy od brązowienia do czernienia liści na zaatakowanych gałęziach, produkcja wycieków w warunkach wilgotności i typowe pastorałowe zwijanie się gałązek. W zależności od części zaatakowanej rośliny choroba może powodować zarazę kwiatów, pędów lub gałązek, liści, owoców, konarów i pni, a także zrazów lub podkładek (van der Zwet i Keil, 1979; van der Zwet i Beer, 1995).

W przypadku jabłoni i grusz pierwsze objawy zwykle pojawiają się wczesną wiosną, kiedy pogoda jest ciepła i wilgotna i bardzo szybko rozprzestrzeniają się w sprzyjających warunkach. Kwiaty wyglądają jakby były nasiąknięte wodą, następnie więdną, zasychają i zmieniają kolor z blado brązowego na czarny. Ogonki mogą również wyglądać jakby były nasiąknięte wodą, stają się ciemnozielone, a w ostateczności brązowe lub czarne, czasem mogą pojawiać się wycieki kropli lepkiego śluzu bakteryjnego. W większości roślin żywicielskich liście więdną, zasychają i zwijają stając się brązowe lub ciemnobrązowe do czarnych w przypadku grusz, pozostając przez jakiś czas na drzewach. Zainfekowane części niedojrzałych owoców (rzadziej owoców dojrzałych) wyglądają jakby były tłuste lub nasiąknięte wodą, stają się brązowe do czarnych i często wykazują wycieki śluzu bakteryjnego. Owoce te również pozostają na drzewie. W przypadku gdy zostanie zdjęta kora z zainfekowanych gałązek, gałęzi lub konarów można często znaleźć charakterystyczne czerwobrązowe pasma tkanki podkorowej (van der Zwet i Keil, 1979). Jesienią i zimą mogą rozwijać się na korze pędów lub gałęzi a nawet pni lekko wklęsłe brązowe do czarnych zrakowacenia. Zrakowacenia te mogą później stać się widoczne jako spękania na granicy tkani zdrowej i chorej (Dye, 1983).

Pomylenie objawów powodowanych przez zarazę ogniową z objawami powodowanymi zamieraniem lub poparzeniem szczególnie w przypadku kwiatostanów lub gałązek może być spowodowane podobieństwem do infekcji wywołanej przez inne bakterie, grzyby, uszkodzenia powodowane przez szkodniki lub zaburzenia fizjologiczne dlatego zawsze konieczna jest analiza laboratoryjna. Objawy podobne do powodowanych przez zarazę ogniową mogą powodować inne bakterie, takie jak: *E. pyrifoliae*, czynnik sprawczy zamierania bakteryjnego pędów *Pyrus pyrifolia* (gruszka Azjatycka) (Kim *et al.*, 1999), *Erwinia piriflorinigrans* wyizolowana z zamierających kwiatów gruszy w Hiszpanii (López *et al.*, 2011), *Erwinia* sp. i *E. uzenensis*, które powodują różne rodzaje objawów na gruszach w Japonii (Tani *et al.*, 1981; Matsuura *et al.*, 2012) oraz *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* czynnik sprawczy zamierania kwiatów.



Ryc. 3 Objawy zarazy ogniowej na drzewach gruszy. (A) nekrozy kwiatów; (B) nekrozy liści i typowy kształt pastorału; (C) zmumifikowane niedojrzałe owoce z małymi kroplami śluzu bakteryjnego; (D) zrakowacenie ukazujące po usunięciu kory wewnętrznej tkankę nekrotyczną.



Ryc.4 Typowe objawy zarazy ogniowej na: (A) gałęziach gruszy; (B) pędach jabłoni; (C) pędach pigwy; (D) pędach nieśpłika japońskiego.



Ryc. 5 Typowe objawy zarazy ogniowej na: (A) pędach *Crataegus sp.*; (B) pędach *Cotoneaster sp.*; (C,D) gałęziach *Pyracantha sp.*.

Wykrywanie bakterii w próbkach wykazujących objawy chorobowe

Próbkobranie

Pobieranie próbek z objawami można przeprowadzić pojedynczo lub w małych pakietach zawierających materiał pochodzący z kilku próbek (patrz Załącznik 1). Należy unikać możliwości kontaminacji w czasie pobierania próbek oraz podczas procesu ekstrakcji. Próbki wykazujące objawy przeznaczone do badań pod kątem obecności zarazy ogniowej najlepiej gdy będą zawierały kwiaty, pędy lub gałązki, liście, zawiązki (jeśli to możliwe z nekrozami i z wyciekami) lub przebarwioną tkankę podkorową (po okorowaniu ze zrakowaceń na gałęziach, gałązkach, pniach lub podkładkach). Próbki należy poddać badaniu tak szybko jak to jest możliwe po pobraniu i przechowywać przed badaniem w temperaturze 4– 8 °C. Próbki należy przechowywać w zimnie po badaniu do dwóch tygodni w razie konieczności wykonania dalszych badań.

Izolacja

W celu wykonania właściwej izolacji należy użyć świeży ekstrakt próbki. Szczegółowa procedura ekstrakcji z materiału roślinnego została przedstawiona w Załączniku 1. Szczegóły dotyczące izolacji przedstawiono w Załączniku 5. Izolacja bakterii *E. amylovora* z próbek

wykazujących objawy chorobowe jest stosunkowo prosta ponieważ ilość bakterii tworzących kolonie w takich próbkach jest zwykle duża. Jednakże w przypadku gdy objawy chorobowe są w stadium zaawansowanym lub gdy warunki otoczenia nie są dogodne dla rozwoju objawów zarazy ogniowej, ilość komórek bakterii *E. amylovora* tworzących kolonie jest bardzo mała. W przypadku gdy płytki z posiewem będą przepełnione przez mikroorganizmy roślinne należy powtórzyć badanie danej próbki poprzez jej wzbogacenie zgodnie z Załącznikiem 4, które należy wykonać przed izolacją zgodnie z opisem w Załączniku 5. Wzbogacenie jest również zalecane gdy podejrzewa się obecność w próbce bakterii antagonistycznych.

W przypadku izolacji bezpośredniej zaleca się wykonanie posiewu na trzy podłoża dla maksymalnego zwiększenia wykrycia bakterii *E. amylovora* szczególnie w przypadku gdy próbki są w złym stanie. Efektywność działania poszczególnych podłoży zależy od ilości i składu mikroorganizmów w próbce. Trzy podłoża: King B, Levan oraz CCT (Załącznik 2) zostały zwalidowane podczas badań. Rycina nr 6 pokazuje typowe cechy kultur bakterii *E. amylovora* na trzech podłożach.



Ryc. 6 Kolonie o typowej dla bakterii *E. amylovora* morfologii na podłożu: (A) King B; (B) levan (NSA) i (C) CCT.

Szybkie testy przesiewowe

Testy te ułatwiają dokonanie wstępnej diagnozy w przypadku próbek wykazujących objawy chorobowe, w których stwierdzono obecność bakterii w ilości 10^5 - 10^6 komórek tworzących kolonie/g, (jest to minimalna ilość bakterii, która zwykle obecna jest w próbkach wykazujących objawy chorobowe). Poszczególne testy zostały opisane w Załącznikach 3 do 14. Należy wykonać co najmniej dwa testy oparte na różnych zasadach biologicznych. Jeden z testów może być testem serologicznym wykonany z użyciem specyficznych przeciwciał monoklonalnych, a drugi z testów może być oparty o PCR. Zostały wykonane badania, które to potwierdziły. Ponieważ w toku wykonywania badań zaobserwowano różnice w zakresie czułości analitycznej badań decyzja dotycząca wyboru testu powinna opierać się na analizie porównawczej czułości i specyficzności różnych technik w różnych laboratoriach, liczbie próbek badanych itd.

Na obszarach gdzie choroba ta jest endemiczną badanie próbek należy wykonać bez dalszego potwierdzania w badaniach rutynowych.

- Testy serologiczne

Immunofluorescencja pośrednia (IF), wzbogacona DASI-ELISA, oraz dalsze analizy zostały opisane dla organów wykazujących objawy porażenia. Punktem krytycznym dla przeprowadzenia tych testów jest jakość zastosowanych przeciwciał. W wyniku przeprowadzonych badań porównano wiele dostępnych w handlu surowic oraz przeciwciał monoklonalnych do testu IF (przeciwciała monoklonalne firm: Loewe, Biochemica GmbH, Sauerlach, Niemcy oraz przeciwciała monoklonalne firmy Plant Print Diagnostics S. L., Hiszpania). W przypadku testu ELISA przebadano gotowy zestaw oparty na połączeniu specyficznych przeciwciał monoklonalnych firmy Plant Print Diagnostics S. L., Hiszpania.

W celu szybkiego przebadania materiału wykazującego objawy chorobowe można użyć dostępnych w handlu dwóch zestawów testów polowych: jeden z nich produkowany jest przez firmę Bioreba, Reinach, Szwajcaria (Ea AgriStrip) a drugi przez firmę Forsite

Diagnostics, York, Wielka Brytania (Pocket Diagnostics) (Braun-Kievnick *et al.*, 2011). Szczegóły dotyczące wymienionych testów dostępne są w Załączniku 3.

- Testy molekularne

W wyniku przeprowadzonych badań w 2010 roku ocenione zostały: konwencjonalny PCR, real-time PCR oraz LAMP (izoltermalna amplifikacja za pośrednictwem ezy) i na podstawie uzyskanej oceny zalecone do stosowania w badaniach części roślinnych wykazujących objawy chorobowe po etapie ekstrakcji DNA. Protokół ekstrakcji DNA przedstawiony w Załączniku 6 został opracowany w wyniku badań przeprowadzonych w 2009 roku (Dreo *et al.*, 2009). W sprzedaży dostępne są również inne zestawy do ekstrakcji DNA lecz nie zostały one jeszcze zwalidowane. Protokoły amplifikacji dla reakcji PCR i real-time PCR zostały przedstawione w Załącznikach 7 do 13, a protokół dotyczący testu LAMP przedstawiono w Załączniku 14.

Wykrywanie bakterii w próbkach nie wykazujących objawów chorobowych

Pobieranie i przygotowanie próbek

Uwaga: Wykrywanie bakterii *E. amylovora* w roślinach nie wykazujących objawów chorobowych jest trudne.

Badania roślin nie wykazujących objawów chorobowych należy wykonywać w okresie lata lub wczesnej jesieni w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wykrycia bakterii *E. amylovora*. Próbki bezobjawowe można pobierać pojedynczo lub zbiorowo (patrz Załącznik 1). Wówczas należy zwrócić uwagę aby nie doszło do kontaminacji próbek podczas ich pobierania oraz podczas procesu ekstrakcji. Pobranie próbek oraz ich przygotowanie należy wykonać zgodnie z jedną z metodyk opracowanych dla próbek bezobjawowych opisanych w Załączniku 1.

Bezpośrednia analiza próbek bezobjawowych podejrzanych o porażenie przez bakterie *E. amylovora* zazwyczaj daje wynik negatywny z powodu niskiej populacji bakterii. W związku z czym zaleca się wykonanie etapu wzbogacania (Załącznik 4).

Testy przesiewowe

Jako testy przesiewowe można wykonać: wzbogaconą izolację, wzbogacony test DASI-ELISA oraz wzbogacenie przed wykonaniem konwencjonalnego testu PCR lub real-time PCR co zostało opisane w Załącznikach od 4 do 13. Należy wykonać co najmniej dwa testy przesiewowe.

Potwierdzanie pozytywnych wyników uzyskanych w testach przesiewowych:

W przypadku uzyskania pozytywnych wyników testów przesiewowych należy spróbować wyizolować patogena z ekstraktu próbki przed wzbogaceniem (Załączniki 1, 2 i 3) lub z próbki po wzbogaceniu (Załączniki 4 i 5). Z powodu znikomych informacji na temat mikroorganizmów obecnych w próbkach, w celu zmaksymalizowania prawdopodobieństwa wyizolowania bakterii *E. amylovora* należy użyć do bezpośredniej izolacji trzech podłoży (CCT, King B, Levan), które zostały omówione w Załączniku 2. Zaleca się jednakże wykonanie posiewu na podłoże CCT po wzbogaceniu próbki w podłożu King B lub CCT. W przypadku gdy izolacja da wynik negatywny i podejrzewa się że wystąpiła reakcja krzyżowa lub amplifikacja inna niż oczekiwana, a kontrole są prawidłowe jest uzasadnionym, aby uznać próbkę za przypuszczalnie porażoną przez bakterie *E. amylovora*. Potwierdzenie wymaga wykonania izolacji a następnie identyfikacji bakterii. Jeśli istnieje konieczność można użyć do wykonania posiewu ekstraktu zamrożonego w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ z dodatkiem glicerolu (Załącznik 2).

Identyfikacja

Czystą kulturę podejrzanego o *E. amylovora* izolatu należy zidentyfikować przy wykorzystaniu co najmniej dwóch testów opartych na różnych zasadach biologicznych (np. połączenie testów biochemicznych, serologicznych lub molekularnych), a jeżeli zaistnieje taka konieczność testu patogeniczności. Można wykonać dwa testy molekularne jeśli oparte są one na różnej sekwencji docelowego DNA w genomie oraz udowodnić że została przebadana specyficzność zastosowanych starterów. Do każdego wykonywanego testu należy dołączyć znany szczep referencyjny *E. amylovora* (zobacz rozdział dotyczący materiałów referencyjnych).

Testy biochemiczne

Rodzaj *Erwinia* zaliczany jest do bakterii Gram-negatywnych, fakultatywnych beztlenowców, poruszających się za pomocą peritrichalnej wici, posiadających kształt pałeczki i zdolność do produkcji kwasu z glukozy, fruktozy, galaktozy i sacharozy. Właściwości fenotypowe przedstawione w Tabeli 1 (Paulin, 2000), które są generalnie obecne lub nie obecne w przypadku bakterii *E. amylovora*, należy określić zgodnie z metodyką opracowaną przez Jones i Geider (2001). Testy przedstawione w Tabeli 2, oparte są głównie na wynikach uzyskanych z pasków API 50 CH pozwalających na odróżnienie bakterii *E. amylovora* od bakterii *E. pyrifoliae*, czynnika sprawczego zarazy gruszy azjatyckiej występującej na *Pyrus pyrifolia* (Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001) od nowego gatunku *Erwinia: E. piriflorinigrans*, wyizolowanego z zamierających kwiatów gruszy w Hiszpanii (López *et al.*, 2011). Jednakże poszczególne cechy fizjologiczne i biochemiczne mogą być różne dla różnych szczepów bakterii. W celu wykonania testu API 50 CH należy przygotować zawiesinę bakterii w buforze PBS (Załącznik 2) o gęstości OD = 1,0 i 1 ml zawiesiny dodać do 20 ml podłoża Ayers (Załącznik 2). Inokulację paska należy wykonać zgodnie z instrukcją producenta. Pasek należy odczytać po upływie 24 do 48 godzin przeprowadzonej inkubacji w temperaturze 25–26 °C w warunkach tlenowych. Rozkład różnych węglowodanów polega na zmianie koloru poszczególnych dołków na kolor żółty.

Tabela 1 Testy biochemiczne służące do identyfikacji

Test	Wynik
Barwienie Grama	-
Produkcja Lewanu ¹	+
Produkcja barwnika fluoryzującego na podłożu King B w świetle UV	-
Test utleniająco/fermentacyjny (O/F)	O+/F+
Test Kowacza na obecność oksydazy	-
Redukcja azotanów	-
Rozkład cytrynianu	+
Wzrost w temp. 39 °C	-
Upłynnianie żelatyny	+
Ureaza	-
Indol	-
Redukcja składników z sacharozy	+
Acetoina	+

¹ – spotykane w naturze spontaniczne mutacje mogą dawać wynik Lewan ujemny

Tabela 2 Różnice pomiędzy *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifoliae* i *Erwinia piriflorinigrans*

Testy mikrobiologiczne	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>
Hydroliza żelatyny	+	-	-
Inozytol ¹	-	ND ²	+
Sorbitol ¹	+	+	-
Eskulina ¹	V ³	-	+
Melobioza ¹	-	-	+
D- Rafinoza ¹	-	-	+
B-Gentobioza ¹	+	-	+

1 – Utlanianie substratów w teście API 50 CH (BioMérieux) na podstawie zmodyfikowanego protokołu opracowanego przez Roselló *et al.* (2003). Ponad 90% szczepów dało wyniki wskazane w tabeli.

2- ND: nie określono

3- V: zmienny

Charakterystyka biochemiczna wg systemu API (BioMérieux Francja)

Biochemiczną identyfikację bakterii *E. amylovora* można uzyskać na podstawie specyficznego profilu otrzymanego w testach paskowych API 20 E oraz API 50 CH. W przypadku testu API 20E w celu przygotowania zawiesiny i wykonania inokulacji paska należy postępować zgodnie z instrukcją producenta. Po inkubacji w temp. 25–26 °C należy wykonać odczyt pasków po upływie 24 do 48 godzin (Tabela 3).

Table 3 Typowe wyniki testu API 20E dla bakterii *Erwinia amylovora* po upływie 48 h

Test ¹	Reakcja (48h) ²
ONPG	zmienna
ADH	- (lub słaby +)
LDC	-
ODC	-
CIT	-
SH2	-
URE	-
TDA	-
IND	-
VP	+ (lub zmienna)
GEL	zmienna
GLU	+
MAN	zmienna
INO	zmienna
SOR	zmienna
RHA	-
SAC	+
MEL	- (lub słaby +)
AMY	-
ARA	zmienna

1-Skróty użyte w paskach API 20 E

2- Więcej niż 90% szczepów dało wyniki wskazane w tabeli.

Automatyczny system identyfikacji Biolog

Nowa wersja (trzeciej generacji) Biolog GENIII 96 mikroplótkowy, pozwala na szybką identyfikację wyizolowanych bakterii zarówno Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich

używając tej samej mikroplastyki. System identyfikacji został oparty na 94 testach fenotypowych: 71 testów wykorzystywania źródeł węgla oraz 23 testy sprawdzające właściwości biochemiczne i fizjologiczne takie jak: tolerancja pH, soli, kwasu mlekowego oraz antybiotyków. Wszystkie badane gatunki posiadają unikalny „fenotypowy odcisk palca”, który jest automatycznie porównywany z 1200 gatunkami tlenowymi znajdującymi się w bazie danych.

Zarówno mikroplastyki jak i program są dostępne w handlu (Biolog, Omnilog, USA). W celu przeprowadzenia automatycznej identyfikacji podejrzanego szczepu *E. amylovora* należy postępować zgodnie z instrukcją producenta.

Analiza kwasów tłuszczowych (FAP)

Kolonie przypominające *E. amylovora* należy hodować na podłożu trypticase soy agar przez 48 h w temperaturze 28 °C, a następnie zastosować odpowiednią procedurę dla FAP. Analizę kwasów tłuszczowych można uznać za pozytywną jeśli profil podejrzanego kultury bakterii jest identyczny z profilem uzyskanym dla kontroli pozytywnej (Sasser, 1990). Szybka identyfikację kolonii przypominających *E. amylovora* można wykonać przy użyciu dostępnego w handlu oprogramowania MIDI (Newark, USA). Należy postępować zgodnie z instrukcją producenta. Na skład kwasów tłuszczowych bakterii może mieć wpływ podłoże wzrostowe, fizjologiczny wiek komórek oraz czułość chromatograficzna, ale ogólnie rzecz biorąc szczepy *E. amylovora* posiadają w tym systemie wskaźnik prawdopodobieństwa pomiędzy 0,6 a 0,9.

Testy serologiczne

W celu dokonania identyfikacji nie jest wystarczającym przeprowadzenie dwóch testów serologicznych; należy wykonać co najmniej dwa testy oparte na różnych zasadach biologicznych. Do wykrywania (lub zdiagnozowania) i identyfikacji należy użyć przeciwciał pochodzących z różnych źródeł w celu redukcji ryzyka uzyskania wyników fałszywie pozytywnych.

Test aglutynacji

Podejrzone kolonie *E. amylovora* można poddać badaniu testem aglutynacji poprzez wymieszanie na szkiełku mikroskopowym kolonii bakterii w kropli buforu PBS (Załącznik 2) z kroplą specyficznych przeciwciał dla *E. amylovora* (nie rozcieńczonych lub rozcieńczonych 5 lub 10-krotnie). Można użyć przeciwciał monoklonalnych tylko w przypadku gdy wykazują one aglutynację ze szczepem referencyjnym.

Test immunofluorescencji

Test immunofluorescencji został opisany w standardzie PM 7/97: *Pośredni test immunofluorescencyjny dla bakterii patogenicznych dla roślin*. W celu identyfikacji, można wykonać test IF wykorzystując specyficzne przeciwciała monoklonalne z firmy Plant Print Diagnostics S. L. (Hiszpania) lub przeciwciała firmy Loewe, Biochemica GmbH, Sauerlach, Niemcy.

Testy ELISA

Testy ELISA zostały opisane w standardzie PM 7/101(1) *Testy ELISA dla bakterii patogenicznych dla roślin* (EPPO, 2010).

W celu identyfikacji izolatu można wykonać test DASI-ELISA przy użyciu specyficznych przeciwciał monoklonalnych takich jak do analizy próbek roślinnych (kit z firmy Plant Print Diagnostics S. L., Hiszpania). W przypadku testu DASI-ELISA, należy przygotować zawiesinę bakterii o gęstości około 10^8 komórek na ml z podejrzanej kolonii w buforze PBS (Załącznik 2). W przypadku identyfikacji izolatów test DASI-ELISA należy wykonać bez wcześniejszego wzbogacania (Załącznik 3).

Polowe testy immunologiczne

Z podejrzanej kolonii przygotować zawiesinę o gęstości około 10^8 komórek na ml w buforze PBS (Załącznik 2) zgodnie z instrukcją producenta. Dwa zestawy zostały przebadane w testach (Agri-strip, z firmy Bioreba, Reinach, Szwajcaria i Pocket Diagnostic, York, Wielka Brytania) i zarekomendowane do wykorzystania w badaniach roślin wykazujących objawy chorobowe oraz identyfikacji izolatów.

Testy molekularne

Do wykorzystania w celu szybkiej identyfikacji zalecane są: konwencjonalny i/lub real-time PCR oraz LAMP choć są polecane również inne dostępne techniki.

Konwencjonalny PCR

Przygotować zawiesinę o gęstości około 10^6 komórek na ml z podejrzanej *E. amylovora* kolonii w sterylnej wodzie o czystości molekularnej. Należy zastosować odpowiednią procedurę PCR zgodnie z Załącznikami 7 do 11, bez ekstrakcji DNA lecz po zastosowaniu temperatury 100°C przez 10 min.

Real-time PCR

Pierwszy protokół dotyczący wykrywania bakterii *E. amylovora* w teście real-time PCR został opisany przez Salm i Geider (2004) przy użyciu starterów opartych na sekwencji pEA29 plazmidu, jednakże czułość i specyficzność tego testu były podobne do konwencjonalnych testów PCR. Od tej pory zostały opracowane dwa testy real-time PCR, co zostało opublikowane i jest opisane w Załącznikach 12 i 13. Kolonie bakterii należy przygotować tak jak do konwencjonalnego testu PCR.

Makrorestrykcja za pomocą XbaI i pulsującej elektroforezy żelowej (PFGE)

Pulsująca elektroforeza żelowa PFGE analizuje genomowe DNA po trawieniu enzymem *XbaI* zgodnie z Jock *et al.* (2002) pokazując sześć rodzajów szczepów europejskich *E. amylovora*. Metoda ta może dostarczyć użytecznych informacji na temat zróżnicowania szczepów i może okazać się użyteczna podczas analizowania rozprzestrzenienia zarazy ogniowej w Europie.

Metody sekwencjonowania DNA

Porównanie amplifikowanych produktów PCR poddanych komercyjnemu sekwencjonowaniu z uzyskanych i wybranych genów pozwala na odróżnienie izolatów bakterii *Erwinia amylovora* od innych bakterii należących do gatunku Enterobacteriaceae [zostanie to opisane w Standardzie EPPO PM 7/NEW dotyczącym kodowania kreskowego DNA jako narzędzia służącego identyfikacji patogenów roślinnych (w przygotowaniu)]. Na przykład używając metody opisanej przez Parkinsona *et al.* (2009) stwierdzono na podstawie fragmentu sekwencji genu *recA*., że wszystkie do tej pory przebadane izolaty *E. amylovora* są klonalnie podobne

Testy nadwrażliwości i patogeniczności

Jeśli jest to konieczne podejrzane kolonie *E. amylovora* uzyskane w procesie izolacji i/lub wzbogaconej izolacji mogą zostać wykorzystane do inokulacji roślin testowych w celu potwierdzenia ich patogeniczności. Reakcja nadwrażliwości na liściach tytoniu może wskazać na obecność genu patogeniczności *hrp*, który daje pozytywne reakcje również w przypadku innych bakterii patogenicznych dla roślin. Do tego testu wykorzystywane są rośliny tytoniu odmian: Xanthi lub Samsun posiadające więcej niż 5-6 liści. Należy wstrzyknąć w przestrzenie międzykomórkowe dojrzałych liści zawiesinę bakterii o gęstości 10^8 - 10^9 komórek na ml (OD przy długości fali 620 nm = 1,0) przy użyciu igły 25 GA 5/8 0,5 × 16 i strzykawki. Jeśli w ciągu 24 godzin w temperaturze pokojowej nastąpi całkowite zapadnięcie się zainokulowanej tkanki test uważa się za pozytywny. W celu potwierdzenia patogeniczności zawiesiny kolonii *E. amylovora* należy zainokulować roślinę, która jest rośliną żywicielską dla zarazy ogniowej (Załącznik 15).

Materiały odniesienia

Zaleca się użycia następujących izolatów *E. amylovora* jako kontroli pozytywnych: NCPPB683 (typ szczepu) oraz CFBP 1430. Wymienione kolekcje zapewniają różne szczepy referencyjne bakterii *E. amylovora* : (1) National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Fera, Sand Hutton, York (Wielka Brytania); (2) Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Holandia); (3) Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), EmerSys - IRHS - INRA Beaucauzé (Francja). Autentyczność szczepów może być zagwarantowana tylko, gdy szczepy zostaną pozyskane wyłącznie z kolekcji kultur.

Raportowanie i dokumentacja

Wskazówki dotyczące raportowania i dokumentacji zostały przedstawione w Standardzie EPPO PM7/77 (1) *Dokumentacja i raportowanie w diagnostyce*.

Spełnienie kryteriów

W przypadku gdy dostępne są dane dotyczące kryteriów są one przedstawione wraz z opisem testu.

Dane walidacyjne są również dostępne w internetowej bazie danych EPPO dotyczącej Ekspertyz Diagnostycznych (<http://dc.eppo.int>), oraz zaleca się konsultację tych danych jako dodatkowych informacji (np. więcej szczegółowych informacji dotyczących specyficzności analitycznej, pełne raporty walidacyjne itd.).

Dodatkowe informacje

Informacje dodatkowe dotyczące tego organizmu można otrzymać od:

M. M. López, Bacteriología, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Hiszpania. E-mail: mlopez@ivia.es

Tanja Dreo, National Institute of Biology, Vecna pot 111, SL-1000, Ljubljana, Słowenia. E-mail: tanja.dreo@nib.si

Uwagi dotyczące tego Protokołu Diagnostycznego

W przypadku jakichkolwiek uwag dotyczących tego Protokołu Diagnostycznego lub jakichkolwiek testów przedstawionych w tym Protokole lub w przypadku posiadania dodatkowych danych walidacyjnych dotyczących testów zawartych w tym protokole, którymi chcielibyście Państwo podzielić się prosimy o kontakt pod adresem: diagnostics@eppo.int.

Korekta Protokołu

Coroczny proces przeglądania dokonywany jest w celu identyfikacji potrzeb korekty protokołów diagnostycznych. Protokoły uznane jako wymagające korekty są zaznaczone na stronie internetowej EPPO. W przypadku gdy poprawki i błędy drukarskie są w druku zostanie to także zaznaczone na stronie internetowej.

Podziękowania

Protokół ten został pierwotnie opracowany przez:

M. M. López, M. Keck, P. Llop, M. T. Gorris, J. Peñalver, V. Donat i M. Cambra., IVIA, Moncada (Walencja) (Hiszpania) poprawiona wersja została także przygotowana przez M.M. López (IVIA, Hiszpania). Uzupełniona poprzez przygotowanie opisu dwóch testów PCR przez T. Dreó (NIB, Słowenia) oraz R. Gottsberger (AGES, AT). Polimeraza DNA użyta podczas opracowywania testów PCR opisana w Załącznikach 7, 8, 10 oraz 11 została sprawdzona przez wszystkie laboratoria uczestniczące w Biotools (B&M labs, S.A. Madryt).

Materiały źródłowe

zachowana wersja oryginalna (przyp. tłum.)

Ayers SH, Rupp P i Johnson WT (1919) *A study of alkali forming in milk*. USDA Bulletin no. 782. Washington (US).

Bereswill S, Jock S, Aldridge P, Janse JD & Geider K (1997) Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 215-225.

Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W & Geider K (1992) Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3522-3526.

Bonn WG & van der Zwet T (2000) Distribution and economic importance of fire blight. In *Fire blight, the disease and its causative agent Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste, J). CAB International, Wallingford (GB).

Bradbury JF (1986) *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International, Wallingford (GB).

Braun-Kiewnick A, Altenbach A, Oberhansli T, Bitterlin W & Duffy B (2011) A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. *Journal of Microbiological Methods* **987**, 1-9.

Burrill TJ (1883) New species of *Micrococcus*. *American Naturalist* **17**, 319.

CABI/EPPO (2007) *Erwinia amylovora*. Distribution Maps of Plant Diseases No. 2. Wallingford (GB).

Dreó T, Duffy B, López, M, Paulin, JP, Poliakov, F & Reisenzein, H (2009) Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (*Erwinia amylovora*). EUPHRESKO report.

Dye DW (1983) *Erwinia*: the 'amylovora' and 'herbicola' groups. In *Plant Bacterial Diseases, a Diagnosis Guide* (Ed. Fahy PC & Persley GJ). Academic Press, Sydney (AU).

EPPO/CABI (1997) *Erwinia amylovora*. *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1001-1007. CAB International, Wallingford (GB).

- EPPO (2009) PM 7/097 (1) Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **39**, 413-416.
- EPPO (2010) PM 7/101 (1) ELISA tests for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **40**, 369-372.
- EPPO (2012) EPPO Plant Quarantine data Retrieval system <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm> (last accessed 20/01/2012).
- Gorris MT, Cambra E, Paulin JP, Chartier R, Cambra M & López MM (1996a) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Horticulturae* **411**, 47-51.
- Gorris MT, Cambra M, Llop P, Lecomte P, Chartier R, Paulin JP & López MM (1996b) A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae* **411**, 41-45.
- Gottsberger RA (2010) Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology* **51**, 285-292.
- Guilford PJ, Taylor RK, Clark RG, Hale CN, Forster RLS & Bonn WG (1996) PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **411**, 53-56.
- Ishimaru ES & Klos EJ (1984) New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* **74**, 1342-1345.
- Jock S, Donat V, López MM, Bazzi C & Geider K (2002) Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology* **4**, 106-114.
- Jones A & Geider K (2001) II Gram negative bacteria. B. *Erwinia* and *Pantoea*. In *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (Ed. Schaad NW, Jones JB & Chum W), 2nd edn. APS Press, St Paul (US).
- Kim WS, Gardan L, Rhim SL & Geider K (1999) *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 899-906.
- Kim WS, Jock S, Rhim SL & Geider K (2001) Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease* **85**, 1183-1188.
- King EO, Ward M & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**, 301-307.
- Lecomte P, Manceau C, Paulin JP & Keck M (1997) Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 91-98.
- López MM, Llop P, Gorris MT, Keck M, Peñalver J, Donat V & Cambra M (2006) European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* **704**, 99-103.
- López MM, Roselló MM, Llop P, Ferrer S, Christen R & Gardan L (2011) *Erwinia piriflorinigra* sp. nov. a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 561-567.
- Llop P, Bonaterra A, Peñalver J & López MM (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2071-2078.
- Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C & López MM (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* **37**, 23-31.
- Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreo T, Barbe´ S, et al. (2011) *Erwinia amylovora* Novel Plasmid EI70: Complete Sequence, Biogeography, and Role in Aggressiveness in the Fire Blight Phytopathogen. PLoS ONE 6(12): e28651. doi:10.1371/journal.pone.0028651.
- Llop P, Donat V, Rodríguez M, Cabrefiga J, Ruz L, Palomo JL, Montesinos E & López MM (2006) An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology* **96**, 900-907.
- Maes M, Garbeva P & Crepel C (1996) Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathology* **45**, 1139-1149.

- Matsuura T, Mizuno A, Tsukamoto T, Shimizu Y, Saito N, Sato S, Kikuchi S, Uzuki T, Azegami K & Sawada H (2011) *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 1799-1803doi: 10.1099/ij.s.1090.032011-032010.
- McManus PS & Jones AL (1995) Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology* **85**, 618-623.
- Obradovic D, Balaz J & Kevresan S (2007) Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologija* **76**, 844-52.
- Parkinson N, Stead D, Bew J, Heeney J, Tsrer L & Elphinstone JG (2009) *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of recA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2388-2393.
- Paulin JP (2000) *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In *Fire blight, the Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste, J). CAB International, Wallingford (GB).
- Persen U, Gottsberger RA & Reisenzein H (2011) Spread of *Erwinia amylovora* in apple and pear trees of different cultivars after artificial inoculation. *Acta Horticulturae* **896**, 319-330.
- Pirc M, Ravnkar M, Tomlinson J & Dreo T (2009) Improved fire blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, **58**, 872-881.
- Taylor RK, Guilford P, Clark RG, Hal CN & Forster (2001) Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**, 35-43.
- Powney R, Plummer K, Luck JE, Beer S & Rodoni B (2007) Evaluation of PCR-based Protocols for the Detection of *Erwinia amylovora*. XI International Workshop on Fire Blight Conference Proceedings published in *Acta Horticulturae*.
- Salm H & Geider K (2004) Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Plant Pathology* **53**, 602-610.
- Sasser M (1990) Identification of bacteria through fatty acid analysis. In *Methods in Phytobacteriology* (Ed. Klement F, Rudolf K & Sands DC), pp. 199–204. Akademiai Kiadó, Budapest (HU).
- Starr MP, Cardona C & Folsom D (1951) Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology* **41**, 951-959.
- Stöger A, Schaffer J & Ruppitsch W (2006) A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology* **154**, 469-473.
- Tanii A, Tamura O, Ozaki M (1981).The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of Phytopathological Society of Japan* **47**, 102.
- Taylor RK, Guilford P, Clark RG, Hal CN & Forster RLS (2001) Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29**, 35–43.
- Temple TN & Johnson KB (2011) Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease* **95**, 423-430.
- Temple TN, Stockwell VO & Johnson K. (2008). Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae*, **793**, 497-504.
- Thomson SV (2000) Epidemiology of fire blight. In *Fire blight, the disease and its causative agent, Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste, J). CAB International, Wallingford (GB).
- van der Zwet T (2002) Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* **590**, 33-34.
- van der Zwet T & Beer S (1995) Fire blight – its nature, prevention and control. In *A Practical Guide to Integrated Disease Management*. USDA Agricultural Information Bulletin no. 631. Washington (US).
- van der Zwet T & Keil HL (1979) *Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants*. USDA Handbook no. 510. Washington (US).

Załącznik 1 - Procedury ekstrakcji

Próbki pochodzące z materiału wykazującego objawy chorobowe

Próbki można poddać procesowi badania z użyciem różnych buforów w zależności od tego, który test będzie wykonywany. W celu uzyskania prawidłowego wzbogacenia bakterii *E.amylovora* w materiale roślinnym wymagane jest użycie świeżo przygotowanego buforu antyoksydacyjnego do maceracji (Załącznik 2) (Gorris *et al.*, 1996b). Bufor ten został sprawdzony w przeprowadzonych badaniach. W bezpośredniej izolacji, teście immunofluorescencji lub teście PCR można wykorzystać także sterylny 10 mM (PBS) bufor fosforanowy z dodatkiem soli o pH 7,2 (Załącznik 2) lub sterylną wodę.

Starannie wybrać części roślin wykazujące świeże objawy porażenia jeśli to możliwe z wyciekami śluzu. Do analizy należy wybrać brzegowe uszkodzenia na każdym organie roślinnym. Umieścić w 1 do 4,5 ml sterylnej wody lub buforu. W przypadku pędów pobrać do badania fragmenty z objawami wraz z liśćmi na pograniczu nekroz i tkanki zdrowej. W przypadku kwiatów pobrać do badania od jednego do kilku sztuk wraz z szypułkami. W przypadku liści pobrać do badania od jednego do kilku liści wraz z ogonkami liściowymi, przede wszystkim wybrać liście z nekrozami naczyń lecz nie całkowicie nekrotyczne. W przypadku owoców do badania pobrać od jednego do kilku owoców. W przypadku gałęzi lub konarów należy usunąć zewnętrzną korę z fragmentów wykazujących objawy chorobowe za pomocą sterylnego skalpela i pobrać fragmenty leżące poniżej z typowymi przebarwieniami podkorowymi.

Protokół ekstrakcji potwierdzony w przeprowadzonych badaniach był następujący: pobrać 0,1 g pędów, kwiatów, liści, łodyg, pni lub owoców pokroić na kawałki i umieścić w plastikowym woreczku.

Dodać do każdego woreczka 4,5 ml antyoksydacyjnego buforu do maceracji opisanego przez Gorris *et al.* (1996a) (Załącznik 2). Pozostawić próbki w celu maceracji przez co najmniej 5 minut. Delikatnie zmiażdżyć materiał roślinny w plastikowych woreczkach za pomocą gumowego młotka lub homogenizatora firmy Bioreba lub za pomocą podobnego urządzenia, unikając rozprysnięcia zawartości woreczków. W celu dekantacji trzymać próbki w lodzie przez kilka minut i przenosić po około 2 ml, 1 ml i 1 ml każdego maceratu do trzech sterylnych probówek Eppendorfa. Do badań użyć probówki zawierającej 2 ml maceratu. Jedną z probówek zawierającą 1 ml maceratu przechowywać w temperaturze -20°C w celu wykorzystania do dalszych analiz, do drugiej probówki dodać 30% glicerol (Difco) i przechowywać w temperaturze -80°C .

Izolację należy wykonać tego samego dnia, w którym została przeprowadzona maceracja próbek podobnie jak wzbogacenie i utrwalenie szkiełek do testu immunofluorescencji. Test PCR można wykonać najprędzej, używając 1 ml maceratu zamrożonego w temperaturze -20°C .

Próbki z materiału nie wykazującego objawów chorobowych

Pobrać kwiaty, gałązki, zawiązki owoców lub fragmenty pędów do sterylnych woreczków lub pojemników w warunkach najbardziej sprzyjających namnażaniu czynnika sprawczego zarazy ogniowej, lub kiedy temperatura otoczenia wynosi więcej niż 18°C (van der Zwet i Beer, 1995). W przypadku materiału rozmnożeniowego: pobrać młode gałązki o długości około 20 cm z najbardziej podatnych roślin żywicielskich dezynfekując sekator lub nożyce pomiędzy poszczególnymi roślinami. W przypadku roślin uprawianych w polu pobrać kwiaty jeśli jest to możliwe i/lub młode gałązki o długości około 20 cm. Dezynfekując sprzęt pomiędzy roślinami. Pobrać kwiaty lub szypułki oraz podstawę gałęzi, dojrzałe liście lub

fragmenty pędów wybranych roślin. W przypadku gdy badanie należy wykonać zimą, pobrać 5 do 10 pączków z każdej rośliny.

Bezpośrednia analiza próbek nie wykazujących objawów daje zwykle wynik negatywny dla bakterii *E. amylovora* z powodu niskiej populacji bakterii. W związku z czym zaleca się wykonanie wzbogacenia próbek (Załącznik 4) w buforze antyoksydacyjnym (Gorris *et al.*, 1996a) (Załącznik 2). W przypadku analizowania materiału nie wykazującego objawów chorobowych wzbogacenie należy wykonać przez 72 h w temperaturze około 25°C.

Do maceracji 0,1 do 1 g materiału roślinnego użyć takiej samej ilości buforu antyoksydacyjnego jak dla próbek wykazujących objawy chorobowe (co przedstawiono powyżej) (Załącznik 2) (nie używać buforu fosforanowego PBS lub wody). Nie zaleca się badania większej ilości materiału roślinnego dla danej próbki niż to podano. Bezpośrednio po wzbogaceniu próbki poddać badaniu metodami DASI-ELISA i/lub PCR oraz/lub izolacji, zgodnie z protokołami opisanymi w Załącznikach od 3 do 13. W tym samym czasie, izolację bezpośrednią można także wykonać przy użyciu ekstraktu lub później z użyciem próbki krótko zamrożonej w temperaturze -20°C z glicerolem.

Poniżej została przedstawiona procedura próbkobrania w celu wykonania badania gałązek pochodzących ze zdrewniałego materiału rozmnożeniowego nie wykazującego objawów chorobowych. Próbka składa się ze stu gałązek o długości około 10 cm pochodzących ze stu roślin. W przypadku próbek pobranych z partii składających się z kilku rodzajów każdy z rodzaju powinien być pobrany w odpowiedniej proporcji (maksymalnie trzy rodzaje na jedną próbkę). Z każdej próbki albo każda gałązka jest poddana analizie lub 30 gałązek losowo pobranych z próbki należy pokroić na 4 kawałki (120 kawałków łądy). Następnie pobrane fragmenty umieścić w kolbach Erlenmeyera, zalać sterylnym buforem PBS z dodatkiem 0,1 % Tween i umieścić na wytrząsarce obrotowej na 1,5 godziny w temperaturze pokojowej (Załącznik 2). Następnie przefiltrować z użyciem bibuły filtracyjnej umieszczonej w szklanym filtrze ($n^{\circ}2 = 40 - 100 \mu\text{m}$) używając pompy ciśnieniowej i zebrać uzyskany filtrat. Użyć filtratu bezpośrednio do badania lub odwirować go przez 20 minut z przyspieszeniem 10 000 g. Zawiesić osad w 4,5 ml sterylnego PBS (Załącznik 2). W zależności od pory roku podobną procedurę można zastosować w przypadku badania liści, gałęzi, kwiatów lub pączków.

Możliwość wykrycia bakterii *E. amylovora* jest różna w zależności od pory roku w której przeprowadzane są lustracje, największa jest latem (pod warunkiem, że warunki pogodowe są najlepsze dla bakterii *E. amylovora*) a najmniejsza zimą.

Niezależnie od tego która procedura zostanie zastosowana należy przygotować dla każdej próbki 3 probówki Eppendorfa z 2 ml, 1 ml i 1 ml maceratu i postępować z nim tak jak z materiałem wykazującym objawy chorobowe (patrz powyżej).

Załącznik 2-Przygotowanie podłoży i buforów

Bufory

Bufor fosforanowy z dodatkiem soli 10 mM, pH 7,2 (PBS):

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l.	

Sterylizować przez filtrację.

Bufor antyoksydacyjny do maceracji (Gorris et al., 1996a):

Polivinylopyrolidon (PVP-10)	20,0 g
Mannitol	10,0 g
Kwas askorbinowy	1,76 g
Zredukowany glutation	3,0 g
PBS 10 mm pH 7,2	1 l

Ustalić pH 7. Sterylizować przez filtrację.

Bufor ten należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Bufor ekstrakcyjny (Llop et al., 1999):

Tris HCl	31,52 g
NaCl	14,6 g
EDTA	9,3 g
SDS	5,0 g
Polivinylopyrolidon (PVP-10)	20,0 g
Uzupełnić woda destylowana do	1 l.

Ustalić pH na 7,5. Sterylizować przez filtrację.

Podłoża

Podłoża są sterylizowane poprzez autoklawowanie w temperaturze 120°C przez 15 min.

Podłoże Ayersa (Ayers et al., 1919):

NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Bromotymol blue (roztwór 0,2%)	75 ml
Uzupełnić wodą destylowaną do	1 l

Ustalić pH na 7.

Podłoże CCT (Ishimaru i Klos, 1984):

Sacharoza	100 g
Sorbitol	10,0 g
Niaproof	1,2 ml
Fiolet krystaliczny (0.1% roztwór w etanolu);	2 ml
Nutrient agar	23,0 g
Uzupełnić wodą destylowana do	1 l

Ustalić pH w granicy 7,0-7,2; sterylizować przez autoklawowanie w temperaturze 115°C przez 10 min. Następnie przygotować 2 ml azotanu talu (1% w/v roztwór wodny); 0,05 g cycloheksymidu. Sterylizować przez filtrację (0,45 µm). Dodać do 1 l sterylnego podłoża (w temperaturze około 45°C).

Podłoża wzbogacone: użyć podłoży CCT oraz King B przygotowanych w postaci płynnej, bez dodatku agaru w celu wykonania wzbogacenia opisanego w Załączniku 4. Należy użyć probówek o pojemności co najmniej 5 ml i dodać do nich 0,9 ml podłoża.

Podłoże King B (King et al., 1954):

Proteose pepton N°3	20 g
Glicerol	10 ml
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g
Agar	15 g
Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l	

Ustalić pH na 7,0-7,2.

Podłoże Levan:

Wyciąg drożdżowy	2 g
Bacto pepton	5 g
NaCl	5 g
Sacharoza	50 g
Agar	20 g
Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l	

Ustalić pH na 7-7,2.

Załącznik 3-Szybkie serologiczne testy przesiewowe

1. Immunofluorescencja (IF)

Postępować zgodnie z instrukcją opisaną w standardzie PM 7/97 *Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin*.

Przeciwciała przeciw bakterii *E. amylovora* wykorzystywane aktualnie w testach wykrywania i identyfikacji:

- *E. amylovora*, przeciwciała poliklonalne do wykrywania bakterii, wykorzystywane w teście IF (zwalidowane w przeprowadzonych testach), Loewe Biochemica GmbH, (Sauerlach, Niemcy).
- IVIA EPS 1430, przeciwciała poliklonalne do wykrywania bakterii, wykorzystywane w teście IF (zwalidowane w przeprowadzonych testach), Plant Print Diagnostics, S.L., (Hiszpania).
- IVIA Mab 7 A, przeciwciała monoklonalne do wykrywania bakterii, wykorzystywane w teście IF (zwalidowane w przeprowadzonych testach), Plant Print Diagnostics S.L. (Hiszpania).

W celu naniesienia na szkiełka mikroskopowe użyć maceratu rozcieńczonego w buforze PBS w stosunku: 1:1, 1: 10 i 1: 100 (Załącznik 2). Przygotować jedno szkiełko dla każdej próbki i jej rozcieńczeń. Przygotować odpowiednie rozcieńczenia w buforze PBS (Załącznik 2). Określenie poziomu kontaminacji zwykle nie jest wymagane. Nie jest wskazane wykonywanie testu IF po wzbogaceniu .

Dostępne zbadane kryteria

- 1.1. Dane dotyczące czułości analitycznej
10³ -10⁴- komórek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego
- 1.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej
Nie wykonano badań dla przeciwciał poliklonalnych.
Dla przeciwciał monoklonalnych 7A
Testowany organizm docelowy: 50 szczepów *E. amylovora*. Wszystkie testy pozytywne.
Testowane organizmy inne niż docelowy: 123 szczepy uzyskane z roślin żywicielskich dla bakterii *E. amylovora*, 121 testów negatywnych i dwa pozytywne w przypadku bakterii spokrewnionych z *Erwinia amylovora*, (*Erwinia persicina* i *Dickeya* sp.).
- 1.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 100%
- 1.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 60%

2. Wzbogacony test DASI-ELISA

Po procesie wzbogacania, aby uniknąć reakcji krzyżowych zaleca się użycie zwalidowanych, specyficznych przeciwciał monoklonalnych. W handlu dostępny jest kompletny zestaw oparty na przeciwciałach poliklonalnych i monoklonalnych (3B + 5H IVIA), łącznie z buforem ekstrakcyjnym, półselektywnym podłożem, płytkami do ELISA oraz odczynnikami z firmy Plant Print Diagnostics S.L. (Faura, Hiszpania). Wspomniany zestaw do wzbogaconego testu DASI-ELISA (Gorris *et al.*, 1996b) został zwalidowany w dwóch testach. Zestaw oparty jest na przeciwciałach monoklonalnych i technice opisanej przez Gorris *et al.* (1996a,b). Jako kontrolę pozytywną użyć zawiesinę ekstraktu próbki, która wcześniej została w teście uznana za negatywną z dodatkiem zawiesiny komórek bakterii *E. amylovora* o gęstości równej 10⁸ komórek na ml. Jako kontrolę negatywną użyć ekstrakt z próbki, która wcześniej została w teście uznana za negatywną z dodatkiem zawiesiny szczepu bakterii innych niż *E. amylovora* w buforze PBS (Załącznik 2).

Umieścić niezbędne ilości wzbogaconych do testu ELISA ekstraktów i kontroli w łaźni wodnej lub termobloku w temperaturze 100°C na 10 min przed wykonaniem testu ELISA, upewniając się wcześniej czy próbki nie są otwarte. Pozostały wzbogacony ekstrakt próbek przechowywać w celu wykonania izolacji i/lub PCR. Dalsze badanie zagotowanych próbek przeprowadzić tego samego dnia (w temperaturze pokojowej) lub w przypadku wykonania testu innego dnia przechować w temperaturze -20 °C. Działanie wysoką temperaturą jest niezbędne w celu uzyskania optymalnej czułości i specyficzności przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych, informacje uzyskane przez Gorris *et al.* (1996a). Następnie postępować zgodnie z instrukcją dla testu DASI-ELISA przedstawioną w protokole PM 7/101(1) *Test ELISA dla bakterii patogenicznych dla roślin* (EPPO, 2010) oraz z instrukcją producenta zestawu.

Odczyt reakcji pozytywnej dla testu ELISA w studziencie z kontrolą negatywną wskazuje na reakcję krzyżową lub niespecyficzne wiązanie przeciwciał. W takim przypadku należy powtórzyć test lub wykonać inny test oparty na innych zasadach biologicznych.

Dostępne zbadane kryteria

- 2.1. Dane dotyczące czułości analitycznej
10 jedn. tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego w podłożu King B I CCT (Gorris *et al.*, 1996b).

10- 10² jedn. tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego w podłożu King B 10³- 10⁴ jedn. tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego w podłożu CCT (badania przeprowadzone w 2010).

2.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej

Dla przeciwciał monoklonalnych 3B+5H

Przebadany organizm docelowy: 250 szczepów *E. amylovora*. Wszystkie pozytywne w warunkach testu (Gorris *et al.*, 1996 oraz testy IVIA).

Przebadany organizm nie docelowy: 258 niezidentyfikowanych szczepów pochodzących z roślin żywicielskich dla bakterii *E. amylovora* oraz 45 szczepów bakterii patogenicznych dla innych roślin. Wszystkie testy były negatywne (Gorris *et al.*, 1996).

2.3. Dane dotyczące powtarzalności

Dla IVIA: 100%

2.4. Dane dotyczące odtwarzalności

Dla IVIA: 98%

3. Testy polowe

Dwa zestawy do testów polowych dały w przeprowadzonych badaniach w 2009 i 2010 podobne wyniki. Zostały oparte na przeciwciałach poliklonalnych dla bakterii *Erwinia amylovora*, które nie są specyficzne i mają zastosowane tylko do badania roślin wykazujących objawy chorobowe. W przypadku wykonania analizy należy postępować zgodnie z instrukcją producenta.

Dostępne zbadane kryteria dla testów paskowych Agri-strip (Bioreba, Reinach, Szwajcaria)

3.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (dla testów przeprowadzonych w roku 2010)

10⁵- 10⁶ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego

3.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej

Przebadany organizm docelowy: 39 szczepów, wszystkie pozytywne

przebadane organizmy nie docelowe: 61 szczepów (wszystkie testy negatywne za wyjątkiem *E. pirifoliae*, *E. tasmaniensis* oraz *E. piriflorinigrans*). Reakcje fałszywie pozytywne z *E. pirifoliae*, *E. tasmaniensis* oraz *E. piriflorinigrans* zostały również przedstawione w AGES (AT) oraz Braun-Kiewnick *et al.* (2011).

3.3. Dane dotyczące powtarzalności

Dla IVIA: 94%

3.4. Dane dotyczące odtwarzalności

Dla IVIA: 96%

Dostępne zbadane kryteria dla Testów Kieszonkowych (Forsite Diagnostics, York, Wielka Brytania)

3.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (dla testów przeprowadzonych w roku 2010)

10⁵-10⁶ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego

3.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej

Przebadane organizmy nie docelowe: Wyniki fałszywie pozytywne z *E. pirifoliae*, *E. tasmaniensis* oraz *E. piriflorinigrans* dane przedstawione przez AGES (AT).

3.3. Dane dotyczące powtarzalności

Dla IVIA: 94%

3.4. Dane dotyczące odtwarzalności

Dla IVIA: 96%

Załącznik 4 – Wzbogacanie

Wzbogacanie wykonywane jest w celu namnożenia niewielkiej populacji bakterii *E. amylovora* w próbce. Wzbogacanie jest niezbędne przed wykrywaniem testem ELISA z powodu niskiego poziomu czułości tej techniki w przypadku użycia specyficznych przeciwciał monoklonalnych. Wzbogacenie należy wykonać również przed izolacją lub przed testem PCR (nawet w przypadku próbek wykazujących objawy chorobowe) kiedy spodziewana jest niewielka ilość bakterii *E. amylovora* tworzących kolonie (próbki potraktowane związkami miedzi, ze starymi objawami chorobowymi, nieodpowiednie warunki pogodowe dla zarazy ogniowej, zima itd.) lub gdy oczekuje się dużej ilości organizmów hamujących reakcję. Po obróbce próbek w świeżo przygotowanym buforze antyoksydacyjnym należy użyć dwóch zwalidowanych podłoży, jedno nie selektywne (King B) oraz jedno półselektywne (CCT) (Załącznik 2), ponieważ skład oraz ilość mikroorganizmów jest nieznana.

Jak tylko macerat zostanie przygotowany (Załącznik 1), rozdzielić co najmniej po 0,9 ml z każdej próbki do dwóch sterylnych probówek 5 ml przygotowanych z taką samą objętością każdego ze wzbogaconych podłoży. W celu maksymalnego napowietrzenia próbek nie używać probówek Eppendorf. Jako dodatkowe kontrole negatywne przygotować trzy probówki z 0,9 ml buforu do maceracji (Załącznik 2) i dodać taką samą objętość tego samego buforu i każdego wzbogaconego podłoża (Załącznik 2). Inkubować w temperaturze 25°C przez 48 h bez wytrząsania. W przypadku gdy oczekuje się niewielkiej ilości bakterii *E. amylovora* inkubować próbki przez 72 h, tak jak to przedstawiono powyżej dla próbek nie wykazujących objawów chorobowych.

Załącznik 5 - Izolacja

1. Izolacja bezpośrednia

Do izolacji użyć podłoży: CCT, King B oraz Levan (lub Nutrient Agar z dodatkiem sacharozy, NAS lub NSA) (Załącznik 2). W przypadku gdy próbki są w złym stanie aby uzyskać maksymalną szansę wykrycia bakterii zaleca się użycie wszystkich trzech podłoży. Przygotować rozcieńczenia maceratu w stosunku: 1: 10 oraz 1: 100 (Załącznik 1) w buforze PBS (Załącznik 2).

Pobrać za pomocą pipety 50 µl maceratu rozcieńczonego i nierozcieńczonego i nanieść na oddzielne szalki każdego podłoża. Rozpocząć od posiewu rozcieńczenia 1: 100 i przejść kolejno do maceratu nierozcieńczonego. Użyć sterylnych ez lub głaszczek lub opalić szklane głaszczki po zanurzeniu w denaturacie, a następnie ostudzić. Ostrożnie rozprowadzić naniesioną pipetą objętość w trzech powtórzeniach. W celu sprawdzenia jakości podłoży nanieść za pomocą pipety zawiesiny zawierające 10^3 , 10^4 oraz 10^5 jednostek tworzących kolonie/ml czystej kultury bakterii *E. amylovora*. Szalki inkubować w temperaturze około 25 °C przez 48–72 h. Ostateczny odczyt wykonać po 72–96 h.

Kolonie bakterii *E. amylovora* na podłożu CCT pojawiają się po około 48 h i są jasno fioletowe, okrągłe, silnie wypukłe do kopulastych, gładkie a po 72h śluzowate, wykazując słabszy wzrost na podłożu King B lub Levan. Podłoże CCT hamuje wzrost większości pseudomonad ale nie *Pantoea agglomerans*. Kolonie bakterii *E. amylovora* na podłożu King B pojawiają się po upływie 24 h i są kremowo-białe, okrągłe z tendencją do rozlewania się, nie fluoryzują w świetle UV przy długości fali 366 nm po upływie 48 h. Umożliwia to odróżnienie ich od fluoryzujących pseudomonad. Na podłożu Levan kolonie *E. amylovora* pojawiają się po 24 h i są koloru białawego, okrągłe, kopulastych, gładkie a po upływie 48h

śluzowate. Natomiast kolonie lewan-ujemne *E. amylovora* zostały również opisane (Bereswill *et al.*, 1997). Rycina 3 pokazuje wygląd kolonii na trzech podłożach.

Należy otrzymać czyste kultury dla podejrzanych kolonii dla każdej próbki poprzez posiew na podłoże King B. Zidentyfikować podejrzane kolonie *E. amylovora* jak to zostało przedstawione w sekcji Identyfikacja. Przechowywać kultury na skosach z agarem odżywczym (NA) z olejem wazelinowym w temperaturze 10 °C lub do dłuższego przechowywania w glicerolu 30% w temperaturze –80 °C lub zliofilizowane.

Izolację należy uznać za negatywną jeśli nie obserwuje się kolonii bakterii o morfologii podobnej do *E. amylovora* po okresie 96 h na jakimkolwiek z trzech podłoży (pod warunkiem, że nie podejrzewa się inhibicji z powodu współistnienia lub antagonizmu innych bakterii), a typowe kolonie *E. amylovora* zostały znalezione w kontrolach pozytywnych. Izolacja jest uznana za pozytywną jeśli podejrzane kolonie *E. amylovora* zostały wyizolowane na co najmniej jednym zastosowanym podłożu i izolacja została potwierdzona przez jedną ze wskazanych metod.

Dostępne zbadane kryteria

- 1.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (w badaniach przeprowadzonych w roku 2010):
10³ jednostek tworzących kolonie/ml na podłożu King B; 10-10² jednostek tworzących kolonie /ml na podłożu Levan i CCT
- 1.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej
Nie zostały zebrane
- 1.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 100%
- 1.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 100%

2. Wzbogacona izolacja

Wzbogacone ekstrakty posiać tylko na płytki z podłożem CCT (Załącznik 2). W celu uzyskania kolonii bakterii posiać po 50 µl każdego wzbogaconego ekstraktu w rozcieńczeniach: 1: 10, 1: 100 i 1: 1000 przygotowanych w buforze PBS (Appendix 2) w trzech powtórzeniach (jak dla izolacji). Inkubować w temperaturze około 25 °C przez 72–96 h. Użycie tylko podłoża półselektywnego i rozcieńczeń jest zalecane z powodu możliwości obfitego namnożenia się różnych bakterii podczas procesu wzbogacania.

Dostępne zbadane kryteria

- 2.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (w badaniach wykonanych w roku 2010)
10 jednostek tworzących kolonie/ml po wzbogaceniu w podłożu CCT
10-10² jednostek tworzących kolonie/ml po wzbogaceniu w podłożu King B
- 2.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej
Nie zostały zebrane
- 2.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 100%
- 2.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 100%

Załącznik 6- ekstrakcja DNA oraz konwencjonalny PCR ekstrakcja DNA

W badaniach zwalidowane zostały dwa protokoły dla ekstrakcji DNA z próbek roślinnych (Llop *et al.*, 1999; Taylor *et al.* (2001) oraz jeden zestaw dostępny w handlu. W handlu dostępne są również inne zestawy do ekstrakcji DNA ale nie zostały one zwalidowane.

1. Ekstrakcja DNA zgodnie z Llop *et al.* (1999)

Użyć 1 ml każdego maceratu i/lub 1 ml wzbogaconych maceratów przygotowanych zgodnie z Załącznikami 1 i 4. Odwirować maceraty przy prędkości 10 000 g przez 5 min w temperaturze pokojowej. Zlać supernatant i zawiesić osad w 500 µl buforu ekstrakcyjnego (Llop *et al.*, 1999 Załącznik 2) i wytrząsać przez 1 h w temperaturze pokojowej. Odwirować przy prędkości 4000 g przez 5 min. Pobrać 450 µl supernatantu i dodać taką samą objętość isopropanolu, odwrócić i pozostawić na 30 min do 1 h w temperaturze pokojowej. Odwirować przy prędkości 10 000 g przez 5 min, odrzucić supernatant i wysuszyć. W przypadku gdy osad na dnie próbówki jest ciągle zabarwiony (brązowy lub zielony) pobrać go ostrożnie odrzucając jednocześnie supernatant w celu otrzymania czystego DNA. Zawiesić osad w 200 µl wody. Użyć go do testu PCR lub przechować w temperaturze –20°C.

2. Ekstrakcja DNA oparta na procedurze opisanej przez Taylor *et al.* (2001) lecz z małymi modyfikacjami (eliminacja Gene Releaser który uznano za zbędny).

Dodać 200 µl każdego z maceratów i/lub wzbogaconych maceratów w 500 µl buforu [140 mM NaCl; 50 mM KCl; 0,05% Tween 20; 2% polywinylopyrolidon (PVP) 10; 0,4% BSA, woda destylowana 1 litr] przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Pozostała ilość może zostać użyta do testu PCR lub przechowana w –20°C.

3. Ekstrakcja DNA przy użyciu zestawu RED-Extract N-Amp T Plant kit (Sigma-Aldrich, USA)

Pobrać po 100 µl każdego maceratu i/lub wzbogaconych maceratów do próbówki Eppendorfa. Dodać 150 µl roztworu ekstrakcyjnego (zestaw) uzupełnionego 0,1 % (obj./obj.) Triton X-100 i 0,05 % (obj./obj.) Nonidet NP-40 Igepal. Inkubować w temperaturze 95°C przez 30 min w bloku grzejmym. Przenieść 50 µl ekstraktu do nowej próbówki i rozcieńczyć go 50 µl buforu do rozcieńczania (zestaw). Użyć do testu PCR lub przechować w temperaturze –20°C.

Zwalidowane zostały trzy protokoły ekstrakcji DNA w badaniach przeprowadzonych w roku 2009 i 2010, z czterema protokołami PCR (Załączniki 8, 9, 10, 11), które dały porównywalne wyniki. Wydajność ich nie wzrosła w wyniku rozcieńczenia ekstraktów 1:10, co sugeruje, że nie są obecne inhibitory lub jest ich niewiele. Protokoły PCR zostały uszczegółowione w następujących załącznikach.

Dostępne zbadane kryteria

Zbadane kryteria zostały przedstawione razem z poszczególnymi testami PCR.

Protokoły konwencjonalnego PCR

Dla bakterii *E. amylovora* istnieje wiele starterów mających zastosowanie w testach konwencjonalnych PCR wykorzystywanych w celach diagnostycznych, do wykrywania i identyfikacji. Niektóre z nich mogą zostać użyte do badań (Guilford *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2001) lecz niektóre z nich wykazują problemy w zakresie specyficzności. Dotyczy to przypadku testu opisanego przez Maes *et al.* (1996), podczas którego startery amplifikują bakterie *Erwinia piriflorinigrans*, wyizolowane z nekrotycznych zawiązków gruszy (López *et al.*, 2011). Testy opisane przez Bereswill *et al.* (1992), Mc Manus i Jones (1995) oraz Llop *et al.* (2000) opierają się na sekwencji plazmidu pEA29, który nie jest uniwersalny w przypadku szczepów *E. amylovora* (Llop *et al.*, 2006; Llop *et al.*, 2011).

Dwa protokoły dla konwencjonalnego PCR zostały zwalidowane w badaniach przeprowadzonych w roku 2002 a cztery protokoły w badaniach przeprowadzonych w roku 2009 i 2010. Startery i protokoły zwalidowane w 2002 opracowane zostały przez Bereswill *et al.* (1992) i Llop *et al.* (2000), ze wzbogaceniem lub bez wcześniejszego wzbogacenia. Startery i protokoły zwalidowane w roku 2009 i 2010 opracowane zostały przez Llop *et al.* (2000), Taylor *et al.* (2001), Stöger *et al.* (2006) oraz Obradovic *et al.* (2007). Używając dwóch testów PCR (jeden ze starterami opartymi o sekwencję pEA29 i drugi oparty o sekwencje chromosomalne) konieczne jest branie pod uwagę występowania szczepów *E. amylovora* o pełnej wirulencji bez pEA29 (Llop *et al.*, 2006) oraz doświadczenia różnych krajów (Powney *et al.*, 2007). Konwencjonalny PCR może być zastosowany przy użyciu starterów i spełnieniu warunków zwalidowanych w przeprowadzonych badaniach. Należy zwrócić uwagę aby uniknąć kontaminacji próbek.

Kontrole pozytywne przygotować w laboratorium w innym miejscu niż będą badane próbki.

Załącznik 7- test PCR zgodnie z Bereswill *et al.* (1992)

1. Informacja ogólne

- 1.1. Test ten był szeroko stosowany przez wiele lat. Sekwencje starterów zostały oparte na plazmidzie pEA29 i okazało się, że nie są one uniwersalne dla wszystkich szczepów bakterii *E. amylovora* (Llop *et al.*, 2006; Llop *et al.*, 2011). Ponadto często wykazują one nie specyficzne wiązania (patrz poniżej).
- 1.2. Test może być zastosowany do każdego materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Poszukiwane sekwencje są w plazmidzie pEA29.
- 1.4. Oligonukleotydy:
A: 5'- CGG TTT TTA ACG CTG GG -3'
B: 5'- GGG CAA ATA CTC GGA TT -3'
- 1.5. Wielkość amplikonu wynosi 900 pz. (Bereswill *et al.*, 2002). Jednakże mogą wystąpić zróżnicowania pomiędzy 900 a 1100 pz (Lecomte *et al.*, 1997), z powodu sekwencji 8 pz powtarzających się w obrębie fragmentu DNA (Jones & Geider, 2001).
- 1.6. Enzym: testy zostały przeprowadzone z użyciem polimerazy DNA z firmy Biotools.

2. Metody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych:
W Załączniku 6 opisano trzy metody ekstrakcji DNA z materiału roślinnego. Metody ekstrakcji DNA zostały sprawdzone w przeprowadzonych badaniach. Czulość testów wzrosła po wzbogaceniu próbek odpowiednio w podłożu King B i CCT (López *et al.*, 2006).
- 2.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		34,80	
Bufor PCR	10x	5,00	1x
Mg Cl ₂	50 mM	3,00	3 mM

dNTPs	10 mM	1,00	0,2 mM każdego z dNTP
Starter A	10 μ M	0,50	0,1 μ M
Starter B	10 μ M	0,50	0,1 μ M
Polimeraza Tag	5 U / μ l	0,20	1 U
Razem		45,00	
DNA		5,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		50,00	

2.3. Warunki cyklu PCR: 5 min w temperaturze 93°C, 40 cykli po 30 s w temperaturze 93°C, 30 s w temperaturze 52°C i 1 min 15 s w temperaturze 72°C oraz ostatni etap 10 min at 72°C.

2.4. Obserwacje: Jeśli stężenie poszukiwanej bakterii jest duże np. w przypadku próbek wzbogaconych zaleca się wykonanie przed amplifikacją dziesięciokrotnych rozcieńczeń w celu rozcieńczenia zawartych inhibitorów. Amplifikację należy wykonać dla stężenia wyjściowego oraz rozcieńczeń.

3. Ścisła informacja proceduralna

3.1. Kontrole:

W celu otrzymania właściwych wyników testu do każdej serii izolacji kwasów nukleinowych i amplifikacji poszukiwanego organizmu oraz poszukiwanych kwasów nukleinowych należy włączyć następujące kontrole (zewnętrzne) odpowiednio:

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej poszukiwanymi kwasami nukleinowymi.

3.2. Interpretacja wyników

Weryfikacja kontroli:

- NIC i NAC nie powinny wytwarzać amplikonów
- PIC, PAC powinny produkować amplikony o wielkości 900 pz.
- Jeśli zostanie użyta IPC, amplikony powinny mieć oczekiwaną wielkość.

Kiedy te warunki zostaną spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli wyprodukowane zostaną amplikony wielkości 900 pz
- Test należy uznać za negatywny jeśli wyprodukowane zostaną prążki innej wielkości lub nie zostaną wyprodukowane żadne prążki.
- Jeśli test da produkt wielkości > 900 i ≤ 1100 pz, należy wykonać potwierdzenie w innym teście.
- Test należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne zbadane kryteria

Gdy dostępne, kryteria zostały ustalone dla testu PCR po wzbogaceniu.

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (uzyskane w badaniach prowadzonych w roku 2002, po ekstrakcji DNA wg Llop *et al.* 1999)
 10^5 - 10^6 jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego
 10^2 - 10^3 jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po wzbogaceniu próbek w podłożu King B lub CCT.
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej na podstawie Bereswill *et al.* (1992)
Przebadane organizmy poszukiwane: 5 szczepów, wszystkie pozytywne
Przebadane organizmy inne niż poszukiwane: 5 szczepów, wszystkie negatywne
- 4.3. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 92%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 84%

Załącznik 8- PCR według Taylor *et al.* (2001)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Test ten jest uniwersalny dla wszystkich znanych szczepów bakterii *E. amylovora*. Protokół został zwalidowany w testach przeprowadzonych w roku 2010.
- 1.2. Test może być zastosowany do każdego rodzaju materiału roślinnego oraz kolonii bakterii.

- 1.3. Poszukiwana jest sekwencja chromosomalna (Taylor *et al.*, 2001).
- 1.4. Oligonukleotydy:
 G1-F: 5'- CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG -3'
 G2-R: 5'- GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC -3'
- 1.5. Wielkość amplitonu wynosi 187 pz.
- 1.6. Enzymy: test został wykonany z użyciem polimerazy DNA z firmy Biotools.

2. Metody:

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych: w Załączniku 6 zostały opisane trzy metody ekstrakcji DNA dla materiału roślinnego. Metody ekstrakcji DNA zostały sprawdzone w przeprowadzonych badaniach.
- 2.2. Łańcuchowa Reakcja Polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		14,3	
Bufor PCR	10x	2,5	1x
Mg Cl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,25	0,1 mM każdego z dNTP
Starter G1-F	10 μM	1,00	0,4 μM
Starter G2-F	10 μM	1,00	0,4 μM
Polimeraza Tag	5 U /μl	0,2	1 U
Razem		20,00	
DNA		5,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		25,00	

- 2.3. Warunki reakcji PCR: 3 min w 95 °C, 40 cykli po 30s w temperaturze 94 °C, 30s w temp. 60 °C i 1min w temperaturze 72°C, ostatni etap 5 min at 72°C i chłodzenie w temp. 15°C.
- 2.4. Obserwacje: jeśli stężenie poszukiwanego organizmu jest wysokie np w przypadku próbek wzbogaconych zaleca się wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń oczyszczonego roztworu DNA w wodzie lub buforze TE przed amplifikacją w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację przeprowadzić na stężeniu wyjściowym oraz rozcieńczeniu.

3. Najważniejsze informacje proceduralne

- 3.1. Kontrole:

W celu uzyskania właściwych wyników do każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników

Weryfikacja kontroli

- NIC i NAC nie powinny produkować żadnych amplikonów
- PIC, PAC powinny produkować amplikony o wielkości 187 pz.
- W przypadku użycia IPC amplikony powinny osiągnąć spodziewane wielkości.

Kiedy wymienione warunki zostaną spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli wyprodukowane zostaną amplikony wielkości 187 bp
- Test należy uznać za negatywny jeśli wyprodukowane zostaną prążki innej wielkości lub nie zostaną wyprodukowane żadne prążki.
- Testy należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne przebadane kryteria

Przebadane kryteria są dostępne dla testu PCR bez wzbogacania

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (na podstawie testów przeprowadzonych w roku 2010)
10³- 10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA według Llop *et al.* (1999)
10⁴-10⁵ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA wg modyfikowanej ekstrakcji DNA Taylor *et al.* (2001)
10³- 10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA przy użyciu RED-Extract N-Amp T Plant kit (Sigma-Aldrich, USA)
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej (zgodnie z Taylor *et al.*, 2001)
Przebadane organizmy poszukiwane: 69 szczepów, wszystkie pozytywne. Reakcja negatywna ze szczepami pozyskanymi z *Rubus* sp.
Przebadane organizmy nie poszukiwane: 49 szczepów, wszystkie negatywne.
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 100%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 100%

Załącznik 9- PCR według Stöger *et al.* (2006)

1. Informacje ogólne

- 1.1. W metodzie tej wykorzystywane są te same startery co w metodzie nested PCR wg Llop *et al.* (2000), patrz poniżej.
- 1.2. Test ten może mieć zastosowanie do każdego rodzaju materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Poszukiwana sekwencja jest zlokalizowana w plazmidzie pEA29.
- 1.4. Oligonukleotydy:
PEANT 1: 5'- TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC -3'
PEANT 2: 5'- GCA ACC TTG TGC CCT TTA -3'
- 1.5. Wielkość amplikonu wynosi 391 pz.
- 1.6. Enzymy: zawarte w RED-Extract-N-Amp PCR Ready+ mix (Sigma-Aldrich, USA).

2. Metody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych. Stöger *et al.* (2006) rekomenduje, że ta metoda powinna być użyta z DNA ekstrahowanym za pomocą zestawu RED-Extract N-Amp T Plant kit (Sigma-Aldrich, USA); szczegóły zostały przedstawione w Załączniku 6.
- 2.2. Łańcuchowa Reakcja Polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (ul)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		5,00	
RED-Extract N-Amp T PCR Ready Mix (Sigma)		10,00	
Mg Cl2	Włączony do master mix		Włączony do master mix

dNTPs	Włączony do master mix		Włączony do master mix
PEANT 1	10 µM	0,5	0,25µM
PEANT 2	10 µM	0,5	0,25µM
Polimeraza Tag	Włączony do master mix		Włączony do master mix
Razem		16,00	
DNA		4,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		20,00	

- 2.3. Warunki cyklu PCR : 95°C przez 5 min; 35 cykli po: 95°C przez 15 s, 58°C przez 30 s, i 72°C przez 45 s; i ostatni etap 5 minut w temperaturze 72°C, chłodzić w temp. 15°C.
- 2.4. Obserwacje: jeśli stężenie poszukiwanego organizmu jest wysokie np w przypadku próbek wzbogaconych zaleca się wykonanie przed amplifikacją dziesięciokrotnych rozcieńczeń oczyszczonego roztworu DNA w wodzie lub buforze TE w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację przeprowadzić z wykorzystaniem roztworów stężonych oraz rozcieńczeń.

3. Najważniejsze informacje proceduralne

3.1. Kontrole:

W celu uzyskania właściwych wyników do każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobną wewnętrzną kontrolą pozytywną (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników:

Weryfikacja kontroli

- NIC i NAC nie powinny produkować amplikonów
- PIC, PAC powinny produkować amplikony o wielkości 391 pz
- W przypadku użycia IPC amplikony powinny uzyskać oczekiwaną wielkość

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli zostaną uzyskane amplikony o wielkości 391 pz
- Test należy uznać za negatywny jeśli wyprodukowane zostaną prążki innej wielkości lub nie zostaną wyprodukowane żadne prążki.
- Testy należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne przebadane kryteria

Przebadane kryteria są dostępne dla testu PCR bez wzbogacania

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (w badaniach przeprowadzonych w roku 2010)
 10^4 - 10^6 jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA wykonanej przy użyciu zestawu RED-Extract N-Amp T Plant kit (Sigma-Aldrich, USA)
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej
Brak danych
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 92%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 80%

Załącznik 10- PCR według Gottsberger zaadaptowany przez Obradovic *et al.* (2007)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Oryginalny protokół oraz startery opracowane przez Obradovic *et al.* (2007) zostały zmodyfikowane przez Gottsberger poprzez optymalizację specyficzności oraz maksymalnej czułości w próbkach roślinnych. Protokół został zwalidowany w badaniach testowych przeprowadzonych z roku 2010.

- 1.2. Test może być zastosowany do każdego rodzaju materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Poszukiwaną sekwencją jest sekwencja chromosomalna.
- 1.4. Oligonukleotydy:
 FER1-F: 5' - AGC AGC AAT TAA TGG CAA GTA TAG TCA -3'
 rgER2R: 5' - AAA AGA GAC ATC TGG ATT CAG ACA AT -3'
- 1.5. Wielkość amplikonu wynosi 458 pz.
- 1.6. Enzymy: Badania testowe zostały wykonane z użyciem polimerazy DNA z firmy Biotools.

2. Metody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych: w Załączniku 6 opisano trzy metody ekstrakcji DNA z materiału roślinnego. Trzy metody ekstrakcji DNA zostały podsumowane w przeprowadzonych testach.
- 2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (ul)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		14,3	
1 x PCR bufor	10x	2,5	1x
MgCl ₂ (lub alternatywne, specyficzne)	50 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	10mM	0,25	0,1mM każdego z nukleotydów
FER1-F	10 μM	1,00	0,4μM
rgER2R	10 μM	1,00	0,4μM
Polimeraza Tag	5 U /μl	0,2	1 U
Razem		20,00	
DNA		5,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		25,00	

- 2.3. Warunki reakcji PCR: 3 min w temp. 94°C, 41 cykli po 10 s w temp. 94°C, 10 s w temp. 60°C i 30 s w temp. 72°C, ostatni etap 5 min w temp. 72°C I chłodzenie w temp. 15°C.
- 2.4. Obserwacje: jeśli stężenie oczekiwanego organizmu jest wysokie np. w próbkach wzbogaconych zaleca się wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń oczyszczonego DNA w wodzie lub w buforze TE przed amplifikacją w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację należy wykonać na stężeniu wyjściowym oraz na rozcieńczeniu.

3. Najważniejsze informacje proceduralne

3.1. Kontrole:

W celu uzyskania rzeczywistych wyników testu należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole dla każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników:

Weryfikacja kontroli

- NIC i NAC nie powinny produkować amplikonów
- PIC, PAC powinny produkować amplikony o wielkości 458 pz
- W przypadku użycia IPC amplikony powinny uzyskać oczekiwaną wielkości

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli zostaną uzyskane amplikony o wielkości 458 pz
- Test należy uznać za negatywny jeśli wyprodukowane zostaną prążki innej wielkości lub nie zostaną wyprodukowane żadne prążki.

- Testy należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne przebadane kryteria

Przebadane kryteria są dostępne dla testu PCR bez wzbogacania

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (na podstawie testów przeprowadzonych w roku 2010)
 - 10³-10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA zgodnie z Llop *et al.* (1999)
 - 10⁴-10⁵ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA zgodnie z modyfikacją Taylor *et al.* (2001) i zastosowaniem zestawu RED-Extract N-Amp T Plant kit (Sigma-Aldrich, USA)
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej zgodnie z Obradovic *et al.* (2007)
 - Przebadane organizmy poszukiwane: 44 szczepy, wszystkie pozytywne
 - Przebadane organizmy inne niż poszukiwane: 30 szczepów, wszystkie negatywne
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
 - Dla IVIA: 92%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
 - Dla IVIA: 90%

Załącznik 11- Nested PCR (Llop *et al.*, 2000)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Nested-PCR wykonany w pojedynczej próbówce (Llop *et al.*, 2000) przy użyciu dwóch zestawów starterów umieszczonych w tym samym czasie, różniących się temperaturami anielingu dwie reakcje PCR zachodzą kolejno. Startery zewnętrzne zostały opracowane przez McManus i Jones (1995), podczas gdy wewnętrzne startery zostały opracowane przez Llop *et al.* (2000), zarówno jedne jak i drugie oparte są o sekwencję pEA29.
- 1.2. Test może być zastosowany do każdego rodzaju materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Poszukiwane sekwencje znajdują się w plazmidzie pEA29.
- 1.4. Oligonukleotydy:
 - Startery zewnętrzne AJ75: 5'- CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT -3' oraz AJ76: 5'- ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA -3'
 - Startery wewnętrzne PEANT1: 5'- TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC -3' oraz PEANT2: 5'- GCA ACC TTG TGC CCT TTA -3'
- 1.5. Wielkość amplikonu wynosi 391pz.
- 1.6. Enzym: badania dotyczące testu zostały przeprowadzone z użyciem polimerazy DNA z firmy Biotools.

2. Metody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych: w Załączniku 6 opisano trzy metody ekstrakcji DNA z materiału roślinnego. Metody ekstrakcji DNA zostały sprawdzone w przeprowadzonych badaniach.
- 2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (ul)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		36,25	
PCR bufor	10x	5,00	1x
MgCl ₂	50mM	3,00	3mM
dNTPs	10mM	0,50	0,1mM każdego z nukleotydów
PEANT1	10 μM	1,00	0,2μM
PEANT2	10 μM	1,00	0,2μM
AJ75	0,1 μM	0,32	0,00064μM
AJ76	0,1 μM	0,32	0,00064μM
Polimeraza Tag	5 U /μl	0,60	3 U
Razem		48,00	
DNA		2,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		50,00	

- 2.3. Warunki reakcji PCR: 94°C przez 4 min a następnie 25 cykli w temp. 94°C przez 60 s i 72°C przez 90 s. Ten pierwszy etap PCR poprzedza drugi etap denaturacji w tym samym termocyklerze w temp. 94°C przez 4 minuty i 40 cykli w temp. 94°C przez 60 s, w temp. 56°C przez 60 s, i w temp. 72°C przez 60 s, ostatni etap w temp. 72°C przez 10 min i oziębienie w temp. 15°C.
- 2.4. Obserwacje: jeśli koncentracja poszukiwanego organizmu jest wysoka np. w próbkach wzbogaconych zaleca się wykonanie przed amplifikacją dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny oczyszczonego DNA w wodzie lub w buforze TE w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację należy przeprowadzić na roztworze wyjściowym i rozcieńczeniu.

3. Najważniejsze informacje proceduralne

3.1. Kontrole:

W celu uzyskania rzeczywistych wyników testu należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole dla każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.

- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników:

Weryfikacja kontroli

- NIC i NAC nie powinny produkować amplikonów
- PIC, PAC powinny produkować amplikony o wielkości 391 pz
- W przypadku użycia IPC amplikony powinny uzyskać oczekiwaną wielkości

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli zostaną uzyskane amplikony o wielkości 391 pz
- Test należy uznać za negatywny jeśli wyprodukowane zostaną prążki innej wielkości lub nie zostaną wyprodukowane żadne prążki.
- Testy należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne przebadane kryteria

Przebadane kryteria są dostępne dla testu PCR bez wzbogacania.

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (zgodnie z przeprowadzonymi badaniami w roku 2010)
10³-10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA zgodnie z Llop *et al.* (1999) i zgodnie z modyfikacją Taylor *et al.* (2001)
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej zgodnie z Llop *et al.* (2000)

- Przebadane organizmy docelowe: 71 szczepów, wszystkie pozytywne
Przebadane organizmy inne niż docelowe: 40 szczepów, wszystkie negatywne
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 98%
 - 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 96%

Załącznik 12- Real-time PCR (Pirc *et al.*, 2009)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Testy Real-time PCR proponowane przez Pirc *et al.* (2009) są oparte na sekwencji chromosomalnej.
- 1.2. Test może mieć zastosowanie do każdego rodzaju materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Genami docelowymi są *amsC* (Ams) i 16S-23S rRNA region przestrzeni między genowej (ITS).
W badaniach przeprowadzonych w latach 2009 i 2010 zostały sprawdzone tylko startery z genu *amsC*.
- 1.4. Oligonukleotydy:
Ams116F: 5'- TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA -3'
Ams189R: 5'- GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG -3'
Ams141T: FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA
ITS15F: 5'- TGA GTA ATG AGC GAG CTA AGT GAA G -3'
ITS93R: 5'- CGC AAT GCT CAT GGA CTC AA -3'
ITS43T: FAM-AGG CGT CAG CGC GCA GCA AC-TAMRA
- 1.5. Wielkość amplikonu wyrażona w ilości par zasad (włączając sekwencje starterów):
Startery Ams 74 pz; startery ITS 79 pz.
- 1.6. Enzym: Dołączony do zestawu TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA).
- 1.7. System Real-time PCR np. ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) używając dla wszystkich amplikonów uniwersalnych warunków cykli.

2. Metody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego: użyte zostały trzy metody ekstrakcji DNA: (i) z użyciem kolumn sylikonowych z zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); (ii) z użyciem kulek magnetycznych z zestawu QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile, Turku, Finlandia) z systemem KingFisher ml (Thermo Labssystem); oraz (iii) prosta metoda ekstrakcji (Llop *et al.*, 1999). Zestaw DNeasy Plant Mini Kit został użyty zgodnie z protokołem producenta w celu oczyszczenia całkowitego DNA z tkanki roślinnej z końcowym oczyszczeniem DNA w 2 x 50 µl buforu AE. Protokół ekstrakcji przy użyciu zestawu QuickPick™ SML Plant DNA Kit jest następujący: 100 µl próbki wymieszać z 400 µl buforu do lizy i 25 µl proteinazy K, inkubować przez 30 minut w temp. 65°C i odwirować przy prędkości 6000 g przez 1 minutę. Następnie 300 µl lizatu przenieść do próbówki 1 w pasku ml próbówek KingFisher. Paski zawierają 20 µl MagaZorb™ Magnetic Particles i 500 µl buforu obciążającego (próbówka 1), 800 µl buforu płuczającego (próbówki 2 i 3), 100 µl buforu do elucji (próbówka 4) i 100 µl wody (próbówka 5). Programowanie urządzenia

Total_RNA_ml_1 w KingFisherR ml został użyty z małą modyfikacją: czas wybarwiania w studzience A, 3 x 1 min dwie minuty wiązania; wypłukać studzienkę B przez 15 s; wypłukać studzienkę C przez 15 s; elucja w studzience D przez 10 min. Procedura ekstrakcji próbki została przeprowadzona zgodnie z protokołem opracowanym przez Llop *et al.*, (1999) przedstawionym w Załączniku 6, należy zwrócić uwagę, że używa się tylko 100 µl roztworu czystego ekstraktu próbki (Pirc *et al.*, 2009).

2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (dla protokołu z użyciem starterów Ams)

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (µl)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		1,00	
Tag Man -uniwersalny master miks (Applied Biosystems)	2x	5,00	1x
Ams 116F	10 µM	0,90	0,9 µM
Ams 189R	10 µM	0,90	0,9 µM
Ams 141T	10 µM	0,20	0,2 µM
Razem		8,00	
DNA		2,00	
Całkowita objętość pojedynczej reakcji PCR		10,00	

2.3. Warunki reakcji PCR: 2 min w temp. 50°C, 10 min w temp. 95°C, 40 cykli po 15 s w temp. 95°C i 1 min w temp. 60°C.

2.4. Uwaga: jeśli stężenie oczekiwanego produktu jest wysokie np. w próbkach poddanych wzbogaceniu zaleca się wykonanie przed amplifikacją dziesięciokrotnych rozcieńczeń oczyszczonego DNA w wodzie lub buforze w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację należy wykonać z wykorzystaniem roztworu wyjściowego i rozcieńczenia.

Najważniejsze informacje proceduralne

3.1. Kontrole:

W celu uzyskania rzeczywistych wyników testu należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole dla każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz

następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).

- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników:

Ilość cykli dla tego testu wynosi 38 i można wynik ten otrzymać przy użyciu wyposażenia/materiałów i odczynników opisanych w tym załączniku. Jeśli to konieczne wartość Ct powinna być określona dla wymaganej kontroli (np. kiedy użyta została wewnętrzna kontrola pozytywna). Ilość cykli stanowiących oczekiwaną wartość należy zweryfikować w każdym laboratorium, jeśli test ten wprowadzony został po raz pierwszy

Weryfikacja kontroli

- Należy określić krzywe amplifikacji dla PIC, PAC
- NIC i NAC nie powinny być negatywne ($Ct \geq 40$)
- PIC, PAC (a jeśli to konieczne IPC) powinny mieć wartość Ct poniżej wyznaczonej wartości

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli powstanie określona krzywa amplifikacji, a wartość $Ct < 38$
- • Test należy uznać za negatywny, jeśli nie powstanie określona krzywa amplifikacji, a wartość $Ct \geq 40$.
- • Test należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników lub gdy wartość Ct jest pomiędzy 38 i 40.

4. Dostępne przebadane kryteria

Przebadane kryteria są dostępne dla testu PCR bez wzbogacania.

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej
Dane walidacyjne dostępne z testów przeprowadzonych w roku 2010
10³-10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA zmodyfikowanej zgodnie z Llop *et al.* (1999), Taylor *et al.* (2001) i RED-Extract-N-AmpTkit.
Dane walidacyjne dostępne z National Biology Institute, SL
2 x 10³ jednostek tworzących kolonie/ml DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen),
9 x 10² jednostek tworzących kolonie/ml QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile, Turku, Finlandia), (dane pochodzące z National Biology Institute, SL)
1 x 10⁴ jednostek tworzących kolonie/ml zgodnie z Llop *et al.* (1999) (dane pochodzące z National Biology Institute, SL)
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej
Przebadane organizmy docelowe: 423 szczepy, wszystkie pozytywne
Przebadane organizmy inne niż docelowe: 97 szczepów, wszystkie negatywne
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 98% z
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 94%

Załącznik 13- Real-time PCR (Gottsberger, 2010)

1. Informacje ogólne

- 1.1. Real-time PCR został opisany jako metoda wykrywająca hipotetyczny gen kodujący białko (Gottsberger, 2010). Dokładność testów przeprowadzonych w roku 2010 nie mogła obejmować tego testu real-time PCR, jednakże test ten został sprawdzony przez jedno laboratorium równoległe z testem real-time PCR opisanym przez Pirc *et al.* (2009) i dał takie same wyniki w zakresie jakości jak wyniki ekstrakcji DNA według protokołu Llop *et al.* (1999).
- 1.2. Test ten może mieć zastosowanie do każdego materiału roślinnego lub kolonii bakterii.
- 1.3. Poszukiwana sekwencja jest zlokalizowana w chromosomie.
- 1.4. Oligonukleotydy:
hpEaF: 5' - CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA -3'
hpEaR: 5' - AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT -3'
hpEaP: FAM-TCG TCG AAT GCT GCC TCT CT-MGB
- 1.5. Wielkość ampliconu wyrażona w parach zasad wynosi (włączając sekwencję starterów): 138 pz
- 1.7. Enzym: dołączony do TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA).
- 1.6. System do odczytu testu Real-time PCR np. Eppendorf Realplex4 Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2. Methody

- 2.1. Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego: przetestowanych zostało kilka metod ekstrakcji DNA: (i) przy użyciu kolumn sylikonowych zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); (ii) przy użyciu kulek magnetycznych zestawu QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile, Turku, Finlandia) oraz (iii) prosta metoda ekstrakcji próbek według (Llop *et al.*, 1999). Zestaw DNeasy Plant Mini Kit został użyty zgodnie z protokołem producenta dotyczącym oczyszczania całkowitego DNA z tkanki roślinnej uzyskując końcową ilość wyekstrahowanego DNA w 1 x 100 µl buforu AE. Protokół

do ekstrakcji przy użyciu QuickPick™ SML Plant DNA Kit został opracowany zgodnie z instrukcją producenta. Procedura pojedynczej ekstrakcji została przeprowadzona zgodnie z protokołem opracowanym przez Llop *et al.*, (1999). Dalsze użyte protokoły zostały opisane przez Stöger *et al.* (2006) i Persen *et al.* (2011).

2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (ul)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		6,00	
Tag Man -uniwersalny master miks (Applied Biosystems)	2x	10,00	1x
MgCl ₂	Dołączony do mastermiksu		Dołączony do mastermiksu
dNTPs	Dołączony do mastermiksu		Dołączony do mastermiksu
hpEaF	10 µM	1,00	0,5 µM
hpEaR	10 µM	1,00	0,5 µM
hpEaP	1 µM	1,00	0,05 µM
Polimeraza Tag	Dołączony do mastermiksu		Dołączony do mastermiksu
Razem		19,00	
DNA		1,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		20,00	

2.3. Warunki cykli PCR: 2 min w temp. 50°C, 10 min w temp. 95°C, 50 cykli po 15 s w temp. 95°C i 1 min. w temp. 60°C).

2.4. Obserwacje: jeśli stężenie oczekiwanego produktu jest wysokie np. w próbkach wzbogaconych zaleca się wykonanie dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawiesiny oczyszczonego DNA w wodzie lub w buforze TE przed amplifikacją w celu rozcieńczenia składników inhibujących. Amplifikację należy wykonać na roztworze wyjściowym i rozcieńczeniu.

3. Szczegółowe informacje proceduralne

3.1. Kontrole:

W celu uzyskania rzeczywistych wyników testu należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole dla każdej serii izolacji i amplifikacji poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego.

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja oraz amplifikacja kwasów nukleinowych z próbki tkanki nie zainfekowanej rośliny żywicielskiej lub czysty bufor ekstrakcyjny.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu sprawdzenia że wyizolowane zostały kwasy nukleinowe o odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych oraz następująca po niej amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki, która zawiera poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka żywicielska lub tkanka żywicielska zainfekowana w sposób sztuczny poszukiwanym organizmem).
- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia reakcji fałszywie pozytywnych z powodu kontaminacji podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która używana jest do przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki żywicielskiej, całkowite genomowe zamplifikowane DNA lub kontrolę syntetyczną (np. sklonowany produkt PCR). W przypadku testów PCR wykonanych nie na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC) można użyć w celu monitorowania każdej próbki z osobna wewnętrznych kontroli pozytywnych (IPC). Pozytywne kontrole wewnętrzne mogą albo być obecne w genach matrycy DNA lub dodane do roztworu DNA.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywnie mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników:

Ilość cykli dla tego testu wynosi 48 i można wynik ten otrzymać przy użyciu wyposażenia/materiałów i odczynników opisanych w tym załączniku. Jeśli to konieczne wartość Ct powinna być określona dla wymaganej kontroli (np. kiedy użyta została wewnętrzna kontrola pozytywna). Ilość cykli stanowiących oczekiwaną wartość należy zweryfikować w każdym laboratorium, jeśli test ten wprowadzony został po raz pierwszy

Weryfikacja kontroli

- Należy określić krzywe amplifikacji dla PIC, PAC
- NIC i NAC nie powinny być negatywne ($Ct \geq 50$)
- PIC, PAC (a jeśli to konieczne IPC) powinny mieć wartość Ct poniżej wyznaczonej wartości

Kiedy te warunki są spełnione:

- Test należy uznać za pozytywny jeśli powstanie określona krzywa amplifikacji, a wartość $Ct < 48$
- Test należy uznać za negatywny, jeśli nie powstanie określona krzywa amplifikacji, a wartość $Ct \geq 50$.

- • Test należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników lub gdy wartość Ct jest pomiędzy 48 i 50.

4. Dostępne przebadane kryteria (dane z AGES, AT, 2010)

Test ten nie został podsumowany w przeprowadzonych badaniach

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (na podstawie Gottsberger, 2010)
2x10³ jednostek tworzących kolonie/ml
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej (na podstawie Gottsberger, 2010)
Testowane organizmy docelowe: 71szczerpów, wszystkie pozytywne
Testowane organizmy inne niż docelowe: 41szczerpów, wszystkie negatywne.
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla AGES: 100%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla AGES: 100%

Załącznik 14- Pośrednia izotermalna amplifikacja z uzyciem ezy (LAMP)

1. Informacje ogólne

Test ten został opracowany przez Temple *et al.* (2007) i Temple & Johnson (2011), i sprawdzony w badaniach wykonanych w roku 2010, został uznany jako odpowiedni do stosowania w laboratoriach, które nie są wyposażone w sprzęt do testu PCR, a także jest prosty i łatwy do wykonania w przypadku badania próbek roślinnych wykazujących objawy chorobowe oraz identyfikacji bakterii. Ponadto sekwencja została oparta o plazmid pEA29 i test ten wykazał odpowiednią czułość do analizowania próbek z niską populacją bakterii, poniżej 10⁵ jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego. Test ten może mieć zastosowanie do każdego rodzaju materiału roślinnego po ekstrakcji DNA jak to zostało przedstawione w Załączniku 6 oraz do kolonii bakterii bez ekstrakcji DNA.

Startery LAMP do wykrywania *amsL B*:

ALB Fip: 5'-CTG CCT GAG TAC GCA GCT GAT TGC ACG TTT TAC AGC TCG CT-3';

ALB Bip: 5'-TCG TCG GTA AAG TGA TGG GTG CCC AGC TTA AGG GGC TGA AG-3';

ALB F: 5'-GCC CAC ATT CGA ATT TGA CC-3';

ALB B: 5'- CGG TTA ATC ACC GGT GTC A-3'.

2. Metody

Temperatura topnienia dla starterów wynosi pomiędzy 58 a 60°C.

Mieszanina dla reakcji LAMP:

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (ul)	Stężenie końcowe
Woda o czystości molekularnej		24,60	
10 x ThermoPol bufor	10x	5,00	1x
dNTPs	10 mM	5,00	1,0 mM
MgCl ₂	100 mM	2,00	4,0 mM

BSA	10 mg/ml	2,00	0,4 mg/ml
ALB FIP	100 μ M	(1,2)	2,4 μ M
ALB BIP	100 μ M	(1,2)	2,4 μ M
ALB F	10 μ M	1,00	0,2 μ M
ALB B	10 μ M	1,00	0,2 μ M
<i>Bst</i> DNA Polimeraza	8 U/ μ l	2,00	16 U na reakcję
Razem		45,00	
DNA		5,00	
Całkowita objętość reakcji pojedynczej reakcji PCR		50,00	

Przed przystąpieniem do reakcji LAMP ustawić łaźnię wodną na temperaturę 65°C lub termocykler na temperaturę 65°C przez 55 minut. Przygotować mieszaninę i pobrać pipetą po 24,6 μ l wody o czystości molekularnej do każdej próbówki reakcyjnej PCR o pojemności 0,2 ml, następnie pobrać pipetą 18,4 μ l mieszaniny master mix (zobacz tabelę powyżej) do każdej pojedynczej próbówki reakcyjnej PCR, a następnie dodać pipetą po 2 μ l *Bst* DNA polimerazy do każdej próbówki reakcyjnej PCR. Na koniec dodać pipetą 5 μ l matrycy DNA. Zwirować próbówki przez 30 s. Umieścić próbówki w łaźni wodnej w statywie (65°C) tak więc koniec reakcji odbywa się pod wodą w łaźni wodnej, lub w termocyklerze (ustawionych na temp. 65°C) przez 55 min. Probówki wyjąć i pozwolić im ostygnąć przez około 10 s w temperaturze pokojowej. Obserwować próbówki poszukując wytrącenia się osadu, próbówka mętna lub stały biały osad na dnie próbówki (wskazują na reakcję pozytywną). Przezroczysty roztwór wskazuje na reakcję negatywną.

3. Szczegółowe informacje proceduralne

3.1. Kontrole

W celu uzyskania rzeczywistych wyników testu należy dołączyć następujące (zewnątrzne) kontrole dla każdej serii izolacji i amplifikacji odpowiednio poszukiwanego organizmu i poszukiwanego kwasu nukleinowego:

- Kontrola negatywna izolacji (NIC) w celu monitorowania kontaminacji podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych: ekstrakcja i następnie amplifikacja próbki zawierającej nieporażoną tkankę rośliny żywicielskiej (w przypadku pracy z materiałem roślinnym) lub czysty bufor ekstrakcyjny (w przypadku pracy z czystą kulturą); 1 do serii ekstrakcji DNA.
- Kontrola pozytywna izolacji (PIC) w celu upewnienia się, że zostały wyizolowane kwasy nukleinowe w odpowiedniej ilości i jakości: ekstrakcja kwasów nukleinowych a następnie amplifikacja poszukiwanego organizmu lub matrycy próbki zawierającej poszukiwany organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka rośliny żywicielskiej lub skontaminowana poszukiwanym organizmem tkanka rośliny żywicielskiej); 1 do serii ekstrakcji DNA.

- Kontrola negatywna amplifikacji (NAC) w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych spowodowanych kontaminacją podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: amplifikacja wody o czystości molekularnej, która została użyta do przygotowania mieszaniny reakcyjnej; 1 dla serii LAMP.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (PAC) w celu monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasów nukleinowych poszukiwanego organizmu. Może ona zawierać kwasy nukleinowe wyekstrahowane z poszukiwanego organizmu, całkowite kwasy nukleinowe wyekstrahowane z zainfekowanej tkanki rośliny żywicielskiej, całkowite zamplifikowane genomowe DNA lub syntetyczną kontrolę (np. sklonowany produkt PCR); 1 dla serii LAMP. Dla testów PCR nie wykonanych na koloniach bakterii, PAC powinna być bliska poziomowi wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) do zewnętrznych kontroli pozytywnych (PIC i PAC), wewnętrzne kontrole pozytywne (IPC) mogą zostać użyte w celu monitorowania każdej indywidualnej próbki osobno. Wewnętrznymi kontrolami pozytywnymi mogą być albo geny obecne w matrycy DNA lub DNA dodane do zawiesiny.

Alternatywne wewnętrzne kontrole pozytywne mogą zawierać:

- Specyficzną amplifikację lub co-amplifikację endogenicznego kwasu nukleinowego przy użyciu określonych starterów które amplifikują określony kwas nukleinowy nie poszukiwanego organizmu, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej oksydazy cytochromowej lub eukariotyczne 18S rDNA)
- amplifikację próbek zainokulowanych egzogenicznym kwasem nukleinowym (sekwencja kontrolna), który nie ma związku z poszukiwanym kwasem nukleinowym (np. syntetyczne wewnętrzne kontrole amplifikacji) lub amplifikacja podwojonej próbki zainokulowanej kwasami nukleinowymi poszukiwanego organizmu.

3.2. Interpretacja wyników

Weryfikacja kontroli

- NIC i NAC nie powinny produkować zmętnienia.
- PIC, PAC (a jeśli to konieczne IPC) powinny produkować oczekiwane zmętnienie.

Jeśli te warunki zostaną spełnione:

- Test zostanie uznany za pozytywny jeśli zostanie wyprodukowane zmętnienie
- Test zostanie uznany za negatywny jeśli nie zostanie wyprodukowane zmętnienie
- Testy należy powtórzyć w przypadku otrzymania jakichkolwiek niepewnych lub niejasnych wyników.

4. Dostępne przebadane kryteria

- 4.1. Dane dotyczące czułości analitycznej (na podstawie wyników uzyskanych w przeprowadzonych badaniach w roku 2010): 10^5 - 10^6 jednostek tworzących kolonie/ml ekstraktu roślinnego po ekstrakcji DNA według Taylor *et al.* (2001).
- 4.2. Dane dotyczące specyficzności analitycznej zgodnie z Temple *et al.* (2011)
Przebadane organizmy docelowe: 10 szczepów, wszystkie pozytywne (za wyjątkiem dzikich szczepów pEA29).
Przebadane organizmy inne niż docelowe: 30 szczepów, wszystkie negatywne
- 4.3. Dane dotyczące powtarzalności
Dla IVIA: 96%
- 4.4. Dane dotyczące odtwarzalności
Dla IVIA: 90%

Załącznik 15 Testy patogeniczności

Inokulacja zawiązków owoców (wrażliwe odmiany gruszy, jabłoni lub nieśplika japońskiego) należy przeprowadzić na całych zdezynfekowanych niedojrzałych owocach lub ich plastrach, używając 10 μ l zawiesiny kolonii o gęstości 10^9 jednostek tworzących kolonie/ml w buforze PBS (Załącznik 2). Włączając kontrolę pozytywną i negatywną. Inkubować w wilgotnej komorze w temp. 25 °C przez 3–7 dni. Pozytywny wynik testu na owocach polega na brązowieniu wokół nakłuc oraz wypływie bakterii po upływie 3–7 dni (pod warunkiem, że kontrole negatywne nie wykazały uszkodzeń lub tylko nekrozy wokół nakłuc). W przypadku wszystkich inokulacji roślin używać należy wrażliwych odmian grusz, jabłoni lub nieśplika japońskiego lub wrażliwych odmian *Crataegus*, *Cotoneaster* lub *Pyracantha*. W celu inokulacji roślin doniczkowych należy naciąć główne naczynie młodego liścia z młodych gałązek za pomocą sekatora zanurzonego w zawiesinie o gęstości 10^9 jednostek tworzących kolonie/ml buforu PBS dla każdej badanej kolonii bakterii (Załącznik 1).

W ten sam sposób mogą być inokulowane oderwane młode gałązki roślin pochodzących ze szklarni, po dezynfekcji przez 30 s w 70% etanolu i 3-krotnym płukaniu w sterylnej wodzie destylowanej i przechowywaniu w probówkach z 1% agarem. Przechowywać rośliny lub próbki w temp. 20–25 °C w wilgotności 80–100% przez 16 h w oświetleniu. Wyniki odczytywać po 3, 7 i 15 dniach. Typowe objawy dla bakterii *E. amylovora* włączając więdnienie, przebarwienia, nekrozy i wycieki śluzu powinny zostać reizolowane z zainokulowanych zawiązków, roślin lub gałązek wykazujących typowe objawy a następnie należy potwierdzić ich identyczność.