SMERNICA KOMISIE 2006/63/ES

zo 14. júla 2006,

ktorou sa menia a dopĺňajú prílohy II až VII k smernici Rady 98/57/ES o potláčaní choroby *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 98/57/ES z 20. júla 1998 [1] o potláčaní choroby *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, a najmä na jej článok 11,

keďže:

(1) Jedným z významných organizmov, ktoré škodia zemiakom a rajčiakom, je *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, patogén hnedej hniloby zemiakov a baktériového vädnutia zemiakov a rajčiakov (ďalej len „organizmus“).

(2) Tento organizmus sa ešte stále vyskytuje v určitých častiach Spoločenstva.

(3) V smernici 98/57/ES sa ustanovili podrobné pravidlá, ktoré sa majú proti tomuto organizmu v členských štátoch prijať, na zisťovanie prítomnosti tohto organizmu a jeho rozšírenia; predchádzanie jeho výskytu a šírenia; a v prípade jeho zistenia na zamedzenie jeho šírenia a na jeho potlačenie s cieľom vyhubenia.

(4) Odvtedy sa dosiahol významný pokrok v chápaní biológie, postupov zisťovania a identifikácie tohto organizmu, okrem toho praktické skúsenosti nadobudnuté pri potláčaní tohto organizmu si vyžadujú preskúmanie niekoľkých technických ustanovení súvisiacich s opatreniami na jeho potlačenie.

(5) V dôsledku tohto pokroku sa zdá byť potrebné preskúmať a aktualizovať opatrenia obsiahnuté v určitých prílohách k smernici 98/57/ES.

(6) Pokiaľ ide o postupy zisťovania prítomnosti a identifikácie, zavádza sa moderná metóda zisťovania fluorescenčnou hybridáciou in situ (FISH). Zavádza sa aj zdokonalená metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ako aj zdokonalenia rôznych technických prvkov súčasného postupu zisťovania prítomnosti a identifikácie a patria sem metódy zisťovania prítomnosti a identifikácie organizmu v iných hostiteľských rastlinách ako sú zemiaky, vo vode a v pôde.

(7) Pokiaľ ide o technické prvky ochranných opatrení, zdokonalené ustanovenia sa zameriavajú na: spôsob konzervovania testovaných vzoriek, aby sa zaistilo spätné vystopovanie organizmu, prvky potrebné na stanovenie rozsahu pravdepodobnej kontaminácie, podrobný postup pri oznamovaní akejkoľvek potvrdenej prítomnosti organizmu a relevantnej kontaminovanej oblasti, opatrenia, ktoré sa majú uplatniť na miestach produkcie, ktoré boli označené za kontaminované a nachádzajúce sa v rámci vymedzených oblastí. Zaviedli sa aj určité ustanovenia pre rajčiaky, aby bolo možné viac zohľadniť význam tejto rastliny ako hostiteľa tohto organizmu.

(8) Opatrenia stanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho fytosanitárneho výboru,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Prílohy II až VII k smernici 98/57/ES sa týmto nahrádzajú zodpovedajúcimi zneniami v prílohe k tejto smernici.

Článok 2

1. Členské štáty najneskôr do 31. marca 2007 prijmú a uverejnia zákony, iné právne predpisy a správne ustanovenia, ktoré musia byť v súlade s touto smernicou. Bezodkladne oznámia Komisii znenie týchto ustanovení a korelačnú tabuľku medzi týmito ustanoveniami a touto smernicou.

Tieto ustanovenia sa uplatňujú od 1. apríla 2007.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu. Spôsob a formu tohto odkazu upravia členské štáty.

[1] Ú. v. ES L 235, 21.8.1998, s. 1.

2. Členské štáty okamžite oznámia Komisii znenie hlavných ustanovení vnútroštátnych zákonov, ktoré prijmú v oblasti pôsobnosti tejto smernice.

Článok 3

Táto smernica nadobúda účinnosť tretím dňom po jej uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.

Článok 4

Táto smernica je určená členským štátom.

V Bruseli 14. júla 2006

Za Komisiu
Markos KYPRIANOU
člen Komisie

PRÍLOHA

„PRÍLOHA II

TESTOVACIA SCHÉMA NA DIAGNOSTIKU, URČOVANIE PRÍTOMNOSTI A IDENTIFIKÁCIU *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI *ET AL.*

ROZSAH TESTOVACEJ SCHÉMY

V tejto schéme sa opisujú rozličné postupy používané pri:

i) diagnostike hnedej hniloby v hľuzách zemiakov a baktériového vädnutia rastlín zemiakov, rajčiakov a niektorých iných hostiteľských rastlín;

ii) určovaní prítomnosti *Ralstonia solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov, v hostiteľských rastlinách zemiakov, rajčiakov a iných vo vode a pôde;

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

OBSAH

		Strana
	Základné princípy	40
ODDIEL I:	Aplikácia testovacej schémy	40
	1. Schéma určovania prítomnosti hnedej hniloby a baktériového vädnutia (*R. solanacearum*) hľúz zemiakov a rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných hostiteľských rastlín s príznakmi hnedej hniloby alebo baktériového vädnutia	40
	2. Schéma určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov bez príznakov	43
	3. Schéma určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných hostiteľských rastlín bez príznakov	46
ODDIEL II:	Podrobné metódy určovania prítomnosti *R. solanacearum* v hľuzách zemiakov a v rastlinách zemiakov, rajčiakov alebo v iných hostiteľských rastlinách s príznakmi hnedej hniloby alebo baktériového vädnutia	48
	1. Príznaky	48
	2. Skríningové testy	48
	3. Postup izolácie	49
	4. Identifikačné testy *R. solanacearum*	49
ODDIEL III:	1. Podrobné metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov bez príznakov	49
	1.1. Príprava vzoriek	49
	1.2. Testovanie	51
	2. Podrobné metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných rastlín bez príznakov	51
	2.1. Príprava vzorky	51
	2.2. Testovanie	52
ODDIEL IV:	1. Systém určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vode	53
	2. Metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vode	55
	2.1. Príprava vzorky	55
	2.2. Testovanie	55
ODDIEL V:	1. Systém určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* v pôde	56
	2. Metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* v pôde	58
	2.1. Príprava vzorky	58
	2.2. Testovanie	58

Strana

ODDIEL VI: Optimalizované protokoly na určovanie prítomnosti a identifikáciu *R. solanacearum* 58

A. Diagnostické testy a testy na určovanie prítomnosti 58

1. Test vytekania baktériového slizu zo stonky 58
2. Určovanie prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu 58
3. Testy sérologickej aglutinácie 59
4. Selektívna izolácia 60
   - 4.1. Selektívny platňový rozter 60
   - 4.2. Obohacovanie 60
5. Imunofluorescenčný test (IF test) 61
6. Test polymerázovej reťazovej reakcie (test PCR) 64
   - 6.1. Metódy čistenia DNA 65
     - a) Metóda podľa Pastrika (2000) 65
     - b) Iné metódy 65
   - 6.2. Test PCR 66
   - 6.3. Analýza produktu PCR 66
7. Test flourescenčnej hybridizácie in situ (test FISH) 67
8. Testy enzýmovej imunoanalýzy (ELISA) 69
   - a) Nepriamy test ELISA 69
   - b) Test DASI ELISA (sendvičová metóda enzýmovej imunoanalýzy ELISA) 70
9. Biotest 71

B. Identifikačné testy 72

1. Nutričné a enzymatické identifikačné testy 72
2. Test IF 72
3. Test ELISA 73
4. Test PCR 73
5. Test FISH 73
6. Profilovanie mastných kyselín (FAP) 73
7. Metódy pre charakterizáciu kmeňa 73
   - 7.1. Určenie biovaru 73
   - 7.2. Genómová daktyloskopia 74
   - 7.3. Metódy PCR 74

C. Konfirmačný test 74

Dodatok 1 Laboratóriá zúčastnené na optimalizácii a validácii protokolov 76

Dodatok 2 Médiá na izoláciu a kultiváciu *R. solanacearum* 77

Dodatok 3 A. Štandardný komerčne dostupný normalizovaný materiál 79

B. Príprava pozitívnych a negatívnych kontrol pre skríningové testy výrezkov PCR/IF a FISH 80

Dodatok 4 Pufre pre testovacie postupy 82

Dodatok 5 Určovanie stupňa kontaminácie pri testoch IF a FISH 85

Dodatok 6 Validované protokoly a reagenty 86

Dodatok 7 Validované reagenty pre test FISH 91

Dodatok 8 Pestovanie rajčiakov a baklažánov 93

Bibliografia 94

ZÁKLADNÉ PRINCÍPY

V dodatkoch sa uvádzajú optimalizované protokoly rôznych metód, validované činidlá a podrobné pokyny na prípravu testovaných a kontrolných materiálov. V dodatku 1 sa nachádza zoznam laboratórií, ktoré sa podieľali na optimalizácii a validácii protokolov.

Keďže v protokoloch ide o zisťovanie karanténnych organizmov a zahŕňajú použitie živých kultúr *R. solanacearum* ako kontrolných materiálov, postupy bude potrebné uskutočňovať vo vhodných karanténnych podmienkach s primeranými zariadeniami na likvidáciu odpadov a za podmienky príslušného povolenia vydaného príslušnými úradmi pre karanténu rastlín.

Parametre testovania musia zabezpečiť konzistentné a reprodukovateľné odhalenie stupňov výskytu *R. solanacearum* pri stanovených prahových hodnotách zvolenej metódy.

Presná príprava pozitívnej kontroly je nevyhnutná.

Testovanie podľa požadovaných prahových hodnôt zahŕňa aj správne nastavenie, údržbu a kalibráciu zariadení, opatrnú manipuláciu s činidlami a ich starostlivé uchovávanie a dodržiavanie všetkých opatrení na predchádzanie kontaminácie medzi vzorkami, t. j. oddelenia pozitívnej kontroly od testovaných vzoriek. Musia sa uplatňovať normy na kontrolu kvality, aby nedochádzalo k administratívnym a iným omylom, najmä pokiaľ ide o označovanie a dokumentáciu.

Podozrenie na výskyt, ako sa uvádza v článku 4 ods. 2 smernice 98/57/ES, znamená pozitívny výsledok pri diagnostických alebo skríningových testoch uskutočnených na vzorke, ako sa určuje v nižšie uvedených vývojových diagramoch. Pozitívny prvý skríningový test (IF test, PCR/FISH, selektívna izolácia) sa musí potvrdiť druhým skríningovým testom založeným na inom biologickom princípe.

Ak je prvý skríningový test pozitívny, potom je podozrenie na kontamináciu *R. solanacearum* a musí sa urobiť druhý skríningový test. Ak je pozitívny druhý skríningový test, potom sa podozrenie potvrdí (podozrenie na výskyt) a testovanie podľa systému musí pokračovať. Ak je druhý skríningový test negatívny, vzorka sa nepovažuje za kontaminovanú *R. solanacearum*.

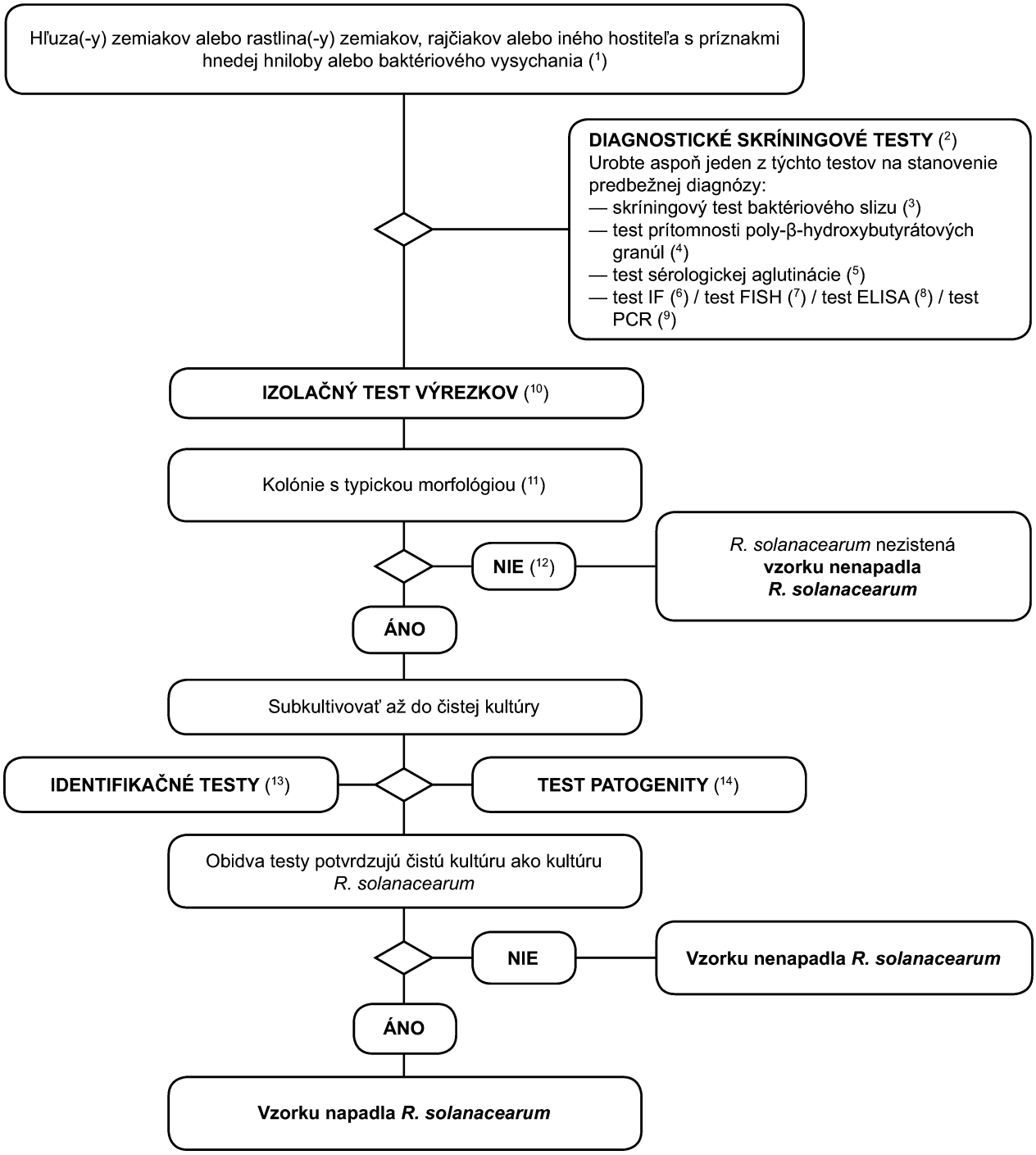
Potvrdená prítomnosť, ako sa uvádza v článku 5 ods. 1) smernice 98/57/ES, znamená izoláciu a identifikáciu čistej kultúry *R. solanacearum* s potvrdenou patogenitou.

ODDIEL I

APLIKÁCIA TESTOVACEJ SCHÉMY

1. **Schéma určovania prítomnosti hnedej hniloby a baktériového vädnutia (*Ralstonia solanacearum*) hľúz zemiakov a rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných hostiteľských rastlín s príznakmi hnedej hniloby alebo baktériového vädnutia**

   Testovanie je určené pre hľuzy zemiakov a rastliny s typickými príznakmi hnedej hniloby alebo cievneho vädnutia alebo s podozrením na ne. Zahŕňa skríningový test, izoláciu patogénu z infikovaného cievneho pletiva na (selektívnom) médiu a v prípade pozitívneho výsledku identifikáciu kultúry ako *Ralstonia solanacearum*.


Hľuza(-y) zemiakov alebo rastlina(-y) zemiakov, rajčiakov alebo iného hostiteľa s príznakmi hnedej hniloby alebo baktériového vysychania (1)
DIAGNOSTICKÉ SKRÍNINGOVÉ TESTY (2)
Urobte aspoň jeden z týchto testov na stanovenie predbežnej diagnózy:
— skríningový test baktériového slizu (3)
— test prítomnosti poly-β-hydroxybutyrátových granúl (4)
— test sérologickej aglutinácie (5)
— test IF (6) / test FISH (7) / test ELISA (8) / test PCR (9)
IZOLAČNÝ TEST VÝREZKOV (10)
Kolónie s typickou morfológiou (11)
NIE (12)
R. solanacearum nezistená vzorku nenapadla R. solanacearum
ÁNO
Subkultivovať až do čistej kultúry
IDENTIFIKAČNÉ TESTY (13)
TEST PATOGENITY (14)
Obidva testy potvrdzujú čistú kultúru ako kultúru R. solanacearum
NIE
Vzorku nenapadla R. solanacearum
ÁNO
Vzorku napadla R. solanacearum

([1]) Popis príznakov sa nachádza v oddiele II.1.

([2]) Ríningové testy uľahčujú určenie predbežnej diagnostiky, ale nie sú rozhodujúce. Negatívny výsledok vždy nezaručuje neprítomnosť patogénu.

([3]) Skríningový test baktériového slizu z cievnych zväzkov stonky sa popisuje v oddiele VI.A.1.

([4]) Test prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu v bunkách baktérií sa popisuje v oddiele VI.A.2.

([5]) Testy sérologickej aglutinácie na baktériovom slize alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisujú v oddiele VI.A.3.

([6]) Test IF na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisuje v oddiele VI.A.5.

([7]) Test FISH na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisuje v oddiele VI.A.7.

([8]) Test ELISA na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisuje v oddiele VI.A.8.

([9]) Test PCR na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisuje v oddiele VI.A.6.

([10]) Patogén sa zvyčajne dá ľahko izolovať z rastlinného materiálu s príznakmi riedeným platňovým rozterom (oddiel II.3).

([11]) Kolónia s typickou morfológiou sa popisuje v oddiele II.3.d.

([12]) Kultivácia môže byť neúspešná kvôli pokročilým štádiám infekcie spôsobenej konkurenčnými alebo príliš rozmnoženými saprofytickými baktériami. Ak sú príznaky choroby typické, ale izolačný test je negatívny, izolácia sa musí opakovať, najvhodnejším testom je selektívny platňový rozter.

([13]) Spoľahlivá identifikácia čistých kultúr s predpokladanými izolátmi *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testu popísaného v oddiele VI.B. Subšpecifická charakteristika nie je povinná, ale odporúča sa pri každom novom prípade.

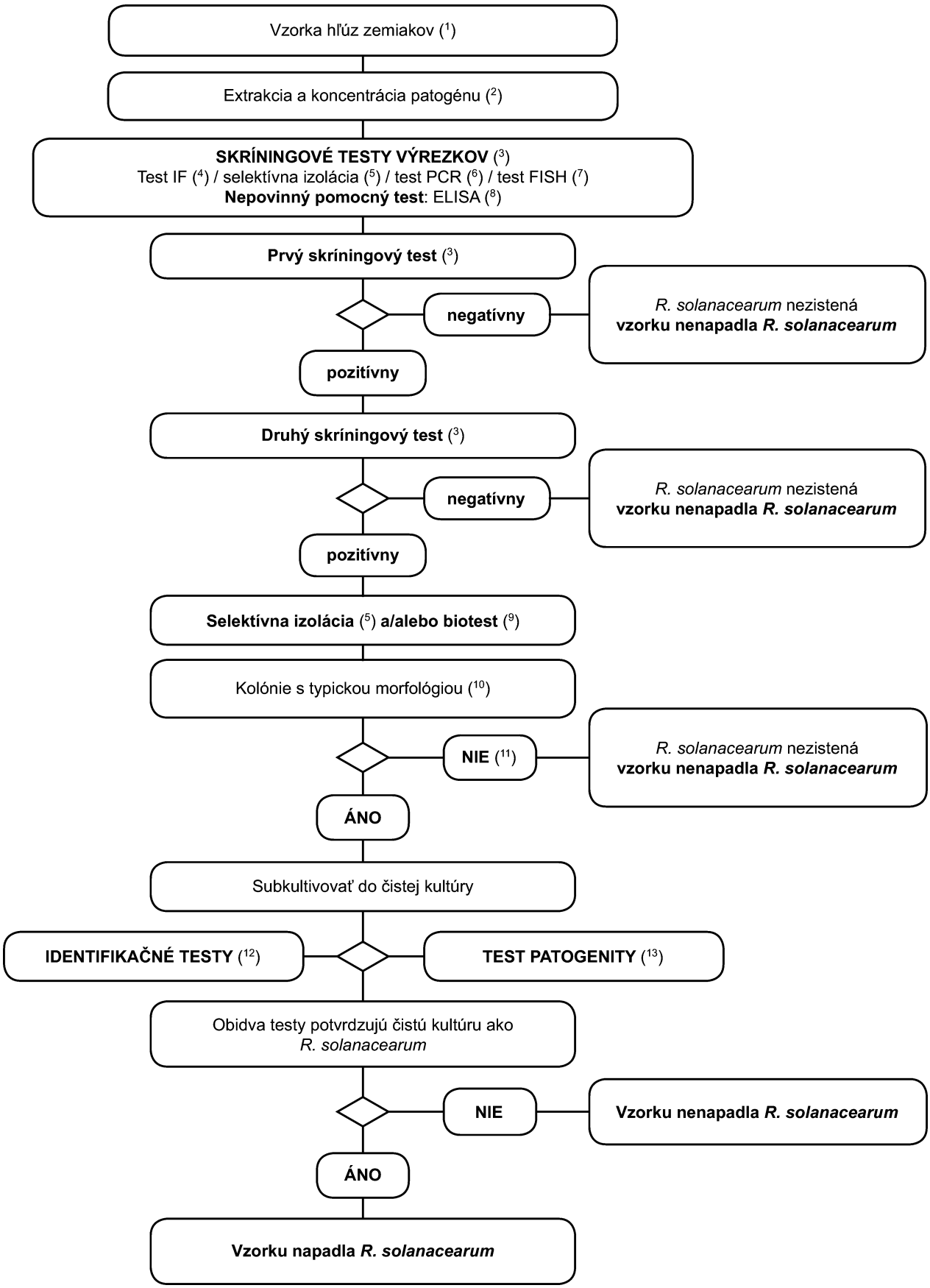
([14]) Test patogenity je popísaný v oddiele VI.C.

2. **Schéma určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov bez príznakov**

Princíp

Testovanie je zamerané na určenie prítomnosti latentných infekcií v hľuzách zemiakov. Pozitívny výsledok najmenej dvoch skríningových testov[3], založených na rôznych biologických princípoch, sa musí doplniť izoláciou patogénu; v prípade izolácie typických kolónií nasleduje potvrdenie čistej kultúry ako *R. solanacearum*. Pozitívny výsledok iba jedného zo skríningových testov vzorky nestačí na potvrdenie podozrenia.

Skríningové testy a izolačné testy musia umožniť diagnostiku resuspendovaného peletu s hustotou 10^3 až 10^4 buniek/ml, ktorý je ako pozitívna kontrola súčasťou každej série testov.


Vzorka hľúz zemiakov (1)
Extrakcia a koncentrácia patogénu (2)
SKRÍNINGOVÉ TESTY VÝREZKOV (3)
Test IF (4) / selektívna izolácia (5) / test PCR (6) / test FISH (7)
Nepovinný pomocný test: ELISA (8)
Prvý skríningový test (3)
negatívny
R. solanacearum nezistená
vzorku nenapadla R. solanacearum
pozitívny
Druhý skríningový test (3)
negatívny
R. solanacearum nezistená
vzorku nenapadla R. solanacearum
pozitívny
Selektívna izolácia (5) a/alebo biotest (9)
Kolónie s typickou morfológiou (10)
NIE (11)
R. solanacearum nezistená
vzorku nenapadla R. solanacearum
ÁNO
Subkultivovať do čistej kultúry
IDENTIFIKAČNÉ TESTY (12)
TEST PATOGENITY (13)
Obidva testy potvrdzujú čistú kultúru ako
R. solanacearum
NIE
Vzorku nenapadla R. solanacearum
ÁNO
Vzorku napadla R. solanacearum

([1]) Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz, aj keď sa tento postup môže použiť aj pri menších vzorkách, ak nie je k dispozícii 200 hľúz.

([2]) Metódy patogénnej extrakcie a koncentrácie sa popisujú v oddiele III.1.1.

([3]) Ak sú aspoň dva testy založené na rôznych biologických princípoch pozitívne, musí sa urobiť izolácia a potvrdenie. Urobte aspoň jeden skríningový test. Keď je tento test negatívny, považuje sa vzorka za negatívnu. V prípade, že je tento test pozitívny, na overenie prvého pozitívneho výsledku sa vyžaduje druhý alebo viacero skríningových testov založených na rôznych biologických princípoch. Ak je druhý test alebo ďalšie testy negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.

([4]) IF test sa popisuje v oddiele VI.A.5.

([5]) Test selektívnou izoláciou sa popisuje v oddiele VI.A.4.

([6]) Testy PCR sa popisujú v oddiele VI.A.6.

([7]) Testy FISH sa popisujú v oddiele VI.A.7.

([8]) Testy ELISA sa popisujú v oddiele VI.A.8.

([9]) Biotest sa popisuje v oddiele VI.A.9.

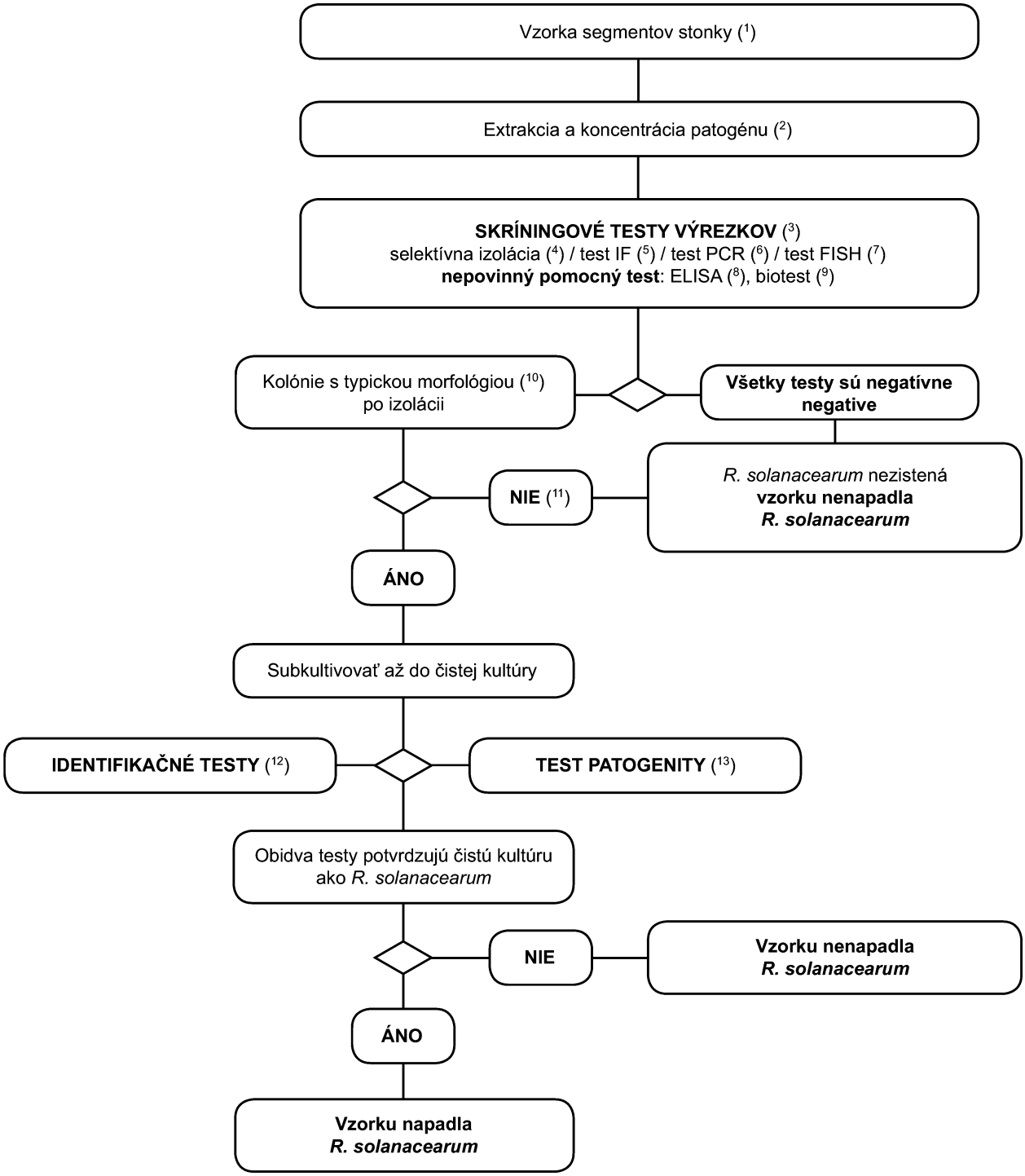
([10]) Typická morfológia kolónie sa popisuje v oddiele II.3.d.

([11]) Kultivácia alebo biotesty môžu byť neuspešné kvôli konkurencii alebo inhibícii spôsobenej saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch dosiahnu jasne pozitívne výsledky, ale testy izoláciou sú negatívne, zopakujte testy izoláciou z toho istého peletu alebo odoberte ďalšie cievne pletivo pri rezanom pupkovom konci hľuzy tej istej vzorky, a ak je potrebné, testujte ďalšie vzorky.

([12]) Spoľahlivá identifikácia čistých kultúr pravdepodobných jedincov *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov, ktoré sa popisujú v oddiele VI.B.

([13]) Test patogenity sa popisuje v oddiele VI.C.

3. **Schéma určovania prítomnosti a identifikácie *Ralstonia solanacearum* vo vzorkách rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných hostiteľských rastlín bez príznakov**



([1]) Odporúčaná veľkosť vzoriek sa uvádza v oddiele III.2.1.

([2]) Metódy extrakcie a koncentrácie patogénu sa popisujú v oddiele III.2.1.

([3]) Ak sú najmenej dva testy založené na rôznych biologických princípoch pozitívne, musí sa urobiť izolácia a potvrdenie. Urobte najmenej jeden skríningový test. Keď je tento test negatívny, vzorka sa považuje za negatívnu. V prípade, že je tento test pozitívny, na overenie prvého pozitívneho výsledku sa vyžaduje druhý alebo ďalšie skríningové testy založené na rôznych biologických princípoch. Ak je negatívny druhý alebo ďalšie skríningové testy, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.

([4]) Test selektívnou izoláciou sa popisuje v oddiele VI.A.4.

([5]) Test IF sa popisuje v oddiele VI.A.5.

([6]) Testy PCR sa popisujú v oddiele VI.A.6.

([7]) Test FISH sa popisuje v oddiele VI.A.7.

([8]) Testy ELISA sa popisujú v oddiele VI.A.8.

([9]) Biotest sa popisuje v oddiele VI.A.9.

([10]) Typická morfológia kolónie sa popisuje v oddieli II.3.d.

([11]) Kultivácia alebo biotesty môžu byť neúspešné kvôli konkurencii alebo inhibícii saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch získa pozitívny výsledok, ale izolačné testy sú negatívne, izolačné testy sa opakujú.

([12]) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v oddiele VI.B.

([13]) Test patogenity sa popisuje v oddiele VI.C.

ODDIEL II

PODROBNÉ METÓDY URČOVANIA PRÍTOMNOSTI *RALSTONIA SOLANACEARUM* V HĽUZÁCH ZEMIAKOV A V RASTLINÁCH ZEMIAKOV, RAJČIAKOV ALEBO INÝCH HOSTITEĽSKÝCH RASTLINÁCH S PRÍZNAKMI HNEDEJ HNILOBY ALEBO BAKTÉRIOVÉHO VÄDNUTIA

1. **Príznaky** (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

1.1. Príznaky na zemiakoch

Rastlina zemiaka. V ranom štádiu sa infekcia na poli rozozná podľa uvädnutých listov vo vrchnej časti rastliny pri vysokých teplotách počas dňa, pričom cez noc sa zotavia. V raných štádiách vädnutia listy zostávajú zelené, ale neskôr žltnú a dochádza k hnedému odumieraniu. Vyskytujú sa aj epinastie. Vädnutie jedného výhonku alebo celých rastlín sa rýchlo stane nezvratným a jeho dôsledkom je odumretie rastliny. Cievne zväzky priečne rozrezaných stoniek zvädnutých rastlín sú zvyčajne hnedé a z povrchu rezu sa samovoľne alebo po stlačení vylučuje mliečny baktériový slizovitý exkrét. Ak sa odrezaná stonka umiestni zvislo do vody, z cievnych zväzkov vytekajú vlákna slizu.

Hľuza zemiaka. Hľuzy zemiaka sa musia rozrezať priečne blízko pupkového (stolónového) konca, alebo pozdĺžne cez stolónový koniec. Rané štádium infekcie sa prejavuje sklovito žltým až svetlohnedým sfarbením cievnych zväzkov, z ktorých sa po niekoľkých minútach spontánne vylučuje svetlý smotanový baktériový sliz. Neskôr sa cievne sfarbenie zmení na zreteľnejšie hnedé a odumieranie pletiva sa môže rozšíriť na parenchymatózne pletivo. V pokročilých štádiách infekcia pokračuje smerom od pupkového konca a očiek, z ktorých sa vylučuje baktériový sliz spôsobujúci prilínanie častíc zeminy. Môžu sa objaviť červenkasto hnedé, mierne vtlačené lézie na šupe spôsobené prepadnutím cievnych zväzkov dovnútra. V pokročilých štádiách infekcie sa bežne vyskytuje sekundárna hubová a baktériová mäkká hniloba.

1.2. Príznaky na rajčiaku

Rastlina rajčiaka. Prvým viditeľným príznakom je ochabnutý vzhľad najmladších listov. V podmienkach priaznivých pre patogény (teplota pôdy okolo 25 °C, nasýtená vlhkosť vzduchu) nasleduje do niekoľkých dní epinastia a vädnutie jednej strany rastliny alebo celej rastliny, čo má za následok kolaps celej rastliny. V menej priaznivých podmienkach (teplota pôdy pod 21 °C) je vädnutie menej výrazné, ale na stonke sa môže vyvinúť veľký počet postranných výhonkov. Pozdĺž stonky možno pozorovať slizovitý pás, ktorý svedčí o odumieraní cievneho systému. Pri priečnom reze stonky sfarbené hnedé cievne zväzky vylučujú biely alebo žltkastý baktériový sliz.

1.3. Príznaky na iných hostiteľoch

Rastliny Solanum dulcamara a S. nigrum. V normálnych podmienkach, ak teploty pôdy neprekročia 25 °C alebo ak úroveň inokula nie je extrémne vysoká (napr. pri *S. nigrum*, ktoré rastie vedľa infikovaných rastlín zemiaka alebo rajčiaka), sa príznaky vädnutia u týchto hostiteľských burín vyskytujú zriedka. Ak sa vädnutie vyskytne, príznaky sú rovnaké, ako sa opisujú u rajčiaka. Nezvädnuté rastliny *S. dulcamara* rastúce so stonkou a koreňmi vo vode môžu mať na priečnom reze spodnej časti stonky alebo časti, ktorá je pod vodou, mierne svetlohnedé sfarbenie cievnych zväzkov. Ak sa odrezaná stonka umiestni zvisle do vody, aj v prípade absencie príznakov vädnutia sa z povrchu rezu cievnych zväzkov vylučuje baktériový sliz alebo vlákna slizu.

2. **Testy vytekania baktériového slizu zo stonky**

Testy vytekania baktétiového slizu zo stonky môžu uľahčiť predbežnú diagnostiku, ale nie sú rozhodujúce. Použije sa jeden alebo viacero z týchto validovaných testov:

2.1. Test vytekania baktériového slizu zo stonky

(Pozri oddiel VI.A.1.)

2.2. Určovanie prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu (PHB)

Charakteristické granuly PHB v bunkách *R. solanacearum* sa zviditeľňujú sfarbením teplom fixovaného rozteru baktériového slizu z infikovaného pletiva na podložnom mikroskopickom sklíčku prostredníctvom nílskej modrej A alebo sudánskej čiernej (pozri oddiel VI.A.2).

2.3. Testy sérologickej aglutinácie

(Pozri oddiel VI.A.3.)

2.4. Iné testy

K ďalším vhodným skríningovým testom patria test IF (pozri oddiel VI.A.5), test FISH (pozri oddiel VI.A.7), testy ELISA (pozri oddiel VI.A.8) a testy PCR (pozri oddiel VI.A.6).

3. **Postup izolácie**

a) Odstráňte sliz alebo časti odfarbeného pletiva z cievnych zväzkov hľuzy zemiaka alebo z cievnych pletív stonky rastliny zemiaka, rajčiaka alebo inej vädnúcej hostiteľskej rastliny. Urobí sa suspenzia v malom objeme sterilnej destilovanej vody alebo v 50 mM fosfátovom pufri (dodatok 4) a nechá sa 5 až 10 minút stáť.

b) Zo suspenzie sa pripraví viacero desatinných riedení.

c) Objem 50 – 100 µl suspenzie a jednotlivých riedení prenesieme na univerzálnu živnú pôdu (NA, YPGA alebo SPA; pozri dodatok 2) a/alebo na Kelmanovo tetrazóliové médium (dodatok 2) a/alebo a validované selektívne médium (napr. SMSA; pozri dodatok 2). Riedenia rozotrieme vhodnou platňovou metódou. Je vhodné pripraviť si samostatné platne so zriedenou kultúrou bunkovej suspenzie biovaru 2 *R. solanacearum* ako pozitívnu kontrolu.

d) Platne sa nechajú inkubovať pri 28 °C 2 až 6 dní.

— Na univerzálnych živných pôdach virulentné izoláty *R. solanacearum* vytvárajú perlovo biele, ploché, nepravidelné a fluidné kolónie, často s charakteristickými špirálkami v strede. Nevirulentné formy *R. solanacearum* vytvárajú malé kruhové, nefluidné, maslovité kolónie, ktoré sú celé smotanovo biele.

— Na Kelmanovom tetrazóliovom médiu a SMSA médiu majú špirálky krvavočervenú farbu. Nevirulentné formy *Ralstonia solanacearum* vytvárajú malé kruhové, nefluidné, maslovité kolónie, ktoré sú celé tmavočervené.

4. **Identifikačné testy na *R. solanacearum***

Testy na potvrdenie identity predpokladaných izolátov *R. solanacearum* sa uvádzajú v oddiele VI.B.

ODDIEL III

1. **Podrobné metódy určovania prítomnosti a identifikácie *Ralstonia solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov bez príznakov**

1.1. Príprava vzoriek

Poznámka:

— Štandardná veľkosť vzoriek je 200 hľúz na test. Intenzívnejšie odoberanie vzoriek vyžaduje viac testov na vzorkách tejto veľkosti. Väčší počet hľúz zemiakov vo vzorke vedie k inhibícii alebo k zložitej interpretácii výsledkov. Tento test je však vhodný na použitie aj pri vzorkách s menej ako 200 hľuzami, ak je k dispozícii menej hľúz.

— Validácia všetkých nižšie uvedených metód určovania prítomnosti sa zakladá na skúšaní vzoriek z 200.

— Nižšie opísaný extrakt zo zemiaka sa môže použiť aj na určenie prítomnosti baktérie spôsobujúcej krúžkovitosť zemiakov, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Nepovinná predúprava pred prípravou vzorky:

a) Inkubácia vzoriek pri 25 – 30 °C až do 2 týždňov pred testovaním podporí množenie všetkých populácií *R. solanacearum*.

b) Umytie hľúz. Medzi každou vzorkou použite vhodné dezinfekčné prostriedky (ak sa použije test PCR, zlúčeniny chlóru na odstránenie DNA patogénu) a čistidlá. Hľuzy nechajte na vzduchu vyschnúť. Toto umývanie je užitočné (ale nevyžaduje sa) najmä pri vzorkách, na ktorých sa nachádza príliš veľa zeminy, a ak sa má robiť test PCR alebo priama izolácia.

1.1.1. Čistým, dezinfikovaným skalpelom alebo zeleninovým nožom odstráňte šupku hľuzy na jej pupkovom (stolónovom) konci tak, aby bolo vidieť cievne pletivo. Z cievneho pletiva na pupkovom konci každej hľuzy opatrne vyrežte malý výrezok cievneho pletiva z pupkového konca tak, aby sa vyrezalo čo najmenej necievnych pletív. (Pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Poznámka: Vyraďte všetky (hnijúce): ponechajte hľuzy vykazujúce symptómy hnedej hrdze a testujte ich oddelene.

Ak sa pri odstraňovaní pupkového konca zistia vo výrezku príznaky hnedej hniloby, hľuza sa musí vizuálne prehliadnuť a odrezať blízko pupkového konca. Každá rozrezaná hľuza s príznakmi sa uloží aspoň na 2 dni pri izbovej teplote, aby sa umožnila suberizácia (zahojenie reznej rany) a skladuje sa schladená (pri 4 až 10 °C) v primeraných podmienkach karantény. Všetky hľuzy, vrátane hľúz podozrivých na symptómy, sa majú uchovávať podľa prílohy III.

1.1.2. Výrezky z pupkových koncov hľúz zhromaždite v nepoužitých jednorazových nádobách, ktoré sa dajú uzatvoriť a/alebo utesniť (v prípade opakovaného použitia nádoby musia byť dôkladne očistené a dezinfikované zlúčeninami chlóru). Odporúča sa výrezky z pupkových koncov okamžite spracovať. Ak to nie je možné, skladujte ich v nádobe bez pridania pufra schladené najdlhšie 72 hodín alebo pri izbovej teplote najdlhšie 24 hodín.

Výrezky z pupkových koncov hľúz spracujete jedným z týchto postupov:

a) buď pridajte dostatočný objem (asi 40 ml) maceračného pufra (dodatok 4), aby bol výrezok prekrytý, umiestnite do rotačnej trepačky a inkubujte počas 4 hodín (50 až 100 otáčok/min.) pri teplote pod 24 °C alebo počas 16 až 24 hodín schladené.

alebo

b) výrezok homogenizujte dostatočným objemom (asi 40 ml) maceračného pufra (dodatok 4) buď v mixéri (napr. Waring alebo Ultra Thurax) alebo rozdrvením v uzatvorenom jednorazovom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba strong guage polythene, 150 mm × 250 mm; sterilizovanom ožiarením) gumeným kladivkom alebo iným vhodným nástrojom na drvenie (napr. Homex).

Poznámka: Keď sa vzorky homogenizujú v mixéri, je riziko krížovej kontaminácie vzoriek vysoké. Počas extrakcie treba urobiť opatrenia, aby nedochádzalo k rozprašovaniu ani k rozlievaniu. Pri každej vzorke použite čerstvo sterilizované čepele v mixéri a nádoby. Ak sa použije test PCR, zabráňte prenosu DNA na nádobách alebo na drviacom zariadení. Keď sa použije test PCR, odporúča sa drvenie v jednorazových vrecúškach..

1.1.3. Dekantujte supernatant. Ak je príliš kalný, zjasní sa buď odstredením pri nízkej rýchlosti (pri odstredivej sile nie viac ako 180 g počas 10 minút pri teplote od 4 do 10 °C), alebo vákuovou filtráciou (40 až 100 μm), pričom sa filter premyje ďalším maceračným pufrom (10 ml).

1.1.4. Bakteriálnu frakciu koncentrujte odstredením pri odstredivej sile 7 000 g počas 15 minút (alebo 10 000 g počas 10 minút) pri teplote od 4 do 10 °C a supernatant vylejte tak, aby ste neporušili vzniknutý pelet.

1.1.5. Pelet resuspendujte v 1,5 ml peletového pufra (dodatok 4). Použite 500 μl na test na *R. solanacearum*, 500 μl pre *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a 500 μl na referenčné účely. Pridajte 10 – 25 % (v/v) sterilný glycerín do 500 μl referenčného alikvotného podielu a do zostávajúceho testovaného alikvotného podielu, pretrepte a skladujte pri teplote od – 16 do – 24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote od – 68 do – 86 °C (niekoľko mesiacov). Testované podiely počas testovania uchovávajte pri teplote od 4 do 10 °C.

Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie sa neodporúča.

Ak je potrebná doprava extraktu, zabezpečte dodanie v chladiacom boxe do 24 až 48 hodín.

1.1.6. Je nevyhnutné, aby sa so všetkými pozitívnymi kontrolami a vzorkami *R. solanacearum* manipulovalo oddelene, aby nedošlo ku kontaminácii. Toto platí aj pre podložné sklíčka pri testoch IF a pri všetkých ostatných testoch.

1.2. Testovanie

Vývojové diagramy a popis testov a optimalizovaných protokolov sa nachádzajú v príslušných dodatkoch:

Selektívna izolácia (pozri oddiel VI.A.4)

Test IF (pozri oddiel VI.A.5)

Testy PCR (pozri oddiel VI.A.6)

Test FISH (pozri oddiel VI.A.7)

Testy ELISA (pozri oddiel VI.A.8)

Biotest (pozri oddiel VI.A.9)

2. **Podrobné metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vzorkách rastlín zemiakov, rajčiakov alebo iných hostiteľských rastlín bez príznakov**

2.1. Príprava vzorky

Poznámka: Pri určovaní prítomnosti latentných populácií *R. solanacearum* sa odporúča testovať kompozitné vzorky. Postup sa môže vhodným spôsobom uplatniť pri kompozitných vzorkách až z 200 častí stoniek. V prípade prehľadov by sa tieto mali zakladať na štatisticky reprezentatívnej vzorke skúmanej populácie rastlín.

2.1.1. Vložte 1 – 2 cm dlhé segmenty stonky do uzatvorenej sterilnej nádoby podľa týchto postupov odoberania vzoriek:

Semenáče rajčiaka z pestovateľskej škôlky: Čistým dezinfikovaným nožom oddeľte 1 cm dlhú časť z dolnej časti každej stonky tesne nad úrovňou zeminy.

Rastliny rajčiaka pestované na poli alebo v skleníku: Čistým dezinfikovaným nožom oddeľte rezom tesne nad miestom vyrastania z hlavnej stonky najnižší postranný výhonok z každej rastliny. Odstráňte 1 cm dlhú časť z každého postranného výhonku.

Ostatné hostiteľské rastliny: Čistým dezinfikovaným nožom alebo záhradníckymi nožnicami oddeľte 1 cm dlhý úsek z dolnej časti každej stonky tesne nad úrovňou zeminy. V prípade *S. dulcamara* alebo iných hostiteľských rastlín rastúcich vo vode oddeľte 1 – 2 cm dlhé časti zo stonky rastúcej pod vodou alebo zo stolónov s vodnými koreňmi.

Pri odoberaní vzoriek z osobitných miest sa odporúča testovať štatisticky reprezentatívnu vzorku najmenej 10 rastlín na miesto odberu každého potenciálneho burinného hostiteľa. Určenie prítomnosti patogénu je najspoľahlivejšie neskoro na jar, v lete alebo v jeseni, hoci v prírode sa infekcie na celoročne vo vode rastúcej *Solanum dulcamara* dajú určiť po celý rok. K známym hostiteľom patria divoko rastúce rastliny zemiaka (náhodne rastúce zemiaky z minulej úrody), *Solanum dulcamara, S. nigrum, Datura stramonium* a iní členovia čeľade Solanaceae. Ďalšími hostiteľmi sú *Pelargonium* spp. a *Portulaca oleracea*. K niektorým druhom európskych burín, ktoré v určitých environmentálnych podmienkach môžu byť útočiskom populácií *R. solanacearum* biovaru 2, rasy 3 v koreňoch a/alebo rizosfére patria *Atriplex hastata, Bidens pilosa, Cerastium glomeratum, Chenopodium album, Eupatorium cannabinum, Galinsoga parviflora, Ranunculus scleratus, Rorippa* spp, *Rumex* spp., *Silene alba, S. nutans., Tussilago farfarra and Urtica dioica*.

Poznámka: V tomto štádiu sa môže urobiť vizuálna prehliadka vnútorných príznakov (sfarbenie cievnych zväzkov alebo baktériový sliz). Všetky segmenty stonky s príznakmi oddeľte a testujte ich samostatne (pozri oddiel II).

2.1.2. Segmenty stonky krátko dezinfikujete 70 % etanolom a okamžite osušte jemným pijavým papierom. Potom segmenty stonky spracujte jedným z uvedených postupov:

a) Pridajte dostatočné množstvo (približne 40 ml) maceračného pufra (dodatok 4), aby boli odrezky stonky prekryté, a inkubujte na rotačnej trepačke (50 až 100 ot/min) počas 4 hodín pri teplote nižšej ako 24 °C alebo schladené počas 16 až 24 hodín.

b) Odrezky okamžite rozdrvte gumeným kladivkom alebo iným vhodným nástrojom na drvenie (napr. Homex) v jednorazovom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba) s primeraným množstvom maceračného pufra (dodatok 4). Ak to nie je možné, odrezky skladujte v chlade najdlhšie 72 hodín alebo pri izbovej teplote najdlhšie 24 hodín.

2.1.3. Supernatant nechajte asi 15 minút usadiť a potom ho dekantujte.

2.1.4. Ďalšie čistenie extraktu ani koncentrácia baktériovej frakcie sa zvyčajne nevyžadujú, ale môžu sa dosiahnuť filtráciou a/alebo odstredením, ako sa opisuje v oddiele III.1.1.3 až 1.1.5.

2.1.5. Čistú alebo koncentrovanú vzorku rozdeľte na 2 rovnaké diely. Jeden diel uchovávajte počas testovania pri teplote 4 až 10 °C a v prípade, že je potrebné ďalšie testovanie, druhý diel skladujte s 10 až 25 % (objem/objem) sterilným glycerínom pri teplote od – 16 °C do – 24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote od – 68 °C do – 86 °C (niekoľko mesiacov).

2.2. Testovanie

Vývojové diagramy a popis testov a optimalizovaných protokolov sa nachádzajú v príslušných dodatkoch:

Selektívna izolácia (pozri oddiel VI.A.4)

Test IF (pozri oddiel VI.A.5)

Testy PCR (pozri oddiel VI.A.6)

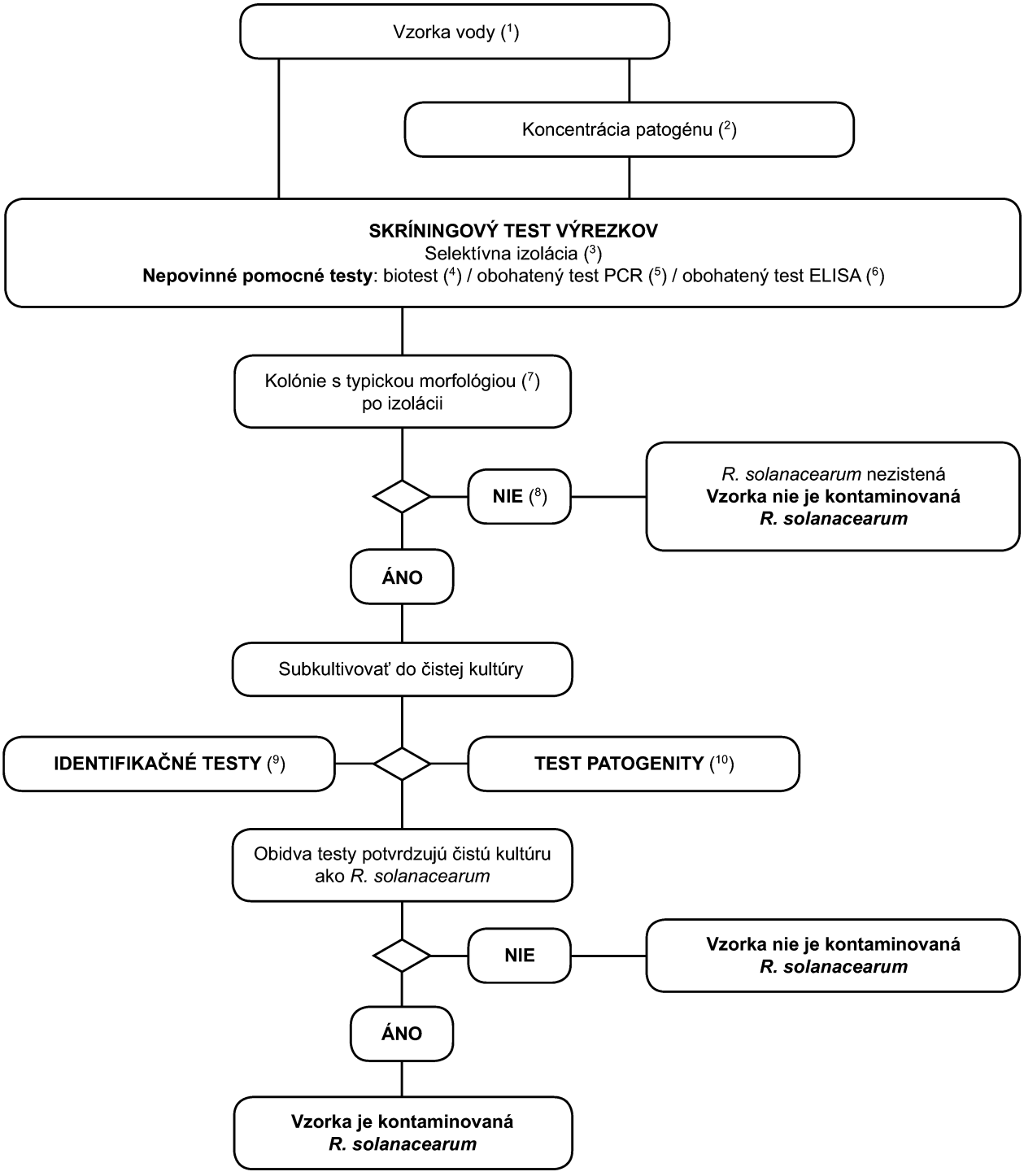
Test FISH (pozri oddiel VI.A.7)

Testy ELISA (pozri oddiel VI.A.8)

Biotest (pozri oddiel VI.A.9)

ODDIEL IV

1. **Systém určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vode**



([1]) Odporúčané postupy odoberania vzoriek sa uvádzajú v oddiele IV.2.1.

([2]) Metódy koncentrácie patogénu sa popisujú v oddiele IV.2.1. Koncentrácia zvyšuje populácie patogénu aj konkurenčných saprofytických baktérií a odporúča sa iba ak nemá za následok inhibíciu izolačného testu.

([3]) Selektívny izolačný test sa popisuje v oddiele VI.A.4.

([4]) Biotest sa popisuje v oddiele VI.A.9.

([5]) Metódy obohatenia testu PCR sa popisujú v oddiele VI.A.4.2 a oddiele VI.A.6.

([6]) Metódy obohatenia testu ELISA sa popisujú v oddiele VI.A.4.2 a oddiele VI.A.8.

([7]) Typická morfológia kolónie sa popisuje v oddiele II.3.d.

([8]) Kultivácia môže byť neúspešná kvôli konkurencii alebo inhibícii saprofytickými baktériami. Ak je podozrenie, že veľké saprofytické populácie ovplyvňujú spoľahlivosť izolácie, izolačné testy po zriedení vzorky destilovanou vodou zopakujte.

([9]) Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v oddiele VI.B.

([10]) Test patogenity sa popisuje v oddiele VI.C.

2. **Metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* vo vode**

Princíp

Validovaný systém určovania prítomnosti popísaný v tomto oddiele je použiteľný aj pri určovaní prítomnosti patogénov vo vzorkách povrchovej vody a môže sa použiť aj pri testovaní vzoriek vody zo spracovania zemiakov alebo odpadovej vody. Je však potrebné poznamenať, že predpokladaná citlivosť určovania prítomnosti sa mení podľa substrátu. Citlivosť izolačného testu ovplyvňujú populácie konkurenčných saprofytických baktérií, ktoré sú zvyčajne oveľa väčšie vo vode zo spracovania zemiakov alebo v odpadovej vode ako v povrchovej vode. Keďže sa očakáva, že nižšie uvedeným systémom sa určí aj také malé množstvo ako 10^3 buniek na liter povrchovej vody, citlivosť určovania vo vode zo spracovania zemiakov alebo v odpadovej vode je pravdepodobne oveľa nižšia. Z tohto dôvodu sa odporúča testovať odpadovú vodu až po všetkých procesoch úpravy (napr. sedimentácia alebo filtrácia), počas ktorých sa znížia populácie saprofytických baktérií. Obmedzená citlivosť testovacieho systému by sa mala brať do úvahy pri posudzovaní spoľahlivosti dosiahnutých negatívnych výsledkov. Keďže sa tento systém úspešne použil pri výskumných prácach na určenie prítomnosti alebo neprítomnosti patogénov v povrchovej vode, jeho obmedzenia si treba uvedomiť, keď sa použije v podobných výskumných prácach s vodou zo spracovania zemiakov alebo s odpadovou vodou.

2.1. Príprava vzorky

Poznámka:

— Určovanie prítomnosti *R. solanacearum* v povrchovej vode je najspoľahlivejšie neskoro na jar, v lete a v jeseni, keď sú teploty vody vyššie ako15 °C.

— Opakovaným odoberaním vzoriek v uvedených obdobiach v rôznom čase a na určených miestach sa zvýši spoľahlivosť určenia prítomnosti tým, že sa znížia účinky klimatických zmien..

— Zohľadnením vplyvu silných dažďov a geografie toku vody sa vylúči účinok prílišného zriedenia, ktorý môže stlmiť prítomnosť patogénu.

— Vzorky povrchovej vody odoberajte v blízkosti hostiteľských rastlín, ak sa tam vyskytujú.

2.1.1. Na vybraných miestach odberu vzoriek odoberte vzorky vody do jednorazových skúmaviek alebo fliaš podľa možnosti v hĺbke 30 cm a do 2 metrov od brehu. Vzorky na spracovanie odpadových vôd odoberajte v mieste výtoku odpadu. Odporúčaná veľkosť vzorky je do 500 ml na odberové miesto. Ak sa uprednostnia menšie vzorky, odporúča sa odoberať vzorky na jednom mieste aspoň na trikrát, pričom každá vzorka sa skladá z 2 opakovaných podvzoriek s objemom najmenej 30 ml. Pri intenzívnej výskumnej práci zvoľte aspoň 3 miesta odberu vzoriek na 3 kilometre vodného toku a zabezpečte odber vzoriek aj z prítokov vodného toku.

2.1.2. Vzorky prepravujte v chlade a tme (4 °C až 10 °C) a testujte do 24 hodín.

2.1.3. V prípade potreby sa baktériová frakcia môže koncentrovať niektorou z týchto metód:

a) Odstreďte 30 – 50 ml podvzorky pri 10 000 g počas 10 minút (alebo 7 000 g 15 minút) najlepšie pri teplote 4 °C až 10 °C, vylejte supernatant a resuspendujte pelet v 1 ml peletového pufra (dodatok 4).

b) Prefiltrujte cez membránu (minimálna veľkosť pórov 0,45 μm), opláchnite filter v 5 až 10 ml peletového pufra a oplachový pufor zachyťte. Táto metóda je vhodná pre väčšie množstvá vody obsahujúcej malé množstvo saprofytov.

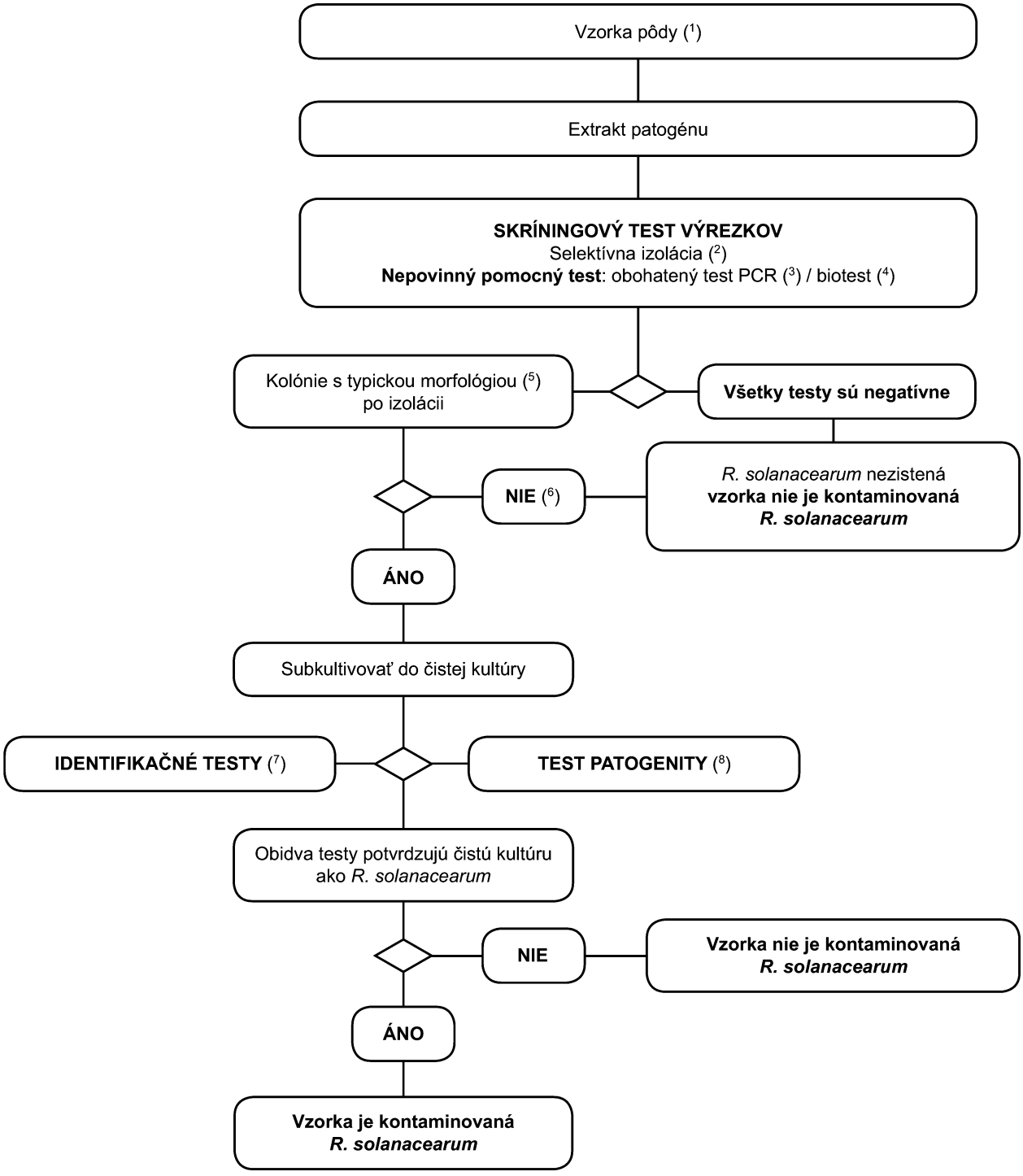
Pri vzorkách vody zo spracovania zemiakov a odpadovej vody sa koncentrácia zvyčajne neodporúča, pretože zvýšené populácie konkurenčných saprofytických baktérií spomaľujú určovanie prítomnosti *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Testovanie

Pozri vývojový diagram a popis testov v relevantných dodatkoch.

ODDIEL V

1. **Systém určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* v pôde**



([1]) Odporúčané postupy odoberania vzoriek sa uvádzajú v oddiele V.2.1.

([2]) Test selektívnej izolácie sa popisuje v oddiele VI.A.4.

([3]) Metódy obohacovania testu PCR sa popisujú v oddiele VI.A.4.2 a oddiele VI.A.6.

([4]) Biotest sa popisuje v oddiele VI.A.9.

([5]) Typická morfológia kolónie sa popisuje v oddiele II.3.d.

([6]) Kultivovanie môže byť neúspešné kvôli konkurencii alebo inhibícii saprofytickými baktériami. Ak je podozrenie, že veľké saprofytické populácie ovplyvňujú spoľahlivosť izolácie, po ďalšom zriedení vzorky izolačné testy zopakujte.

([7]) Spoľahlivá identifikácia predpokladaných čistých kultúr *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v oddiele VI.B.

([8]) Test patogenity sa popisuje v oddiele VI.C.

2. **Metódy určovania prítomnosti a identifikácie *R. solanacearum* v pôde**

Princíp

Validovaný systém určovania prítomnosti, ktorý sa popisuje v tomto oddiele, je použiteľný pri určovaní prítomnosti patogénov vo vzorkách pôdy, ale môže sa použiť aj na testovanie tuhých odpadov zo spracovania zemiakov alebo splaškových kalov. Treba však poznamenať, že tieto metódy nie sú dostatočne citlivé, aby zaručili určenie prítomnosti malých a/alebo nepravidelne roztrúsených populácií *Ralstonia solanacearum*, ktoré sa môžu vyskytovať v prirodzene zamorených vzorkách týchto substrátov.

Obmedzená citlivosť tohto systému testovania by sa mala brať na zreteľ pri posudzovaní spoľahlivosti všetkých negatívnych výsledkov a aj v prípade, keď sa použije na výskum zameraný na určenie prítomnosti alebo neprítomnosti patogénu v pôdach alebo v kaloch. Najspoľahlivejším testom prítomnosti patogénu v pôde z poľa je zasadiť vnímavého hostiteľa a sledovať, či sa infikuje, ale aj pri tejto metóde môžu nízke úrovne kontaminácie zostať neodhalené.

2.1. Príprava vzorky

2.1.1. Pri odoberaní vzoriek pôdy z poľa by sa mali dodržiavať štandardné postupy odoberania vzoriek háďatok. Na vzorku odoberte 0,5 až 1 kg pôdy zo 60 miest na 0,3 ha z hĺbky 10 až 20 cm (alebo v rastri 7 × 7 meter). Ak je podozrenie na prítomnosť patogénu, zvýšte počet miest odberu na 120 na 0,3 ha. Vzorky pred testovaním skladujte pri teplote 12 až 15 °C. Vzorku odpadov zo spracovania zemiakov a splaškových kalov pripravte zozbieraním celkovo 1 kg materiálu z viacerých miest reprezentujúcich celý objem splaškov, ktoré sa majú testovať. Každú vzorku pred testovaním dôkladne zamiešajte.

2.1.2. Podvzorky z 10 až 25 g pôdy alebo kalu rozptyľujte pomocou rotačnej trepačky (250 ot/min) v 60 až 150 ml maceračného pufra (dodatok 4) počas až 2 hodín. V prípade potreby podporte disperziu pridaním 0,02 % sterilného Tween-20 a 10 až 20 g sterilného štrku.

2.1.3. Počas testovania udržiavajte suspenziu pri teplote 4 °C.

2.2. Testovanie

Pozri vývojový diagram a popis testov v relevantných dodatkoch.

ODDIEL VI

OPTIMALIZOVANÉ PROTOKOLY NA URČOVANIE PRÍTOMNOSTI A IDENTIFIKÁCIU *R. SOLANACEARUM*

A. *DIAGNOSTICKÉ TESTY A TESTY NA URČOVANIE PRÍTOMNOSTI*

1. **test vytekania baktériového slizu stonky**

Prítomnosť *R. solanacearum* v stonkách vädnúcich rastlín zemiaka, rajčiaka alebo iných hostiteľských rastlín sa môže určiť týmto jednoduchým predbežným testom: Odrežte stonku v úrovni nad zeminou. Umiestnite povrch rezu do skúmavky s čistou vodou. Po niekoľkých minútach začnú z cievnych zväzkov samovoľne vytekať vlákna baktériového slizu.

2. **Určovanie prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu**

1. Pripravte si na podložné mikroskopické sklíčko rozter z baktériového slizu z infikovaného pletiva alebo zo 48-hodinovej kultúry na médiu YPGA alebo SPA (dodatok 2).

2. Pripravte si pozitívne kontrolné roztery kmeňa biovaru 2 *R. solanacearum* a v prípade, že to je užitočné, aj negatívny kontrolný rozter známeho druhu, ktorý je PHB negatívny.

3. Nechajte na vzduchu vyschnúť a spodnou stranou sklíčka prejdite niekoľkokrát rýchlo ponad plameň, kým sa rozter nezafixuje.

4. Preparát sfarbite buď nílskou modrou alebo sudánskou čiernou a pozorujte pod mikroskopom podľa tohto popisu:

Test nílskou modrou

a) Každé sklíčko zalejte 1 % vodným roztokom nílskej modrej A a inkubujte 10 minút pri teplote 55 °C.

b) Nechajte odtiecť farbiaci roztok. Krátko opláchnite pod slabo tečúcou vodou. Prebytočnú vodu odsajte jemným pijavým papierom.

c) Zalejte rozter 8 % vodným roztokom kyseliny octovej a inkubujte 1 minútu pri izbovej teplote.

d) Krátko opláchnite pod slabo tečúcou vodou. Prebytočnú vodu odsajte jemným pijavým papierom.

e) Opätovne zvlhčite kvapkou vody a zakryte krycím sklíčkom.

f) Preskúmajte sfarbený rozter epifluorescenčným mikroskopom pri vlnovej dĺžke 450 nm a s olejovou imerziou pri 600- až 1 000-násobnom zväčšení pomocou objektívu s vodnou alebo olejovou imerziou.

g) Všímajte si sýtooranžovú fluorescenciu granúl PHB. Pozorujte aj za prechádzajúceho bežného svetla a uistite sa, či sú granuly vnútrobunkové a či morfológia buniek je typická pre *R. solanacearum*.

Test sudánskou čiernou

a) Každé sklíčko zalejte 0,3 % roztokom sudánskej čiernej B v 70 % etanole a inkubujte 10 minút pri izbovej teplote.

b) Nechajte odtiecť roztok farbiva, krátko opláchnite v tečúcej vode a prebytočnú vodu odsajte jemným pijavým papierom.

c) Sklíčka ponorte nakrátko do xylolu a osušte jemným pijavým papierom. Upozornenie: *Xylol je zdraviu škodlivý, nevyhnutné sú všetky bezpečnostné opatrenia a musí sa pracovať v digestore*.

d) Sklíčka sa zalejú 0,5 % (hmotnosť/objem) vodným roztokom safranínu a nechá sa 10 sekúnd stáť pri izbovej teplote. Upozornenie: *Safranín je zdraviu škodlivý, nevyhnutné sú všetky bezpečnostné opatrenia a musí sa pracovať v digestore*.

e) Sklíčka sa opláchnu v slabo tečúcej vode, osušia sa jemným pijavým papierom a priloží sa krycie sklíčko.

f) Sfarbené roztery sa pozorujú v mikroskope s prechádzajúcim svetlom s olejovou imerziou pri 1 000-násobnom zväčšení pomocou objektívu s olejovou imerziou.

g) Pozorujte modro-čierne sfarbenie granúl PHB v bunkách *R. solanacearum* s ružovo sfarbenými bunkovými stenami.

3. **Testy sérologickej aglutinácie**

Aglutinácia buniek *R. solanacearum* v baktériovom slize alebo v extrakte pletiva s príznakmi sa najlepšie pozoruje pomocou validovaných protilátok (pozri dodatok 3) označených príslušnými farebnými značkami ako sú červené bunky *Staphylococcus aureus* alebo farebnými latexovými časticami. Ak sa použije komerčne dostupná sada (pozri dodatok 3), dodržiavajte pokyny výrobcu. Inak dodržiavajte tento postup:

a) Zmiešajte kvapky suspenzie označenej protilátky a baktériový sliz (približne 5 µl z každého) v jamkách viacobjektových testovacích sklíčok.

b) Pripravte pozitívne a negatívne kontroly pomocou suspenzií *R. solanacearum* biovaru 2 a jedného nerovnocenného kmeňa.

c) Po jemnom miešaní počas 15 sekúnd pozorujte aglutináciu v pozitívnych vzorkách.

4. **Selektívna izolácia**

4.1. Selektívny platňový rozter

Poznámka: Pred prvým použitím tejto metódy urobte predbežné testy na zaistenie opakovateľnosti určenia prítomnosti buniek *R. solanacearum* tvoriacich kolónie v hodnote 10^3 až 10^4 na 1 ml, ktoré sa pridajú do extraktov zo vzoriek, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom.

Použite primerane validované selektívne médium ako SMSA (modifikované podľa Elphinstone *et al.*, 1996; pozri dodatok 2).

Je potrebné venovať pozornosť odlíšeniu *R. solanacearum* od iných baktérií schopných tvoriť v médiu kolónie. Okrem toho, ak sú platňové roztery prerastené alebo ak sú prítomné antagonistické baktérie, kolónie *R. solanacearum* môžu vykazovať netypickú morfológiu. V prípade podozrenia na konkurenčné alebo antagonistické vplyvy musí sa vzorka pretestovať pomocou iného testu.

Najvyššia citlivosť určenia prítomnosti touto metódou sa dá očakávať, ak sa použijú čerstvo pripravené extrakty vzoriek. Táto metóda je však použiteľná aj pri extraktoch, ktoré boli skladované v glyceríne pri teplote od – 68 do – 86 °C.

Ako pozitívne kontroly pripravte desatinné riedenia suspenzie s hustotou 10^6 buniek tvoriacich kolónie na 1 ml virulentného kmeňa *R. solanacearum* biovaru 2 (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Aby sa vylúčila akákoľvek možnosť kontaminácie, pripravujte pozitívne vzorky úplne oddelene od vzoriek, ktoré sa majú testovať.

Pri každej novopripravenej dávke selektívneho média by sa pred jej použitím pri testovaní bežných vzoriek mala otestovať jej vhodnosť na rast patogénu.

Kontrolný materiál testujte rovnakým spôsobom ako vzorku(-y).

4.1.1. Použite vhodnú zrieďovaciu platňovú techniku rozteru, ktorou sa zabezpečí, aby sa zriedili všetky nežiaduce saprofytické populácie tvoriace kolónie. Rozotrite 50 až 100 µl extraktu vzorky na platňu a na každé riedenie.

4.1.2. Platne nechajte inkubovať pri teplote 28 °C. Po 48 hodinách platne skontrolujte a potom každý deň až do 6 dní. Typické kolónie *R. solanacearum* na médiu SMSA sú mliečne biele, ploché, nepravidelné a fluidné a po 3 dňoch inkubácie sa v strede vytvorí ružové až krvavočervené sfarbenie s vnútornými prúžkami alebo závitmi (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Poznámka: Na tomto médiu sa niekedy tvoria netypické kolónie *R. solanacearum*. Môžu byť malé, kruhové, celé červeno sfarbené a nefluidné alebo iba čiastočne fluidné, a preto ťažko rozoznateľné od saprofytických baktérií tvoriacich kolónie.

4.1.3. Predpokladané kolónie *R. solanacearum* po nanesení v prúžkoch alebo po zriedenom roztere na univerzálnu živnú pôdu očistite, aby ste dostali izolované kolónie (pozri dodatok 2).

4.1.4. Kultúry krátkodobo uchovajte v sterilnej vode (pH 6 – 8, bez chlóru) v tme pri izbovej teplote, alebo dlhodobo vo vhodnom kryogénnom ochrannom prostredí pri teplote od – 68 do – 86 °C alebo lyofilizované.

4.1.5. Identifikujte predpokladané kultúry (pozri oddiel VI. B) a urobte test patogenity (pozri oddiel VI. C).

Vyhodnotenie výsledkov testu selektívneho platňového rozteru

Test selektívneho platňového rozteru je negatívny, ak sa po šiestich dňoch nedajú spozorovať žiadne kolónie baktérií, alebo ak sa nezistia žiadne predpokladané typické kolónie *R. solanacearum* za podmienky, že sa nepredpokladá žiadna inhibícia inými konkurenčnými alebo antagonistickými baktériami a že v pozitívnych kontrolách sa nachádzajú typické kolónie *R. solanacearum*.

Test selektívneho platňového rozteru je pozitívny, ak sa izolujú predpokladané kolónie *R. solanacearum*.

4.2. Obohacovanie

Použite validované obohacovacie médium ako je modifikovaný živný roztok Wilbrink (pozri dodatok 2).

Tento postup sa môže použiť na selektívne zvýšenie populácií R. solanacearum *v extraktoch zo vzoriek a na zvýšenie citlivosti pri určovaní ich prítomnosti. Týmto postupom sa zároveň účinne riedia inhibítory reakcie PCR (1:100). Treba však poznamenať, že obohacovanie* R. solanacearum *môže byť neúspešné kvôli konkurencii alebo antagonizmu saprofytických organizmov, ktoré sa tiež často súčasne obohatia. Z tohto dôvodu môže byť izolácia* R. solanacearum *z kultúr obohatených v živných roztokoch ťažká. Okrem toho, keďže sa môžu zvýšiť populácie sérologicky príbuzných saprofytov, ak sa má použiť test ELISA, odporúča sa prednostné použitie osobitných monoklonálnych protilátok pred polyklonálnymi protilátkami.*

4.2.1. Pri obohacovaní pre test PCR preneste 100 µl extraktu zo vzorky do 10 ml obohateného živného roztoku (dodatok 2), ktorý ste predtým primerane rozdelili do skúmaviek alebo fliaš bez DNA. Pri obohacovaní pre test ELISA sa môžu použiť vyššie pomery extraktu zo vzorky k živnému roztoku (napr. 100 µl v 1,0 ml obohateného živného roztoku).

4.2.2. Inkubujte 72 hodín a pri teplote 27 až 30 °C v trepačke alebo staticky s uvoľneným uzáverom, aby bol prístup vzduchu.

4.2.3. Pred použitím v testoch ELISA alebo PCR dôkladne premiešajte.

4.2.4. Obohatený živný roztok pripravte rovnakým spôsobom ako vzorku(-y) vo vyššie uvedených testoch.

Poznámka: Ak sa očakáva inhibícia obohacovania *R. solanacearum* kvôli vysokým populáciám určitých konkurenčných saprofytických baktérií, lepšie výsledky sa dajú dosiahnuť obohatením extraktu vzorky pred akýmkoľvek odstredením alebo inými spôsobmi koncentrácie.

5. **Test IF**

Princíp

Použitie testu IF ako hlavného skríningového testu sa odporúča, pretože je dokázaná jeho účinnosť pri dosahovaní požadovaných prahových hodnôt.

Keď sa ako hlavný skríningový test použije test IF a vyhodnotenie je pozitívne, musia sa urobiť testy PCR alebo FISH alebo izolačný test ako druhý skríningový test. Keď sa test IF použije ako druhý skríningový test a odčítavanie IF je pozitívne, na úplnú analýzu sa vyžaduje ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu.

Poznámka: Používajte validovaný zdroj protilátok *R. solanacearum* (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Odporúča sa, aby sa pre každú novú dávku protilátok stanovil titer. Titer sa definuje ako najvyššie riedenie, pri ktorom sa pri testovaní suspenzie obsahujúcej 10^5 to 10^6 buniek na 1 ml homológneho kmeňa *R. solanacearum* a s použitím vhodného konjugátu fluorescenčného izotiokyanátu (FITC) podľa pokynov výrobcu, dosahuje optimálna reakcia. Všetky validované polyklonálne antiséra mali titer IF najmenej 1:2 000. Počas testovania by sa mali používať protilátky v pracovnom riedení(-iach) blízkom alebo na úrovni titra.

Test by sa mal urobiť s čerstvo pripravenými extraktmi zo vzoriek. V prípade potreby sa môže úspešne urobiť aj s extraktmi skladovanými pri teplote – 68 *až* – 86 °C v glyceríne. Glycerín sa môže zo vzorky odstrániť pridaním 1 ml peletového pufra (dodatok 4), opakovaným odstredením počas 15 minút pri odstredivej sile 7 000 g a resuspenzii v rovnakom objeme peletového pufra. Toto však často nie je potrebné, najmä ak sú vzorky fixované na podložné sklíčka flambovaním.

Pripravte samostatné podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou z homológneho kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *R. solanacearum*, suspendovaného v extrakte zo zemiaka ako je špecifikované v dodatku 3B, a podľa želania v pufri.

Ak je to možné, ako obdobná kontrola by sa na tom istom sklíčku malo použiť prirodzene infikované pletivo (udržiavané lyofilizáciou alebo zmrazením pri teplote – 16 *až* – 24 °C.

Ako negatívna kontrola sa môžu použiť alikvotné podiely extraktu vzorky, ktorá sa predtým testovala na *R. solanacearum* s negatívnym výsledkom.

Štandardné pozitívne a negatívne kontrolné materiály, ktoré sú k dispozícii na použitie pri tomto teste, sa uvádzajú v dodatku 3.

Použite viacobjektové podložné sklíčka, najlepšie s 10 jamkami s minimálnym priemerom 6 mm.

Kontrolný materiál testujte rovnakým spôsobom ako vzorku(-y).

5.1. Podložné sklíčka pripravte jedným z nasledujúcich postupov:

i) Pri peletoch s relatívne malým sedimentom škrobu:

Pipetou naneste odmeraný štandardný objem (15 µl postačuje pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť primerane väčší objem) riedenia 1/100 resuspendovaného zemiakového peletu do prvej jamky. Potom do zostávajúcich jamiek v rade pipetou naneste rovnaký objem neriedeného peletu (1/1). Ďalší rad sa môže použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obr. 1.

ii) Pri ostatných peletoch:

Pripravte desatinné riedenia (1/10, 1/100) resuspendovaného peletu v peletovom pufri. Pipetou naneste odmeraný štandardný objem (15 µl postačuje pre jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť primerane väčší objem) resuspendovaného peletu a každého riedenia do radu jamiek. Ďalší rad sa môže použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obr. 2.

5.2. Kvapky nechajte vyschnúť pri izbovej teplote alebo ohrievaním pri teplote 40 až 45 °C. Baktériové bunky fixujte na podložné sklíčko buď ohrievaním (15 minút pri teplote 60 °C), flambovaním, 95 % etanolom alebo podľa osobitných pokynov od dodávateľa protilátok.

V prípade potreby sa fixované podložné sklíčka pred ďalším testovaním môžu skladovať čo najkratšie (najviac 3 mesiace) zmrazené vo vysušenom boxe.

5.3. Postup pri teste IF

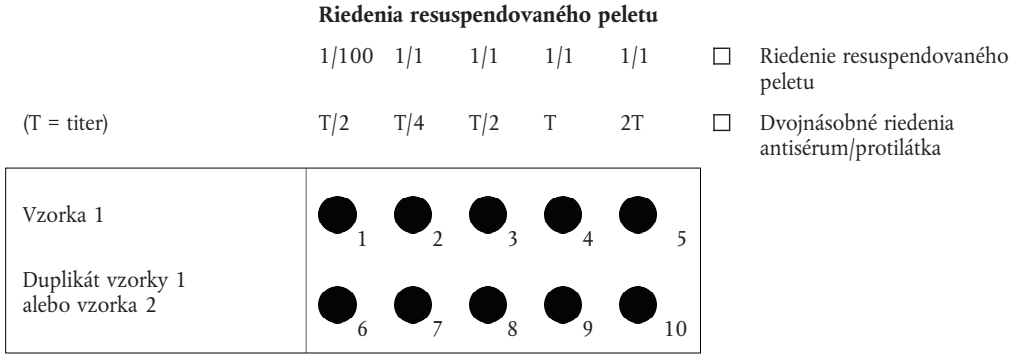
i) Pri príprave podložného sklíčka podľa 5.1.i):

Pripravte sadu dvojnásobných riedení. Prvá jamka by mala obsahovať 1/2 titra (T/2), ostatné 1/4 titra (T/4), 1/2 titra (T/2), titer (T) a dvojnásobok titra (2T).

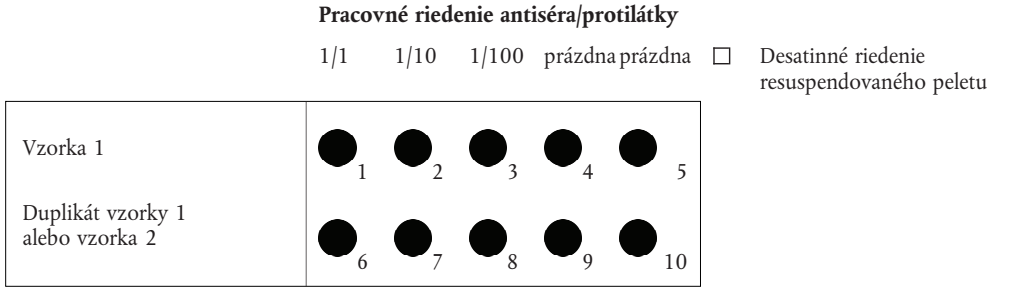
ii) Pri príprave podložného sklíčka podľa 5.1.ii):

Pripravte pracovné riedenie (PR) protilátky v pufri IF. Pracovné riedenie ovplyvňuje špecifickosť.

Obrázok 1 Príprava podložného sklíčka postupom podľa 5.1.i) a 5.3.i)



Obrázok 2 Príprava podložného sklíčka postupom podľa 5.1.ii) a 5.3.ii)



5.3.1. Podložné sklíčka položte na vlhký hodvábny papier. Všetky testovacie jamky úplne pokryte riedeniami antiséra. Objem antiséra naneseného na každú jamku musí minimálne zodpovedať objemu naneseného extraktu.

Nasledujúci postup by sa mal vykonať v prípade, že chýbajú osobitné pokyny výrobcov protilátok:

5.3.2. Podložné sklíčka inkubujte 30 minút zakryté na vlhkom papieri pri izbovej teplote (18 až 25 °C).

5.3.3. Kvapky z každého podložného sklíčka opatrne straste a opláchnite pufrom IF. Preplachujte ponorené 5 minút v roztoku pufra IF-Tween (dodatok 4) a potom v pufri IF. Zabráňte rozprašovaniu alebo kvapkaniu, ktoré by mohli spôsobiť krížovú kontamináciu. Prebytočnú vlhkosť starostlivo odstráňte jemným odsatím pijavým papierom.

5.3.4. Podložné sklíčka položte na vlhký papier. Testovacie jamky pokryte riedením konjugátu FITC použitím na stanovenie titra. Objem konjugátu naneseného na jamky musí presne zodpovedať objemu nanesenej protilátky.

5.3.5. Podložné sklíčka inkubujte zakryté na vlhkom papieri 30 minút pri izbovej teplote (18 až 25 °C).

5.3.6. Kvapky konjugátu opatrne straste z podložného sklíčka. Opláchnite a preplachujte rovnako ako v bode 5.3.3.

Dôkladne odstráňte prebytočnú vlhkosť.

5.3.7. Na každú jamku napipetujte 5 až 10 µl 0,1M glycerínu pufrovaného fosfátom (dodatok 4) alebo inou komerčnou krycou kvapalinou na udržanie signálu a priložte krycie sklíčko.

5.4. Hodnotenie testu IF

5.4.1. Podložné sklíčka prehliadnite pod epifluorescenčným mikroskopom s filtrami vhodnými na excitáciu FITC pod olejovou alebo vodnou imerziou pri zväčšení 500 až 1 000-krát. Každú jamku mikroskopicky prehliadnite vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a aj po obvode. Pri vzorkách, v ktorých sa nenachádzajú žiadne bunky alebo len malý počet buniek, pozorujte aspoň 40 mikroskopických políčok.

Najprv skontrolujte podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou. Bunky musia pri titrovaní stanovenou protilátkou alebo pracovným riedením jasne fluoreskovať a byť úplne sfarbené. Pri odlišnom sfarbení sa musí test IF (oddiel VI.A.5) zopakovať.

5.4.2. V testovacích jamkách podložných sklíčok pozorujte jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *R. solanacearum* (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intenzita fluorescencie musí zodpovedať pozitívnemu kontrolnému kmeňu pri rovnakom riedení antiséra. Bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou sa neberú do úvahy.

Ak je akékoľvek podozrenie na kontamináciu, test sa musí zopakovať. Môže to byť v prípade, keď sa na všetkých podložných sklíčkach vo vzorke nájdu pozitívne bunky kvôli kontaminácii pufra, alebo ak sa pozitívne bunky nájdu (mimo jamiek na podložnom sklíčku) na krycom sklíčku.

5.4.3. So špecifickosťou imunofluorescenčného testu sa spája niekoľko problémov. Nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s netypickou morfológiou a saprofytické baktérie spôsobujúce krížovú reakciu a podobnou veľkosťou a morfológiou ako *R. solanacearum* sa zvyčajne vyskytujú v peletoch výrezkov z pupkových koncov a segmentov stonky.

5.4.4. Pri titrovaní alebo pracovnom riedení protilátok ako sa uvádza v bode 5.3 berte do úvahy len fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou.

5.4.5. Vyhodnotenie výsledkov testu IF:

i) Ak sa nájdu jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, stanovte priemerný počet typických buniek na mikroskopické políčko a vypočítajte počet typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu (dodatok 5).

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

ii) Výsledok testu IF je negatívny pri vzorkách s menším počtom ako 5×10^3 buniek na 1 ml resuspendovaného peletu a vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testovanie sa nevyžaduje.

6. **TESTY PCR**

Princípy

Keď sa PCR použije ako hlavný skríningový test a je pozitívny, musí sa urobiť izolačný test alebo IF ako druhý povinný skríningový test. Keď sa PCR použije ako druhý skríningový test a je pozitívny, na úplnú diagnostiku sa vyžaduje ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu.

Úplné využitie tejto metódy ako hlavného skríningového testu sa odporúča iba v prípade špecializovanej odbornosti.

Poznámka: Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti 10^3 až 10^4 buniek *R. solanacearum* na 1 ml pridaných do extraktov vzoriek, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom. Na dosiahnutie maximálnej citlivosti a špecifickosti sa môže vo všetkých laboratóriách vyžadovať optimalizácia experimentov.

Použite validované činidlá a protokoly pre testy PCR (pozri dodatok 6). Prednostne si zvoľte metódu s vnútornou kontrolou.

Prijmite všetky opatrenia na vylúčenie kontaminácie vzorky cieľovou DNA. Test PCR by mali uskutočniť skúsení technici v laboratóriách na molekulárnu biológiu, aby sa na minimum obmedzila možnosť kontaminácie cieľovou DNA.

S negatívnou kontrolou (extrakcie DNA a postupov PCR) by sa malo vždy pracovať ako s poslednou vzorkou celého postupu, aby bolo zrejmé, či sa vyskytol nejaký prenos DNA.

Test PCR by mal zahŕňať túto negatívnu kontrolu:

— extrakt zo vzorky, ktorá bola predtým testovaná na *R. solanacearum* s negatívnym výsledkom,

— kontrolné pufre použité na extrahovanie baktérie a DNA zo vzorky,

— reakčná zmes pre PCR.

Zahrnutá by mala byť táto pozitívna kontrola:

— alikvotné podiely resuspendovaných peletov, do ktorých sa pridala *R. solanacearum (prípravu pozri v* dodatku 3 B),

— suspenzia 10^6 buniek na 1 ml *R. solanacearum* vo vode z virulentného izolátu (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; pozri dodatok 3 B),

— ak je to možné, použite aj DNA extrahovanú z pozitívnych kontrolných vzoriek pri teste PCR.

Aby sa vylúčila možnosť kontaminácie, pozitívne kontroly pripravujte v prostredí oddelenom od vzoriek, ktoré sa majú testovať.

Extrakty zo vzoriek by mali byť čo najdôkladnejšie zbavené zeminy. Preto ak sa použijú protokoly testu PCR, je v určitých prípadoch vhodné pripravovať extrakty z umytých zemiakov.

Štandardný pozitívny a negatívny kontrolný materiál, ktorý je k dispozícii na použitie pri tomto teste, sa uvádza v dodatku 3.

6.1. Metódy čistenia DNA

Použite vyššie uvedené pozitívne a negatívne kontrolné vzorky (pozri dodatok 3).

Kontrolný materiál testujte rovnakým spôsobom ako vzorku(-y).

K dispozícii je viacero metód čistenia cieľovej DNA zo substrátov komplexných vzoriek, čím sa odstránia inhibítory PCR a iné enzymatické reakcie a skoncentruje sa cieľová DNA v extrakte vzorky. Na použitie pri validovaných metódach PCR, ktoré sú uvedené v dodatku 6, sa optimalizovala nasledujúca metóda.

a) Metóda podľa Pastrika (2000)

1. Pipetou naneste 220 µl lyzovacieho pufra [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] do Eppendorfovej skúmavky s objemom 1,5 ml.

2. Pridajte 100 µl extraktu vzorky a umiestnite na 10 minút do ohrievacieho bloku alebo do vodného kúpeľa s teplotou 95 °C.

3. Skúmavku premiestnite na 5 minút na ľad.

4. Pridajte 80 µl koncentrovaného roztoku lyzozýmu (50 mg lyzozýmu na 1 ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) a inkubujte 30 minút pri teplote 37 °C.

5. Pridajte 220 µl roztoku Easy DNA® solution A (Invitrogen), dobre pretrepte a 30 minút inkubujte pri teplote 65 °C.

6. Pridajte 100 µl roztoku Easy DNA® solution B (Invitrogen), dôkladne pretrepte, až kým precipitát voľne nepláva v skúmavke a vzorka nemá jednotnú viskozitu.

7. Pridajte 500 µl chloroformu a pretrepávajte, až kým viskozita klesne a zmes nie je homogénna.

8. Odstreďujte 20 minút pri odstredivej sile 15 000 g pri teplote 4 °C, aby sa oddelili fázy a vytvorilo sa rozhranie.

9. Hornú fázu premiestnite do čistej Eppendorfovej skúmavky.

10. Pridajte 1 ml 100 % etanolu (– 20 °C), krátko pretrepte a inkubujte na ľade 10 minút.

11. Odstreďujte 20 minút pri odstredivej rýchlosti 15 000 g pri teplote 4 °C a odstráňte etanol z peletu.

12. Pridajte 500 µl 80 % etanolu (– 20 °C) a premiešajte otočením skúmavky hore dnom.

13. Odstreďujte 10 minút pri odstredivej rýchlosti 15 000 g pri teplote 4 °C, zachyťte pelet a odstráňte etanol.

14. Pelet nechajte vyschnúť na vzduchu alebo v DNA Speed Vac.

15. Resuspendujte pelet v 100 µl sterilnej ultračistej vody (UPW) a nechajte stáť pri izbovej teplote najmenej 20 minút.

16. Do použitia na test PCR skladujte pri teplote – 20 °C.

17. Odstredením odstráňte všetok biely precipitát a na test PCR použite 5 µl supernatantu obsahujúceho DNA.

b) Iné metódy

Iné metódy extrakcie DNA, napr. súprava Qiagen DNeasy Plant Kit, by sa mohli použiť za podmienky, že sa dokáže, že sú rovnako účinné pri čistení DNA z kontrolných vzoriek obsahujúcich 10^3 až 10^4 buniek patogénu na 1 ml.

6.2. Test PCR

6.2.1. Podľa validovaných protokolov pripravte pre test PCR testovacie a kontrolné matrice (oddiel VI.A.6). Pripravte jedno desatinné riedenie extraktu zo vzorky DNA (1:10 v UPW).

6.2.2. Podľa uverejnených protokolov (dodatok 6) pripravte v prostredí, v ktorom nedôjde ku kontaminácii, pre test PCR vhodnú reakčnú zmes. Odporúča sa v prípade, ak to je možné, používať viacnásobný protokol PCR, ktorý obsahuje aj vnútornú kontrolu testu PCR.

6.2.3. Podľa protokolov PCR (pozri dodatok 6) pridajte do sterilných PCR skúmaviek 2 až 5 µl extraktu DNA na 25 µl reakčnej zmesi pre PCR.

6.2.4. Vytvorte negatívnu kontrolnú vzorku obsahujúcu iba reakčnú zmes PCR a namiesto vzorky pridajte ultračistú vodu (UPW) z toho istého zdroja, ktorý ste použili pri zmesi PCR.

6.2.5. Skúmavky umiestnite do toho istého termocykléra, ktorý sa použil pri predbežnom testovaní, a spustite vhodne optimalizovaný program PCR (dodatok 6).

6.3. Analýza produktu PCR

6.3.1. Dekódujte amplikóny PCR agarózovou gélovou elektroforézou. Elektroforézu vykonajte na aspoň 12 µl zosilnenej reakčnej zmesi DNA z každej vzorky zmiešanej s 3 µl nanášacieho pufra (dodatok 6) v 2,0 % (hmotnosť/objem) agarózového gélu v tris-octanovom-EDTA pufri (TAE) (dodatok 6) pri napätí 5 až 8 V/cm. Použite vhodný markér DNA, napr. 100 bp ladder.

6.3.2. Zviditeľnite pásiky DNA sfarbením pomocou etidiumbromidu (0,5 mg/l) počas 30 až 60 minút, pričom pri manipulácii s touto mutagénnou látkou je potrebné použiť ochranné opatrenia.

6.3.3. V sfarbenom géle pozorujte krátkovlnnou ultrafialovou transiluminániou (λ = 302 nm) zosilnené produkty PCR predpokladanej veľkosti (dodatok 6) a zdokumentujte ich.

6.3.4. Pri všetkých nových zisteniach/prípadoch si overte autentickosť amplikónu PCR pomocou analýzy reštrikčných enzýmov na vzorke zvyšnej zosilnenej DNA inkubovaním pri optimálnej teplote a optimálne dlhý čas s vhodným enzýmom a pufrom (pozri dodatok 6). Digerované fragmenty oddeľte agarózovou gélovou elektroforézou ako prv a sledujte charakteristický vzor reštrikčného fragmentu pri ultrafialovej transiluminácii po sfarbení etidium bromidom a porovnajte s digerovanou a nedigerovanou pozitívnou kontrolou.

Vyhodnotenie výsledku testu PCR

Test PCR je negatívny, ak v príslušnej vzorke nebol zistený špecifický amplikón PCR *R. solanacearum* očakávanej veľkosti, ale zistí sa vo všetkých pozitívnych kontrolných vzorkách (v prípade viacnásobných testov PCR so špecifickými rastlinnými vnútornými kontrolnými primermi: druhý produkt PCR predpokladanej veľkosti sa musí zosilniť príslušnou vzorkou).

Test PCR je pozitívny, ak sa zistí špecifický amplicon PCR *R. solanacearum* s predpokladanou veľkosťou a reštrikčným vzorom (ak sa vyžaduje), za podmienky, že sa nezosilňuje zo žiadnej negatívnej kontrolnej vzorky. Spoľahlivé potvrdenie pozitívneho výsledku sa dosiahne aj opakovaním testu s druhou sadou primerov PCR (dodatok 6).

Poznámka: Ak sa z pozitívnej kontrolnej vzorky obsahujúcej *R. solanacearum* vo vode získa predpokladaný amplicon, ale z pozitívnych kontrol s *R. solanacearum* v extrakte zo zemiaka sa získajú negatívne výsledky, môže byť podozrenie na inhibíciu PCR. Pri viacnásobných protokoloch PCR s vnútornými kontrolami sa inhibícia reakcie indikuje, ak sa nezíska žiadny z týchto dvoch amplikónov.

Podozrenie na kontamináciu môže byť aj vtedy, ak sa predpokladaný amplicon získa z jednej alebo viacerých negatívnych kontrol.

7. **Test FISH**

Princíp

Keď sa test FISH použije ako prvý skríningový test a zistí sa, že je pozitívny, musí sa ako druhý povinný skríningový test vykonať izolačný test alebo test IF. Keď sa test FISH použije ako druhý skríningový test a zistí sa, že je pozitívny, na stanovenie úplnej diagnózy sa vyžaduje ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu.

Poznámka: Použite validované špecifické oligopróby pre *R. solanacearum* (pozri dodatok 7). Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti najmenej 10^3 až 10^4 buniek *R. solanacearum* na 1 ml pridaných do extraktov vzoriek, ktoré boli predtým testované s negatívnym výsledkom.

Nasledujúce postupy by sa mali prednostne vykonávať na čerstvo pripravených extraktoch zo vzoriek, ale úspešne sa môžu použiť aj pri extrakte zo vzorky, ktorý sa skladoval v glyceríne pri teplote od – 16 do – 24 °Calebo od – 68 do – 86 °C.

Ako negatívnu kontrolu použite alikvotný podiel extraktu vzorky, ktorá bola predtým testovaná na *R. solanacearum* s negatívnym výsledkom.

Ako pozitívne kontroly si pripravte suspenzie obsahujúce na 1 ml 10^5 až 10^6 buniek *R. solanacearum* biovar 2 (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, pozri dodatok 3) v 0,01M fosfátového pufra (PB) z 3 až 5-dňovej kultúry. Samostatne pripravte podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou z homologického kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *R. solanacearum* suspendovanou v extrakte zo zemiaka podľa špecifikácie v dodatku 3B.

Použitie eubaktériovej oligopróby s označením FITC umožňuje kontrolu procesu hybridizácie, pretože sfarbí všetky eubaktérie, ktoré sú prítomné vo vzorke.

Štandardný pozitívny a negatívny kontrolný materiál, ktorý je k dispozícii na použitie pri tomto teste, sa uvádza v dodatku 3 bode A.

Kontrolný materiál testujte presne tým istým spôsobom ako vzorku(-y).

7.1. Fixácia extraktu zo zemiaka

Tento protokol je podľa Wullings *et al.* (1998):

7.1.1. Pripravte fixačný roztok (pozri dodatok 7).

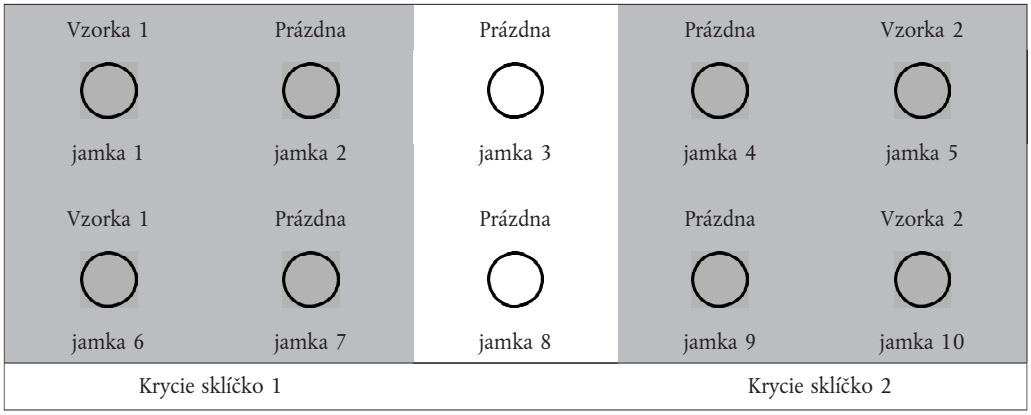
7.1.2. Pipetou preneste 100 µl každého extraktu zo vzorky do Eppendorfovej skúmavky a 7 minút odstreďujte pri odstredivej sile 7 000 g.

7.1.3. Dekantujte supernatant a rozpustite pelet v 200 µl fixatívu pripraveného < 24 hodín vopred. Pretrepte a 1 hodinu inkubujte v chladničke.

7.1.4. Odstreďujte 7 minút pri odstredivej rýchlosti 7 000 g, dekantujte supernatant a resuspendujte pelet v 75 µl 0,01M PB (pozri dodatok 7).

7.1.5. Naneste 16 µl zafixovanej suspenzie na čisté viacobjektové podložné sklíčko podľa obr. 7.1. Na každé podložné sklíčko naneste 2 rôzne nezriedené vzorky a použite 10 µl na prípravu roztoku 1:100 (v 0,01 M PB). Zvyšná vzorka roztoku (49 µl) sa po pridaní 1 objemovej jednotky 96 % etanolu môže skladovať pri teplote – 20 °C. V prípade, že sa skúška FISH musí opakovať, odstráňte etanol odstredením a pridajte rovnaký objem 0,01 PB (zmiešajte pretrepaním).

Obr. 7.1 Schéma podložného sklíčka pri teste FISH



7.1.6. Podložné sklíčka osušte na vzduchu (alebo v sušičke pri teplote 37 °C) a zafixujte ich flambovaním.

V tomto štádiu sa proces môže prerušiť a hybridizácia môže pokračovať nasledujúci deň. Podložné sklíčka by sa mali skladovať v bezprašnom prostredí, v suchu a pri izbovej teplote.

7.2. Hybridizácia

7.2.1. Bunky dehydrujte ich postupným ponorením do 50 %, 80 % a 96 % etanolu, do každého na 1 minútu. Podložné sklíčka osušte na vzduchu umiestnené v stojane.

7.2.2. Pripravte vlhkú inkubačnú komoru tak, že dno vzduchotesnej nádoby prikryjete hodvábnym alebo filtrovacím papierom nasiaknutým hybmixom 1x (dodatok 7). Box predinkubujte v hybridizačnej peci pri teplote 45 °C najmenej 10 minút.

7.2.3. Do 8 jamiek každého podložného sklíčka (jamky 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 a 10; pozri obr. 7.1) dajte 10 µl hybridizačného roztoku (dodatok 7) a dve stredné jamky (3 a 8) nechajte prázdne.

7.2.4. Na prvé a posledné 4 jamky priložte krycie sklíčka (24 × 24 mm) tak, aby v nich nezostal vzduch. Podložné sklíčka vložte do predhriatej vlhkej komory a 5 hodín hybridizujte v tme v peci pri teplote 45 °C.

7.2.5. Pripravte 3 kadičky obsahujúce 1 l vody Mili Q (molekulárny gradient), 1 l hybmixu 1x (334 ml 3x hybmixu a 666 ml vody Mili Q) a 1 l hybmixu 1/8x (42 ml 3x hybmixu a 958 ml vody Mili Q). Každú kadičku predinkubujte vo vodnom kúpeli pri teplote 45 °C.

7.2.6. Z podložných sklíčok odložte krycie sklíčka a podložné sklíčka umiestnite do stojana.

7.2.7. Prebytočnú sondu vyplavte inkubovaním 15 minút v kadičke s hybromixom 1x pri teplote 45 °C.

7.2.8. Držiak s podložnými sklíčkami premiestnite do premývacieho roztoku hybmixu 1/8x a inkubujte ďalších 15 minút.

7.2.9. Podložné sklíčka krátko ponorte do vody Mili Q a položte ich na filtrovací papier. Prebytočnú vodu odstráňte jemným priložením filtrovacieho papiera na povrch. Pipetou pridajte do každej jamky 5 až 10 µl roztoku krycej kvapaliny na udržanie signálu (napr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA alebo rovnocennú) a na celé podložné sklíčko priložte veľké krycie sklíčko (24 × 60 mm).

7.3. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH

7.3.1. Podložné sklíčka okamžite prehliadnite pod vhodným epifluorescenčným mikroskopom s olejovou imerziou pri 630- alebo 1 000-násobnom zväčšení. S filtrom, ktorý je vhodný na fluorescenčný izotiokyanát (FITC), sú eubaktériové bunky (vrátane väčšiny gram-negatívnych buniek) vo vzorke sfarbené a fluoreskujú na zeleno. Ak sa použije filter na tetrametylrodamín-5-izotiokyanát, bunky *R. solanacearum* sfarbené Cy3 fluoreskujú na červeno. Morfológiu buniek porovnajte s morfológiou pozitívnej kontroly. Bunky musia jasno fluoreskovať a byť úplne sfarbené. Ak je sfarbenie odchylné, test FISH (oddiel VI.A.7) sa musí zopakovať. Jamky prehliadnite vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a po obvode. Pri vzorkách vykazujúcich malý počet buniek alebo nevykazujúcich žiadne bunky prehliadnite najmenej 40 mikroskopických políčok.

7.3.2. V testovacích jamkách testovacích podložných sklíčok (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main) pozorujte jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *R. solanacearum*. Intenzita fluorescencie musí byť rovnaká alebo vyššia ako fluorescencia kmeňa pozitívnej kontroly. Bunky s neúplným sfarbením alebo slabou fluorescenciou sa neberú do úvahy.

7.3.3. Ak je akékoľvek podozrenie na kontamináciu, test sa musí zopakovať. Môže to byť v prípade, keď sa na všetkých podložných sklíčkach v dávke nachádzajú pozitívne bunky kvôli kontaminácii pufra, alebo ak sa pozitívne bunky zistia (mimo jamiek) na podložných sklíčkach.

7.3.4. So špecifickosťou testu FISH sa spája niekoľko problémov. Vo výrezkoch z pupkových koncov hľúz a v peletoch zo segmentov stonky sa môžu vyskytnúť nežiadúce populácie fluoreskujúcich buniek s netypickou morfológiou a saprofytické baktérie s krížovou reakciou podobnej veľkosti a morfológie ako *R. solanacearum*, hoci zriedkavejšie ako pri teste IF.

7.3.5. Do úvahy vezmite len fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou.

7.3.6. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH:

i) Platné výsledky testu FISH sa dosiahnu, ak sa s použitím filtra FITC pozorujú jasne zelené fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *R. solanacearum* a rhodaminového filtra červené fluoreskujúce bunky vo všetkých pozitívnych kontrolách, ale v žiadnej negatívnej kontrole. Ak sa zistia jasné fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, odhadnite priemerný počet typických buniek na mikroskopické políčko a vypočítajte počet typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu (dodatok 4). Vzorky s najmenej 5×10^3 typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa považujú za potenciálne kontaminované. Vyžaduje sa ďalšie testovanie. Vzorky s menej ako 5×10^3 typických buniek na 1 ml resuspendovaného peletu sa považujú za negatívne.

ii) Test FISH je negatívny, ak sa pomocou rodamínového filtra nezistia jasnočervené fluoreskujúce bunky s veľkosťou a morfológiou typickou pre *R. solanacearum* za predpokladu, že v pozitívnych kontrolných preparátoch sa s použitím rodamínového filtra pozorujú typické jasnočervené fluoreskujúce bunky.

8. **Testy ELISA**

Princíp

Test ELISA sa môže používať len ako nepovinný test popri teste IF, PCR alebo FISH z dôvodu relatívne nízkej citlivosti tohto testu. Pri použití testu DAS ELISA je obohacovanie a použitie monoklónnych protilátok povinné (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Obohacovanie vzoriek pred použitím testu ELISA môže byť užitočné z dôvodu zvýšenia citlivosti testu, ale môže byť neúspešné v dôsledku konkurenčného pôsobenia iných organizmov vo vzorke.

Poznámka: Použite validovaný zdroj protilátok pre *R. solanacearum* (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Odporúča sa, aby sa pre každú novú dávku protilátok určil titer. Titer sa definuje ako najvyššie riedenie pri ktorom sa optimálne reakcie objavujú, keď sa testuje suspenzia obsahujúca10^5 až 10^6 buniek na ml homologického kmeňa *R. solanacearum* a keď sa použijú primerané sekundárne protilátkové konjugáty podľa odporúčaní výrobcu. Počas testovania by sa protilátky mali použiť v pracovnom riedení podobnom titri alebo v titri komerčnej receptúry.

Na suspenzii s 10^5 až 10^6 bunkami na ml homologického kmeňa *R. solanacearum* určite titer protilátok.

Zahrňte extrakt vzorky, ktorá bola pri predchádzajúcom teste na *R. solanacearum* negatívna a suspenziu baktérie, pri ktorej nedochádza k vzájomným reakciám vo fosfátovom pufrovanom roztoku (STP), ako negatívne kontroly.

Ako pozitívnu kontrolu použite alikvotný podiel vzorkového extraktu, ktorý bol pri predchádzajúcom teste negatívny, zmiešajte ho s 10^3 až 10^4 bunkami na ml biovaru 2 *R. solanacearum* (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, pozri dodatok 2A a B). Na porovnanie výsledkov na každej platni použite štandardnú suspenziu z 10^5 až 10^6 buniek na ml vo fosfátovom pufrovanom roztoku (STP) *R. solanacearum*. Zabezpečte, aby boli pozitívne kontroly dobre oddelené na mikrotitračnej platni od testovanej vzorky (vzoriek).

Normalizované kontrolné materiály pre pozitívne a negatívne kontroly, ktoré sú dostupné pre tento test, sa uvádzajú v dodatku 3 bode A.

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

Boli validované dva ELISA protokoly.

a) Nepriamy test ELISA (Robinson Smith a kol., 1995)

1. Použite 100 – 200 µl alikvotného podielu vzorkového extraktu. (Zahriatím na 100 °C na 4 minúty vo vodnom kúpeli alebo zahrievacom bloku môžete v niektorých prípadoch znížiť nešpecifické výsledky).

2. Pridajte alikvotný objem dvojnásobne silného krycieho pufra (dodatok 4) a premiešajte.

3. Použite 100 µl alikvotného podielu pre každú z najmenej 2 jamiek mikrotitračnej platne (napr. Nunc-Polysorp alebo ekvivalent) a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C alebo cez noc pri teplote 4 °C.

4. Extrakty z jamiek celkom odstráňte. Jamky vymyte trikrát fosfátovým pufrom (PBS) s tvínom (dodatok 4), pričom by posledný premývací roztok mal v jamkách zostať aspoň 5 minút.

5. Pripravte vhodné riedenie protilátok pre *R. solanacearum* v blokačnom (protilátkovom) pufri (dodatok 4). Pre validované komerčné protilátky použite odporúčané riedenie (obyčajne s dvojnásobne vyššou koncentráciou ako má titer).

6. Pridajte 100 µl do každej jamky a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

7. Z jamiek celkom odstráňte protilátkový roztok a umyte ich ako pri predchádzajúcom postupe (bod 4).

8. Pripravte vhodné riedenie sekundárneho konjugátu alkalickej fosfatázy v blokačnom pufri. Pridajte 100 µl do každej jamky a inkubujte 1 hodinu pri teplote 37 °C.

9. Z jamiek celkom odstráňte konjugátovú protilátku a umyte ich ako pri predchádzajúcom postupe (bod 4).

10. Do každej jamky pridajte 100 µl substrátového alkalického roztoku fosfatázy (dodatok 4). Inkubujte na tmavom mieste pri priaznivej teplote a absorbanciu odčítajte pri vlnovej dĺžke 405 nm v pravidelných intervaloch v rozsahu 90 min.

b) Test DASI ELISA

1. Pripravte primeraný roztok anti-*R. solanacearum* polykonálnych immunoglobulínov v krycom pufri pH 9,6 (dodatok 4). Pridajte 200 µl do každej jamky. Inkubujte pri teplote 37 °C počas 4 – 5 hodín alebo pri teplote 4 °C počas 16 hodín.

2. Jamky umyte trikrát s PBS-tvínom (dodatok 4).

   Pridajte 190 µl vzorkového extraktu do najmenej 2 jamiek. Pridajte tiež pozitívne a negatívne kontroly do dvoch jamiek na každej platni. Inkubujte 16 hodín pri teplote 4 °C.

3. Jamky umyte trikrát s PBS-tvínom (dodatok 4).

4. Pripravte vhodné riedenie *R. solanacearum-špecifické* monokolónne protilátky v PBS (dodatok 4), ktoré tiež obsahujú 0,5 % albumínu hovädzieho séra (BSA) a pridajte 190 µl do každej jamky. Inkubujte pri teplote 37 °C počas 2 hod.

5. Jamky umyte trikrát s PBS-tvínom (dodatok 4).

6. Pripravte vhodné riedenie protimyších imunoglobulínov konjugovaných s alkalickou fosfatázou v PBS. Pridajte 190 µl do každej jamky. Inkubujte pri teplote 37 °C počas 2 hod.

7. Jamky umyte trikrát s PBS-tvínom (dodatok 4).

8. Pripravte substrátový alkalický roztok fosfatázy obsahujúci 1 mg p-nitrofenylfosfátu na ml substrátového pufra (dodatok 4). Pridajte 200 µl do každej jamky. Inkubujte na tmavom mieste pri priaznivej teplote a absorbanciu odčítajte pri vlnovej dĺžke 405 nm v pravidelných intervaloch v rozsahu 90 min.

Vyhodnotenie výsledkov testu ELISA:

Test ELISA je negatívny, ak hodnota priemernej optickej hustoty (OH) z jamiek s duplikátom vzorky je < 2x OH kontrolnej jamky negatívneho vzorkového extraktu pod podmienkou, že OH pre pozitívne kontroly je vyššia ako 1,0 (po 90 minútach inkubácie so substrátom) a je väčšia ako dvojnásobná OH získaná pre negatívne vzorkové extrakty.

Test ELISA je pozitívny, ak priemerné hodnoty OH z jamiek s duplikátom vzorky sú > 2x OH v jamke s negatívny vzorkovým extraktom pod podmienkou, že OH hodnoty vo všetkých jamkách s negatívnou kontrolou sú < 2x OH hodnoty v jamkách s pozitívnou kontrolou.

Negatívne hodnoty testu ELISA v jamkách pre pozitívnu kontrolu naznačujú, že test nebol urobený správne alebo bol inhibovaný. Pozitívne hodnoty testu ELISA v jamkách pre negatívnu kontrolu naznačujú, že došlo ku vzájomnej kontaminácii alebo k nešpecifickej protilátkovej väzbe.

9. **Biotest**

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

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

Nasledujúci protokol vychádza z metódy podľa Jansea (1988):

9.1. Použite 10 testovacích rastlín a citlivý rajčiakový kultivar (napr. Moneymaker alebo kultivar s rovnakou citlivosťou, aká bola určená v testujúcom laboratóriu) v tretej skutočnej rastovej fáza pre každú vzorku. Ohľadom podrobností o kultivácii, pozri dodatok 8. Alternatívne použite baklažány (napr. kultivar Black Beauty alebo kultivary s rovnakou vnímavosťou), použite len rastliny v rastovej fáze 2 – 3 až do úplnej expanzie tretej skutočnej rastovej fázy. Symptómy sa prejavili ako menej vážne a ich vývoj v baklažáne je pomalší. V možných prípadoch sa preto odporúča použiť rajčiakové semenáče.

9.2. Medzi testované rastliny rozdelíme 100 µl vzorkového extraktu.

9.2.1. Naočkovanie injekčnou striekačkou

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

9.2.2. Naočkovanie pozdĺžneho rezu

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

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

Rez uzavrite sterilnou vazelínou z injekčnej striekačky.

9.3. Rovnakým postupom naočkujte 5 semenáčov s vodnou suspenziou 10^5 až 10^6 buniek na ml pripravenou zo 48 hodinovej kultúry virulentného kmeňa biovaru 2 *R. solanacearum* ako pozitívnou kontrolou a s pufrom peletu (dodatok 4) ako negatívnou kontrolou. Oddeľte rastliny s pozitívnou a negatívnou kontrolou od ostatných rastlín, aby nedochádzalo ku vzájomnej kontaminácii.

9.4. Testovacie rastliny pestujte v karanténnych zariadeniach najdlhšie 4 týždne pri teplote 25 – 30 °C a vysokej relatívnej vlhkosti s príslušným zalievaním, aby nedochádzalo k podmokaniu alebo vädnutiu v dôsledku nedostatku vody. Aby ste zabránili kontaminácii, inkubujte rastliny s pozitívnou a negatívnou kontrolou na jasne oddelených častiach v skleníku alebo v miestnosti na pestovanie, alebo v prípade obmedzeného priestoru, zabezpečte prísne oddelenie medzi jednotlivými postupmi. Ak musia byť rastliny na rôzne vzorky inkubované v tesnej blízkosti, oddeľte ich vhodnými clonami. Pri oplodňovaní, zalievaní, kontrole a iných manipuláciách musíte dávať veľký pozor, aby nedošlo ku vzájomnej kontaminácii. Je potrebné, aby sa skleníky a miestnosti na pestovanie udržiavali chránené pred pesticídami hmyzu, ktoré môžu preniesť baktériu zo vzorky na vzorku.

Pozorujte symptómy vädnutia, epinastie, chlorózy a/alebo zakrpatenia.

9.5. Izolujte od infikovaných rastlín (kapitola II.3) a určite vyčistené kultúry predpokladaného *R. solanacearum* (kapitola VI. B).

9.6. Ak po 3 týždňoch nepozorujete žiadne symptómy, uskutočnite IF/PCR/izoláciu na zmiešanej vzorke z centimetrových častí stonky každej testovanej rastliny, ktoré odoberiete nad miestom očkovania. Ak je test pozitívny, vykonajte riedenie na platničke (kapitola 4.1).

9.7. Určite akékoľvek vyčistené kultúry predpokladaného *R. solanacearum* (kapitola VI. B).

Zhodnotenie výsledkov biotestu

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

Biotest je negatívny, ak testované rastliny nie sú infikované *R. solanacearum* a pod podmienkou, že *R. solanacearum* sa zistí pri pozitívnych kontrolách.

Biotest je pozitívny, ak sú testované rastliny nainfikované baktériou *R. solanacearum*.

B. *IDENTIFIKAČNÉ TESTY*

Pomocou najmenej dvoch z nasledujúcich testov založených na rozličných biologických princípoch identifikujte čisté kultúry izolátov predpokladaného *R. solanacearum*.

V potrebných prípadoch pre každý uskutočňovaný test zahrňte známe referenčné kmene (pozri dodatok 3).

1. **Nutričné a enzymatické identifikačné testy**

Určite nasledujúce fenotypické vlastnosti, ktoré sú všeobecne prítomné alebo neprítomné v *R. solanacearum* na základe metód podľa Lelliotta a Steada (1987), Klement *a kol.* (1990), Schaad (2001).

Test	Očakávaný výsledok
Produkcia fluoreskujúceho pigmentu	–
Prítomnosť poly-β-hydroxybutyratu	+
Oxidačno-fermentačný test (O/F)	O+/F–
Katalázová aktivita	+
Kováčov oxidačný test	+
Redukcia dusíka	+
Použitie citrátu	+
Rast pri 40 °C	–
Rast v 1 % NaCl	+
Rast v 2 % NaCl	–
Arginín dihydrolázová aktivita	–
Skvapalňovanie želatíny	–
Hydrolýza škrobu	–
Hydrolýza eskulínu	–
Produkcia levanu	–

2. **Test IF**

2.1. Pripravte suspenziu približne z 10^6 buniek na ml v pufri IF (dodatok 4).

2.2. Pripravte sériu dvojnásobného riedenia príslušného antiséra (pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.3. Použite postup IF (kapitola VI.A.5).

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

3. **Test ELISA**

Poznámka: Ak robíte len 2 identifikačné testy, k tejto metóde nepoužite žiadny dodatočný serologický test.

3.1. Pripravte suspenziu z približne 10^8 buniek na ml v 1X STP (PBS) (dodatok 4).

3.2. Uskutočnite príslušný postup ELISA so špecifickou monoklonálnou protilátkou pre *R. solanacearum*.

3.3. Pozitívny test ELISA dosiahnete, ak hodnota testu ELISA získaná z kultúry je aspoň polovičná v porovnaní s hodnotou získanou pri pozitívnej kontrole.

4. **Testy PCR**

4.1. Pripravte suspenziu približne z 10^6 buniek na ml v sterilnej vode molekulárneho gradientu.

4.2. Zahrejte 100 µl bunkovej suspenzie v uzavretých skúmavkách 4 minúty v zahrievacom bloku alebo vo vriacom vodnom kúpeli pri teplote 100 °C. Vzorky môžete následne uložiť pri teplote – 16 až – 24 °C, až kým ich nebudete potrebovať.

4.3. Použite príslušné postupy PCR na zdôraznenie špecifických amplikónov *R. solanacearum* [napr. Seal *a kol.* (1993); Pastrik a Maiss (2000); Pastrik *a kol.* (2002); Boudazin *a kol.* (1999); Opina *a kol.* (1997), Weller *a kol.* (1999)].

4.4. Pozitívnu identifikáciu *R. solanacearum* dosiahnete, ak majú PCR amplikóny rovnakú veľkosť a vyznačujú sa rovnakým polymorfizmom s obmedzenou dĺžkou fragmentu.

5. **Test FISH**

5.1. Pripravte suspenziu približne z 10^6 buniek na ml v UPW.

5.2. Uskutočnite postupy FISH (kapitola VI.A.7) s najmenej dvomi *R. solanacearum* – špecifickými oligopróbami (dodatok 7).

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

6. **Analýza mastných kyselín (FAP)**

6.1. Kultúru pestujte na tryptikázovom sójovom agare (Oxoid) 48 hodín pri teplote 28 °C.

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

6.3. Pozitívny test FAP dosiahnete, ak je profil predpokladanej kultúry totožný s profilom pozitívnej kontroly. Prítomnosť charakteristických mastných kyselín je 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH a 18:1 2OH a absencia 16:0 3OH je významným určovateľom *Ralstonia* sp.

7. **Metódy pre charakterizáciu kmeňa**

Charakterizácia kmeňa pomocou jednej z nasledujúcich metód sa odporúča pre každý nový prípad izolácie *R. solanacearum*.

V potrebných prípadoch zahrňte pre každý uskutočňovaný test známe referenčné kmene (pozri dodatok 3).

7.1. Určenie biovaru

R. solanacearum sa rozdeľuje do biovarov na základe schopnosti použiť a/alebo oxidovať tri disacharidy a tri alkoholy hexózy (Hayward, 1964 a Hayward a kol., 1990). Médiá rastu pre biovarový test sú popísané v dodatku 2. Test sa môže úspešne uskutočniť naočkovaním média vstreknutím čistých kultúr izolátov *R. solanacearum* a inkubovaním pri teplote 28 °C. Ak sa médiá rozdelia do sterilných platní s bunkovou kultúrou s 96 jamkami (200 µl na jamku), môžete pozorovať zmenu farby z olivovo zelenej na žltú v priebehu 72 hodín, ktorá znamená pozitívny výsledok testu.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Použitie:					
Maltózy	–	+	+	–	+
Laktózy	–	+	+	–	+
D (+) Cellobiózy	–	+	+	–	+
Manitu	–	–	+	+	+
Sorbitu	–	–	+	+	–
Dulcitu	–	–	+	+	–

Dodatočné testy diferencujú 2 sub-fenotypy biovaru

	Biovar 2A (Celosvetové rozšírenie)	Biovar 2A (Zistený v Čile a Kolumbii)	Biovar 2T (Zistený v tropických oblastiach)
Použitie trehalózy	–	+	+
Použitie *mezo*-inozitolu	+	–	+
Použitie ribózy D	–	–	+
Pektolytická aktivita ([1])	nízka	nízka	vysoká

([1]) Pozri Lelliott a Stead (1987).

7.2. Genomic fingerprinting

Molekulárna diferenciácia kmeňov v komplexe *R. solanacearum* sa môže dosiahnuť pomocou viacerých techník, vrátane:

7.2.1. analýzy polymorfizmu s obmedzenou dĺžkou fragmentov (RFLP) (Cook *a kol.*, 1989);

7.2.2. opakovanej sekvencie PCR pomocou iniciátorov REP, BOX a ERIC (Louws *a kol.*, 1995; Smith *a kol.*, 1995);

7.2.3. analýzy polymorfizmu s obmedzenou dĺžkou fragmentov (AFLP) (Van der Wolf *a kol.*, 1998).

7.3. Metódy PCR

Špecifické iniciátory PCR (Pastrik *a kol*, 2002; pozri dodatok 6) sa môžu použiť na diferenciáciu kmeňov patriacich do oddielu 1 (biovary 3, 4 a 5) a oddielu 2 (biovary 1, 2A a 2T) *R. solanacearum* na základe pôvodnej definície podľa analýzy RFLP (Cook *a kol.*, 1989) a 16S rDNA sekvencovania (Taghavi *a kol.*, 1996).

C. *KONFIRMAČNÝ TEST*

Test patogenity sa musí vykonať ako konečné potvrdenie diagnózy *R. solanacearum* a na zhodnotenie virulencie kultúr identifikovaných ako *R. solanacearum*.

1. Pripravte očkovaciu látku z približne 10^6 buniek na ml z 24 – 28 hodinovej kultúry izolátu určeného na testovanie a príslušný kmeň *R. solanacearum* s pozitívnou kontrolou (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; pozri dodatok 3).

2. Naočkujte 5 – 10 vnímavých rajčinových alebo baklažánových semenáčov v tretej skutočnej rastovej fáze (pozri kapitolu VI.A.9).

3. Inkubujte najviac 2 týždne pri teplote 25 – 28 °C a vysokej relatívnej vlhkosti s vhodným zalievaním, aby nedochádzalo k podmokaniu alebo stresu zo sucha. Pri čistých kultúrach by sa typické vädnutie malo prejaviť do 14 dní. Ak sa po tomto období neprejavia príznaky tohto ochorenia, kultúra sa nemôže označiť za patogénnu formu *R. solanacearum*.

4. Pozorujte symptómy vädnutia a/alebo epinastie, chlorózy a zakrpatenia.

5. Izolujte zo symptomatických rastlín časť stopky asi 2 cm nad bodom očkovania. Pokračujte a rozptýľte v malom množstve sterilnej destilovanej vody alebo 50mM fosforečnanového pufra (dodatok 4). Izolujte zo suspenzie rozstreknutím alebo vstreknutím roztoku na vhodné médium preferenčne na selektívne médium (dodatok 2), inkubujte 48 – 72 hodín pri teplote 28 °C a pozorujte vytváranie kolónií typických pre *R. solanacearum*.

Dodatok 1

Laboratóriá zúčastnené na optimalizácii a validácii protokolov

Laboratórium (1)	Miesto	Krajina
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viedeň a Linz	Rakúsko
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgicko
Plantedirektoratet	Lyngby	Dánsko
Central Science Laboratory	York	Anglicko
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Škótsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Francúzsko
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Francúzsko
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Nemecko
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Nemecko
State Laboratory	Dublin	Írsko
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Taliansko
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Taliansko
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Holandsko
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Holandsko
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lisabon	Portugalsko
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Španielsko
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španielsko
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švédsko

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

Dodatok 2

Médiá na izoláciu a kultiváciu *R. solanacearum*

a) **Všeobecné médiá rastu**

Živný agar (NA)

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

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

Kvasnicovo-peptónovo-glukózový agar (YPGA)

Kvasnicový extrakt (Difco)	5,0 g
Peptón bacto (Difco)	5,0 g
Monohydrát D(+) glukózy	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

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

Sacharózovo-peptónový agar (SPA)

Sacharóza	20,0 g
Peptón bacto (Difco)	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,0 l
pH 7,2–7,4	

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

Kelmanovo médium tetrazolium

Kyseliny Casamino (Difco)	1,0 g
Peptón bacto (Difco)	10,0 g
Dextróza	5,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

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

Ochladťe na 50 °C a pridáme filtrom sterilizovaný roztok 2,3,5-trifenyl tetrazolium chloridu (Sigma), aby ste dosiahli konečnú koncentráciu 50 mg na l.

b) **Validované selektívne médiá rastu**

Médium SMSA (Englebrecht, 1994, upravené podľa Elphinstonea a kol., 1996)

Základné médium	
Kyseliny Casamino (Difco)	1,0 g
Peptón bacto (Difco)	10,0 g
Glycerín	5,0 ml
Bacto-agar (Difco) (pozri *poznámku 2*).	15,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

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

Ochladťte na 50 °C a pridajte filtrom sterilizované vodné zásobné roztoky nasledujúcich prísad, aby ste získali špecifické konečné koncentrácie:

Kryštálová violeť (Sigma)	5 mg na l
Polymixin-B-sulfát (Sigma P-1004)	600 000 U (približne 100 mg) na l
Bacitracín (Sigma B-0125)	1 250 U (približne 25 mg) na l
Chloramfenikol (Sigma C-3175)	5 mg na l
Penicilín-G (Sigma P-3032)	825 U (približne 0,5 mg) na l
2,3,5-trifenyl tetrazolium chlorid (Sigma)	50 mg na l

Poznámka:

1. Používanie reagentov iných ako tie, ktoré sú špecifikované vyššie, môže ovplyvniť rast *R. solanacearum*.
2. Oxoid Agar #1 sa môže použiť namiesto Bacto-agaru (Difco). V takom prípade sa rast *R. solanacearum* spomalí, aj keď rast konkurujúcich saprofytov sa môže tiež znížiť. Typické kolónie *R. solanacearum* sa môžu formovať o 1–2 dni dlhšie a červené sfarbenie môže byť svetlejšie a rozptýlenejšie ako pri Bacto-agare.
3. Rastúca koncentrácia bacitracínu až do výšky 2 500 U na l môže znížiť populácie súťažiacich baktérií bez toho, aby sa ovplyvnil rast *Ralstonia solanacearum*.

Médiá uskladnite a roztoky antibiotík uložíme pri teplote 4 °C na tmavom mieste a použite v priebehu 1 mesiaca.

Podložné sklíčka by sa mali pred použitím zbaviť povrchovej kondenzácie.

Vyhnite sa priamemu vysušovaniu podložných sklíčok.

Kontrola kvality by sa mala uskutočniť po príprave každej novej dávky média platničkovaním suspenzie referenčnej kultúry *R. solanacearum* (pozri dodatok 3) a pozorovaním vytvárania typických kolónií po inkubovaní pri teplote 28 °C na 2 až 5 dní.

c) **Validované obohacovacie médiá**

Roztok SMSA (Elphinstone a kol., 1996)

Pripravte ako pre selektívne agarové médium, ale vynechajte Bacto-agar a 2,3,5-tetrazolium chlorid.

Modifikovaný Wilbrinkov roztok (Caruso a kol., 2002)

Sacharóza	10g
Proteózny peptón	5g
K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4$	0,25g
$NaNO_3$	0,25g
Destilovaná voda	1 l

Sterilizujte v autokláve pri teplote 121 °C počas 15 minút a ochladťte na 50 °C.

Pridajte antibiotické uskladnené roztoky ako pri roztoku SMSA.

Dodatok 3

A. **Komerčne dostupný normalizovaný kontrolný materiál**

a) *Bakteriálne izoláty*

Nasledujúce bakteriálne izoláty sa odporúčajú na použitie ako štandardný referenčný materiál buď ako pozitívne kontroly (tauľka 1), alebo počas optimalizácie testov, aby nedošlo ku vzájomným reakciám (tabuľka 2). Všetky kmene sú komerčne dostupné v:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Veľká Británia;

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Holandsko;

3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francúzsko.

Tabuľka 1 Referenčný SMT panel izolátov *R. solanacearum*

Kód NCPPB	SMT #	Ďalšie kódy	Krajina pôvodu	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypt	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turecko	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Anglicko	2
NCPPB 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cyprus	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Švédsko	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgicko	2
NCPPB 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Holandsko	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15.59	Francúzsko	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPPB 4066	Portugalsko	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632-2	Španielsko	2
NCPPB 4161	76	B3B	Nemecko	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONg7	Kostarika	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbia	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP312	Brazília	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Austrália	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CMIb2861	Srí Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipíny	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Čína	5

(*) Použite ako štandardný referenčný kmeň biovaru 2 *R. solanacearum* (rasa 3).

Poznámka: Autenticita vyššie uvedených kmeňov môže byť zaručená len vtedy, ak sú získané z autentickej kultivačnej zbierky.

Tabuľka 2 Referenčný SMT panel serologicky alebo geneticky príbuzných baktérií na použitie pri optimalizácii detekčných testov

NCPPB Kód	SMT #	Ďalší kód	Identifikácia
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	*Bacillus polymyxa* (1)
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	*Pseudomonas marginalis pv. marginalis* (1)
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	*Burkholderia cepacia* (2)
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	*Ralstonia pickettii* (2)
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	*Ralstonia pickettii* (1)
NCPPB 4167	60	PCFBP 4618 D 2778	*Ralstonia* sp. (1)
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	*Burkholderia andropogonis* (1)
NCPPB 353	54	CFBP 3572	*Burkholderia caryophylli* (1)
NCPPB 945	55	CFBP 3569	*Burkholderia cepacia* (1)
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	*Burkholderia glumae* (1)
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	*Burkholderia plantarii* (1)
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	*Banana Blood Disease Bacterium* (1) (2) (3)
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4169	62	IPO 1695	*Enterobacter* sp. (1)
NCPPB 4170	63	CFBP4621 IPO S306	*Ochrobactrum anthropi* (1) (2)
NCPPB 4171	64	CFBP4622 IPO 1693	*Curtobacterium* sp. (1) (2)
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	*Pseudomonas* sp. (1)
NCPPB 4173	—	PD 2318	*Aureobacterium* sp. (2)
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	*Flavobacterium* sp. (1) (2)

(1) Potenciálny vzájomne reagujúci kmeň pri serologickom teste (IF a/alebo ELISA) s polyklónnymi antisérami.
(2) Kmeň, z ktorého sa môže amplifikovať produkt PCR v niektorých laboratóriách rovnakej veľkosti, aká sa očakáva pri použití špecifických primerov OLI-1 a Y-2 (pozri dodatok 6).
(3) Náklonný na vzájomnú reakciu pri väčšine testov, ale podľa doterajších zistení sa vyskytuje len na banánoch v Indonézii.

b) *Komerčne dostupný normalizovaný kontrolný materiál*

Nasledujúci štandardný kontrolný materiál je dostupný zo zbierky kultúr NCPPB.

Zmrazte vysušený pelet zemiakového extraktu z 200 zdravých zemiakových hľúz ako negatívnu kontrolu pre všetky testy.

Zmrazte vysušený pelet zemiakového extraktu z 200 zdravých zemiakových hľúz obsahujúci 10^3 až 10^4 a 10^4 až 10^6 buniek biovaru 2 *R. solanacearum* (kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) ako pozitívne kontroly pre serologický test a test PCR. Keďže životnosť bunky sa počas zmrazovania a vysušovania narúša, nie sú to vhodné štandardné kontroly pre izolačné alebo biologické testy.

Formalín zachycujúce suspenzie biovaru 2 *R. solanacearum* (kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) pri 10^6 bunkách na ml ako pozitívne kontroly pre serologické testy.

B. **Príprava pozitívnych a negatívnych kontrol pre skríningové testy výrezkov PCR/IF a FISH**

Vyrobte 48 hodinovú kultúru virulentného kmeňa *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na základnom médiu SMSA a suspendujte v 10 mM fosfátového pufra, aby ste dosiahli bunkovú hustotu približne 2×10^8 cfu na ml. Toto sa obyčajne dosiahne pomocou slabo zakalenej suspenzie, ktorá je ekvivalentná s optickou hustotou 0,15 pri 600 nm.

Odstráňte kužeľovité výrezky pupkových koncov z 200 hľúz pochádzajúcich z produkcie odrody s bielou šupkou, o ktorej vieme, že neobsahuje *R. solanacearum*.

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

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

Umiestnite 100 µl suspenzie *R. solanacearum* do prevej mikroskúmavky. Pretrepte.

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

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

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

Prítomnosť a kvantifikácia *R. solanacearum* v kontrolných vzorkách by sa mala najskôr potvrdiť pomocou testu IF.

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

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

Pre skúšky IF, FISH a PCR sa *R. solanacearum* musí identifikovať v najmenej 10^6 a 10^4 bunkách/ml pozitívnych kontrol a nesmie byť v žiadnej negatívnej kontrole.

Dodatok 4

Pufre pre testovacie postupy

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

1. **Pufre pre extrakčný postup**

1.1. Extrakčný pufor (50 mM fosforečnanový pufor, pH 7,0)

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

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

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

Dodatočné zložky môžu byť užitočné nasledujúcim spôsobom:

	Účel	Množstvo (na l)
Vločky Lubrol	Antivločkovací prípravok (*)	0,5 g
DC silicone antifoam (protipenový prípravok)	Protipenové činidlo (*)	1,0 ml
Tetrasodium pyrofosfát	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidone-40000 (PVP-40)	Viazanie inhibítorov PCR	50 g

(*) Na použitie pri homogenizačnej extrakčnej metóde

1.2. Peletový pufor (10 mM fosforečnanový pufor, pH 7,2)

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

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

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

2. **Pufre pre test IF**

2.1. Pufor IF (10 mM fosfátového pufrovaného roztoku (STP), pH 7,2)

Tento pufor sa používa na riedenie protilátok

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

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

2.2. IF-pufor-tvín

Tento pufor sa používa na umývanie podložných sklíčok.

Pridáme 0,1 % tvín 20 do pufra IF.

2.3. Glycerín pufrovaný fosfátom, pH 7,6

Tento pufor sa používa ako krycia kvapalina v jamkách podložných sklíčkach IF na podporu fluorescencie.

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

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

3. **Pufre pre nepriamy test ELISA**

3.1. Dvojnásobne silný krycí pufor, pH 9,6.

Na_2CO_3	6,36 g
$NaHCO_3$	11,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

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

Siričitan sodný (0,2 %) sa môže pridať ako antioxidant, ak je to potrebné na prevenciu vytvárania oxidovaných aromatických zložiek.

3.2. 10x roztok chloridu sodného pufrovaného fosfátom (PBS), pH 7,4

NaCL	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

3.3. PBS-tvín

10X PBS	100 ml
10 % tvín 20	5 ml
Destilovaná voda	895 ml

3.4. Blokovací (protilátkový) pufor (musí byť čerstvo pripravený).

10X PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % tvín 20	0,5 ml
Sušené mlieko	0,5 g
Destilovaná voda	doplníme do 100 ml

3.5. Substrátový roztok alkalickej fosfatázy, pH 9,8

Dietanolamín	97 ml
Destilovaná voda	800 ml

Zmiešajte a koncentrovanou HCl ustáľte na pH 9,8.

Doplňte destilovanou vodou na objem 1 litra.

Pridajte 0,2 g $MgCl_2$.

V každých 15 ml roztoku rozpustite dve tablety s hmotnosťou 5mg substrátovej fosfatázy (Sigma).

4. **Pufre pre test DASI ELISA**

4.1. Krycí pufor, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Destilovaná voda	1 000 ml

Rozpustite prísady a skontrolujte pH 9,6.

4.2. 10x fosfátový pufrovaný roztok (STP), pH 7,2 – 7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4.2\ H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	27,0 g
Destilovaná voda	1 000 ml

4.3. PBS-tvín

10X PBS	50 ml
10 % tvín 20	5 ml
Destilovaná voda	950 ml

4.4. Pufrový substrát, pH 9,8

Dietanolamín	100 ml
Destilovaná voda	900 ml

Zmiešajte a koncentrovanou HCl ustáľte na pH 9,8.

Dodatok 5

Určovanie stupňa kontaminácie pri testoch IF a FISH

1. Vypočítajte priemerný počet typických fluoreskujúcich buniek na zorné pole (c).

2. Vypočítajte počet typických fluoreskujúcich buniek v poli mikroskopického sklíčka (C).

   $C = c \times S/s$

   kde S = povrchová plocha poľa viacjamkového podložného sklíčka

   a s = plocha s poľa objektívu:

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

   K = tubusový koeficient (1 alebo 1,25)

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

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

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

   kde y = množstvo resuspendovaného peletu na každom poli

   a F = dilučný faktor resuspendovaného peletu

Dodatok 6

Validované PCR protokoly a reagenty

Poznámka: Predbežné testovanie by malo umožniť reprodukvateľné zistenie 10^3 až 10^4 buniek *R. solanacearum* na ml vzorkového extraktu.

Predbežné testovanie by rovnako nemalo ukázať žiadne nesprávne pozitívne výsledky pre panel vybraných bakteriálnych kmeňov (pozri dodatok 3).

1. **Protokol PCR podľa Seala a kol. (1993)**

1.1. Oligonukleotídne primery

Progresívny primer OLI-1 5′-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3′

Reverzný primer Y-2 5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′

Predpokladaná veľkosť amplikónu z matrice DNA *R. solanacearum* = 288 bp

1.2. PCR reakčná zmes

Reagent	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	17,65 µl	
10X PCR pufor (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
dNTP zmes (20mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Primer OLI-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq polymeráza (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Objem vzorky	2,0 µl	
Celkový objem	25 µl	

(1) Metóda bola validovaná pomocou Taq polymerázy od Perkin Elmer (AmpliTaq) a Gibco BRL.

1.3. Reakčné podmienky PCR

Spustite nasledujúci program:

1 cyklus:	i)	2 minúty pri teplote 96 °C (denaturácia matrice DNA),
35 cyklov:	ii)	20 minút pri teplote 94 °C (denaturácia matrice DNA),
	iii)	20 sekúnd pri teplote 68 °C (pripájanie primerov),
	iv)	30 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie),
1 cyklus:	v)	10 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie),
	vi)	držte pri teplote 4 °C.

Poznámka: Tento program bol optimalizovaný na použitie s teplotným cyklérom Perkin Elmer 9600. Zmena v trvaní krokov cyklov ii), iii) a iv) sa môže vyžadovať pri použití iných modelov.

1.4. Analýza enzýmovej reštrikcie amplikónu.

Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* tvoria charakteristickú reštrikciu dĺžky polymorfného fragmentu s enzýmom *Ava II* po inkubácii pri teplote 37 °C.

2. **Protokol PCR podľa Pastrika a Maissa (2000)**

2.1. Oligonukleotídne primery

Progresívny primer Ps-1 5′-agt cga acg gca gcg ggg g-3′

Reverzný primer Ps-2 5′-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3′

Predpokladaná veľkosť amplikónu z matrice DNA *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. Reakčná zmes PCR

Reagent	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	16,025 µl	
10X PCR pufor (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP zmes (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polymeráza (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Objem vzorky	5,0 µl	
Celkový objem:	25,0 µl	

(1) Metódy boli validované pomocou Taq polymerázy od Perkin Elmer (AmpliTaq) a Gibco BRL.
Poznámka: Pôvodne optimalizované pre teplotný cyklér MJ Research PTC 200 s Gibco Taq Polymerázou. Perkin Elmer AmpliTaq a pufor sa môžu rovnako používať pri rovnakých koncentráciách.

2.3. Reakčné podmienky PCR

Spustite nasledujúci program:

1 cyklus:	i)	5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
35 cyklov:	ii)	30 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
	iii)	30 sekúnd pri teplote 68 °C (pripájanie primerov),
	iv)	45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie),
1 cyklus:	v)	5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie),
	vi)	držte pri teplote 4 °C.

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

2.4. Analýza enzýmovej reštrikcie amplikónu.

Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* tvoria charakteristickú reštrikciu dĺžky polymorfného fragmentu s enzýmom *Taq* I po inkubácii pri teplote 65 °C počas 30 minút. Obmedzené fragmenty získané z *R. solanacearum*-špecifického fragmentu majú veľkosť 457 bp a 96 bp.

3. **Viacnásobný protokol PCR s internou kontrolou PCR (Pastrik a kol., 2002)**

3.1. Oligonukleotídne primery

Progresívny primer RS-1-F 5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′

Reverzný primer RS-1-R 5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′

Progresívny primer NS-5-F 5′-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3′

Reverzný primer NS-6-R 5′-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3′

Predpokladaná veľkosť amplikónu z matrice DNA *R. solanacearum* = 718 bp (RS-primer)

Predpokladaná veľkosť amplikónu z 18S rRNA internej kontroly PCR = 310 bp (NS-primer).

3.2. Reakčná zmes PCR

Reagent	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	12,625 µl	
10X PCR pufor (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP zmes (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) (2)	0,15 µl	0,06 µM
Taq polymeráza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Objem vzorky	5,0 µl	
Celkový objem	25,0 µl	

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

(2) Koncentrácie primerov NS-5-F a NS-6-R boli optimalizované pre extrakciu pupkových koncov zemiakových hľúz pomocou metódy homogenizácie a čistenia DNA podľa Pastrika (2000) (pozri kapitolu VI.A.6.1.a). Reoptimalizácia koncentrácií reagentov sa bude vyžadovať, ak sa použije extrakcia potrepaním alebo iné metódy izolácie DNA.

3.3. Reakčné podmienky PCR

Spustite nasledujúci program:

1 cyklus:	i)	5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
35 cyklov:	ii)	30 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
	iii)	30 sekúnd pri teplote 58 °C (pripájanie primerov),
	iv)	45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie),
1 cyklus:	v)	5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie),
	(vi)	držte pri teplote 4 °C.

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

3.4. Analýza enzýmovej reštrikcie amplikónu.

Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* tvoria charakteristickú reštrikciu dĺžky polymorfného fragmentu s enzýmom *Bsm* I alebo s izoschizomérom (napr. Mva 1269 I) po inkubácii pri teplote 65 °C počas 30 minút.

4. ***R. solanacearum* biovar – špecifický protokol PCR (Pastrik a kol., 2001)**

4.1. Oligonukleotídne primery

Progresívny primer Rs-1-F	5′-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3′
Reverzný primer Rs-1-R	5′-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3′
Reverzný primer Rs-3-R	5′-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3′

Predpokladaná veľkosť amplikónu z matrice DNA *R. solanacearum*:

s Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp

s Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2. Reakčná zmes PCR

a) Biovar 1/2 – špecifický PCR

Reagent	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	12,925 µl	
10X PCR Buffer (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-NTP zmes (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polymeráza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Objem vzorky	5,0 µl	
Celkový objem:	25,0 µl	

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

b) Biovar 3/4/5 – špecifický PCR

Reagent	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	14,925 µl	
10X PCR pufor (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (frakcia V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP zmes (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polymeráza (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Objem vzorky	5,0 µl	
Celkový objem:	25,0 µl	

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

4.3. Reakčné podmienky PCR

Spustite nasledujúci program pre biovar 1/2- a biovar 3/4/5-špecifické reakcie:

1 cyklus:	i)	5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
35 cyklov:	ii)	30 minút pri teplote 95 °C (denaturácia matrice DNA),
	iii)	30 sekúnd pri teplote 58 °C (pripájanie primerov),
	iv)	45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie),
1 cyklus:	v)	5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie),
	vi)	držte pri teplote 4 °C.

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

4.4. Analýza enzýmovej reštrikcie amplikónu.

Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* pomocou primerov Rs-1-F a Rs-1-R tvoria charakteristickú reštrikciu dĺžky polymorfného fragmentu s enzýmom *Bsm* I alebo izoschizomérom (napr. Mva 1269 I) po inkubácii pri teplote 65 °C počas 30 minút. Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* pomocou primerov Rs-1-F a Rs-3-R netvoria reštrikciu.

5. **Príprava nanášacieho pufra**

5.1. Bromfenolová modrá (10 % **zásobný roztok**)

Bromfenolová modrá	5 g
Destilovaná voda (bidest)	50 ml

5.2. Nanášací pufor

Glycerín (86 %)	3,5 ml
Bromfenolová modrá (5,1)	300 µl
Destilovaná voda (bidest)	6,2 ml

6. **10X Tris acetát EDTA (TAE) pufor, pH 8,0**

Tris pufor	48,40 g
Glaciálna kyselina octová	11,42 ml
EDTA (disodná soľ)	3,72 g
Destilovaná voda	1,00 l

Zriedime na 1X pred použitím.

Tiež komerčne dostupný (napr. invitrogén alebo ekvivalent).

Dodatok 7

Validované reagenty pre FISH test

1. **Oligopróby**

R. solanacearum – špecifická próbaOLI-1-CY3 5′- ggc agg tag caa gct acc ccc-3′

Nešpecifická eubakteriálna próba EUB-338-FITC 5′- gct gcc tcc cgt agg agt -3′

2. **Fixatívny roztok**

[UPOZORNENIE! FIXATÍVUM OBSAHUJE PARAFORMALDEHYD, KTORÝ JE TOXICKÝ. NASAĎTE SI RUKAVICE A NEVDYCHUJTE. ODPORÚČAME PRACOVAŤ V DIGESTORE.]

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

ii) Upravte pH na 7,0 pridaním 1 ml 0,1M fosforečnanového pufru (PB; pH 7,0) a 5 kvapiek 1N HCl. Skontrolujte pH pomocou indikačných pásikov a podľa potreby upravte pomocou HCl alebo NaOH. [*UPOZORNENIE! NEPOUŽÍVAJTE PH METER V ROZTOKOCH S PARAFORMALDEHYDOM.*]

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

3. **3X Hybmix**

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

Zrieďte na 1X ako sa vyžaduje.

4. **Hybridizačný roztok**

1X Hybmix	
Sódium dodecyl sulfát (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %,
próba EUB 338	5 ng/μl
próba OLI-1 alebo OLI-2	5 ng/μl

Pripravte množstvá hybridizačného roztoku na základe výpočtov v tabuľke 1. Pre každé podložné sklíčko (obsahujúce 2 rôzne vzorky dvojmo) treba 90 μl hybridizačného roztoku. *DÔLEŽITÉ: FORMAMID JE LEĽMI TOXICKÝ, PRETO SI NASAĎTE RUKAVICE A UROBTE VŠETKY POTREBNÉ PREVENTÍVNE OPATRENIA*!

Tabuľka. Navrhované množstvá na prípravu hybridizačnej zmesi.

Počet podložných sklíčiek:	1	4	6	8	10
Sterilné UPW	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Próba EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Probe OLI-1 alebo OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Celkový objem (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

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

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

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilovaná voda	1,00 l

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

Dodatok 8

Pestovanie baklažánu a rajčiaka

Semienka rajčiaka (*Lycopersicon esculentum*) alebo baklažánu (*Solanum melongena*) zasejte do pasterizovaného sadbového kompostu. Semenáče s plne vyvinutými klíčnymi listami (10 až 14 dní staré) presaďte do kvetináčov s pasterizovaným kompostom.

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

Dĺžka dňa	14 hodín alebo prirodzená dĺžka dňa, ak je väčšia,
Teplota	deň 21 až 24 °C, noc 14 až 18 °C,
Vnímavé odrody rajčiaka	‚Moneymaker'
Vnímavé odrody baklažánu	‚Black Beauty'
Dodávatelia	pozri internetovú stránku http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

BIBLIOGRAFIA

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172: 762-770.

2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. Official Journal of the European Communities L235, 1-39.

3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology 105; 373-380.

4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. Applied and Environmental Microbiology, 68, 3634-3638.

5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Molecular Plant-Microbe Interactions 1:113-121.

6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26; 663-678.

7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) Bacterial Wilt Newsletter 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27; 265-277.

9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 69; 269-280.

10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. J. Phytopathology 146; 379-384.

11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 343-351.

12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacaerum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44; 693-695.

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

15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.

16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al*., (eds). Klewer Academic Publishers. pp. 117-121.

17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60, 2286-2295.

18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85; 528-536.

19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F Wang, T.-H Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 5; 19-33.

20. Pastrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

21. Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. Food and Agricultural Immunology 7, 67-79.

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

24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syzygii, Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.

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

27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysiss of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum, Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.

28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigalet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.

29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative flourogenic 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.

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

PRÍLOHA III

1. Pri každom podozrení na výskyt, pri ktorom priniesli pozitívne výsledky skríningové testy vykonané, pre uvedený rastlinný materiál a pri všetkých ďalších prípadoch, podľa príslušných postupov uvedených v prílohe II a úradne schválenej metódy pred ukončením uvedenej metódy a na potvrdenie alebo vyvrátenie výskytu sa do dokončenia tejto metódy zadržia a zachovajú:

   — všetky hľuzy zemiakov a v prípade možnosti všetky testované rastliny,

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

   a

   — každá príslušná dokumentácia, až do ukončenia spomínaných metód.

   Zadržanie zemiakových hľúz umožní v potrebných prípadoch uskutočniť rôzne testy.

2. V prípade pozitívneho potvrdenia tohto organizmu by sa mali zadržať alebo primeraným spôsobom zachovať počas minimálne jeného mesiaca po oznámení postupu podľa článku 5 ods. 2:

   — materiály uvedené v odseku 1,

   — vzorka infikovaného materiálu z rajčiaka alebo baklažánu, ktorý bol naočkovaný extraktom z hľúz alebo extraktom rastlín, v potrebných prípadoch,

   a

   — izolovaná kultúra organizmu.

PRÍLOHA IV

Prvky vo vyšetrovaní uvedené v článku 5 ods. 1 písm. a) bodu i) budú podľa príslušných prípadov zahŕňať:

i) miesta produkcie,

— kde sa pestujú, alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, pri ktorých sa dokázalo napadnutie škodlivým organizmom,

— kde sa pestujú, alebo sa pestovali rajčiaky pochádzajúce z rovnakého zdroja ako rajčiaky, pri ktorých bolo dokázané napadnutie škodlivým organizmom,

— kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky, ktoré boli z dôvodu podozrenia na výskyt škodlivého organizmu podrobené úradnému dohľadu,

— kde sa pestujú alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, ktoré boli pestované na miestach produkcie, pri ktorých bolo zistené zamorenie škodlivým organizmom,

— kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky a miesta produkcie, ktoré ležia v susedstve zamorených miest produkcie vrátane tých, kde boli priamo alebo prostredníctvom spoločného zmluvného partnera zdieľané poľnohospodárske stroje alebo zariadenia,

— na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia škodlivým organizmom alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu škodlivým organizmom,

— na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov používaných aj miestami produkcie, pri ktorých bolo dokázané zamorenie škodlivým organizmom, alebo pri ktorých existuje podozrenie na zamorenie škodlivým organizmom,

— ktoré sú zaplavené alebo boli zaplavené povrchovými vodami, pri ktorých sa potvrdilo, že sú kontaminované škodlivým organizmom, alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu škodlivým organizmom

a

ii) povrchovú vodu používanú na zavlažovanie alebo postrek poľa/polí a miesta/miest produkcie, pri ktorých sa dokázalo zamorenie škodlivým organizmom, alebo ktorá tieto polia a miesta produkcie zaplavila.

PRÍLOHA V

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

— rastlinný materiál pestovaný na mieste produkcie, ktoré bolo v zmysle článku 5 ods.1 písm. a) bodu ii)označené za kontaminované,

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

— rastlinný materiál vypestovaný v miestach produkcie, ktoré sa uvádzajú v predchádzajúcej zarážke, alebo ktoré sa nachádzajú na takýchto miestach produkcie v období, keď sa v budovách alebo na mieste produkcie nachádzali hľuzy alebo rastliny uvedené v prvej zarážke označené v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) za kontaminované,

— priestory, v ktorých sa manipulovalo s uvedeným rastlinným materiálom z miest produkcie uvedených v predchádzajúcich zarážkach,

— všetky strojové zariadenia, vozidlá, lode, skladovacie priestory alebo ich časti a akékoľvek iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré mohli prísť do styku s uvedeným rastlinným materiálom, ktorý bol podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) označený za kontaminovaný,

— akýkoľvek rastlinný materiál, ktorý bol v styku so zariadeniami alebo objektmi uvedenými v predchádzajúcej zarážke, alebo v nich bol uskladnený pred ich dezinfekciou alebo vyčistením,

— v dôsledku vyšetrovania a testov podľa článku 5 ods.1 písm. a) bodu i) v prípade zemiakov, tie hľuzy alebo rastliny, ktoré majú súrodenecký alebo rodičovský klonový vzťah k uvedenému rastlinnému materiálu, ktorý bol podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) označený za kontaminovaný, a v prípade rajčiakov tie rastliny, ktoré pochádzajú z rovnakého osiva ako daný uvedený rastlinný materiál a pri ktorých sa i v prípade negatívneho výsledku skúmania prítomnosti patogénu na základe klonovej príbuznosti kontaminácia zdá byť pravdepodobnou; Testovanie odrôd sa môže uskutočniť, aby sa overila identita kontaminovaných a klonovo príbuzných hľúz alebo rastlín,

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

— miesto(-a) produkcie uvedeného rastlinného materiálu, na ktorom sa na zavlažovanie alebo postrek používala voda, ktorá bola podľa článku 5 ods. 1 písm. c) bodu ii) označená za kontaminovanú,

— uvedený rastlinný materiál vyprodukovaný na poliach, ktoré boli zaplavené povrchovou vodou, v ktorej sa dokázala kontaminácia.

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

i) v prípadoch podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu iv),

— blízkosť k iným miestam produkcie, na ktorých sa uvedený rastlinný materiál pestuje,

— bežná produkcia a použitie porastov sadivových zemiakov,

— miesta produkcie, na ktorých sa uvedený rastlinný materiál zavlažuje alebo postrekuje povrchovou vodou v prípadoch, keď existuje alebo existovalo nebezpečenstvo odplavenia povrchovej vody alebo zaplavenia povrchovou vodou z miest produkcie, ktoré boli podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) označené za kontaminované;

ii) v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú podľa článku 5 ods. 1 písm. c) bodu ii):

— miesto(-a) produkcie, kde sa uvedený rastlinný materiál pestuje v priľahlých oblastiach k povrchovej vode označenej za kontaminovanú, alebo ktoré môže byť touto povrchovou vodou zaplavené,

— každú samostatnú zavlažovaciu nádrž, ktorá je spojená s povrchovou vodou označenou za kontaminovanú.

— vodné útvary, ktoré sú spojené s povrchovou vodou označenou za kontaminovanú, so zreteľom na:

— smer a silu toku vody označenej za kontaminovanú,

— prítomnosť divo rastúcich hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovitých.

3. Oznámenie uvedené v prvom pododseku článku 5 ods. 2 musí byť podané takto:

— okamžite po potvrdení prítomnosti organizmu laboratórnymi testmi pomocou metód uvedených v prílohe II minimálne:

— pre zemiaky,

a) názov odrody danej partie,

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

— pre rastliny rajčiakov, názov odrody danej partie a v potrebnom prípade kategória,

— bez toho, aby boli dotknuté požiadavky pre oznámenie podozrenia na výskyt v článku 4 ods. 3, členský štát, v ktorom sa výskyt potvrdil, v prípade rizika kontaminácie uvedeného rastlinného materiálu pochádzajúceho z/alebo vyvezeného do iného členského štátu(-ov) okamžite oznámi príslušnému členskému štátu(-om) informácie potrebné na dodržanie článku 5 ods. 3, ako napr.:

a) názov odrody danej partie zemiakov alebo rajčiakov;

b) názov a adresa odosielateľa a príjemcu;

c) dátum doručenia partie zemiakov alebo rajčiakov;

d) objem doručenej partie zemiakov alebo rajčiakov;

e) kópiu pasu rastlinného materiálu alebo v potrebnom prípade minimálne číslo pasu rastlinného materiálu alebo v potrebnom prípade registračné číslo pestovateľa alebo obchodujúceho a kópiu oznámenia o doručení.

Komisia bude informovaná ihneď po tom, ako budú tieto informácie poskytnuté.

4. Podrobné údaje dodatočného oznámenia uvedeného v druhom pododseku článku 5 ods. 2 budú obsahovať:

Po ukončení všetkých vyšetrovaní, pre každý prípad:

a) dátum, kedy sa kontaminácia potvrdila;

b) stručný popis vyšetrovania, ktoré prebehlo s cieľom určiť zdroj a možné rozšírenie kontaminácie vrátane stupňa uskutočneného odberu vzorky;

c) informácie o zistených alebo predpokladaných zdrojoch kontaminácie;

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

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

f) podrobné informácie o označení vody, vrátane názvu a lokality vodného útvaru a rozsahu označenia/zákazu zavlažovania;

g) pre každú zásielku alebo partiu rajčiakov označenú za kontaminovanú osvedčenia podľa článku 13 ods.1 bodu ii) smernice 2000/29/ES a číslo pasu rastlinného materiálu v súlade so zoznamom uvedeným v prílohe V časti A oddiele 1.2.2 k smernici 2000/29/ES;

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

PRÍLOHA VI

1. Ustanovenia, ktoré sa uvádzajú v článku 6. ods. 1, budú tieto:

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

alebo

— zneškodnenie materiálu na úradne schválených skládkach odpadu, pri ktorých neexistuje identifikovateľné riziko úniku organizmu do okolia priesakom na poľnohospodársky využívané plochy alebo do vodných zdrojov, ktoré sa využívajú na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy,

alebo

— spálenie,

alebo

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

alebo

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

Akýkoľvek zostávajúci odpad, ktorý vznikol na základe jedného z vyššie uvedených variantov, sa zneškodní úradne schválenými metódami v súlade s prílohou VII k tejto smernici.

2. Za vhodné využitie alebo zneškodnenie uvedeného rastlinného materiálu podľa článku 6 ods. 2 pod dohľadom zodpovedných orgánov príslušných členských štátov pri vzájomnom informovaní zodpovedných orgánov s cieľom zabezpečiť takýto dohľad v ktoromkoľvek okamihu a so súhlasom zodpovedného orgánu členského štátu, v ktorom sa zemiaky majú baliť alebo spracovávať v zariadeniach na zneškodňovanie odpadu uvedených v prvej a druhej zarážke, sa považuje:

i) v prípade zemiakových hľúz:

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

alebo

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

alebo

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

ii) v prípade iných častí rastlín vrátane stoniek a listového odpadu,

— zničenie,

alebo

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

3. Medzi vhodné metódy dekontaminácie objektov uvedených v článku 6 ods. 3 patrí čistenie, a ak je to vhodné dezinfekcia, pri ktorých neexistuje rozpoznateľné riziko šírenia organizmu a používajú sa pod dohľadom zodpovedných úradných orgánov členských štátov.

4. Do radu opatrení, ktoré členské štáty v rámci bezpečnostného pásma/pásiem vyznačeného v zmysle článku 5 ods. 1 písm. a) bodu iv) a článku 5 ods. 1 písm. c) bodu iii), a ktoré sa uvádza v článku 6 ods. 4, sa zahrnie:

4.1. V prípadoch, keď miesta produkcie boli označené za kontaminované podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii):

a) na poli alebo v jednotke chránenej rastlinnej produkcie, ktorá bola podľa článku 5 ods. 1 písm. a)bodu ii) označená za kontaminovanú, buď

i) minimálne počas štyroch rokov nasledujúcich po roku označenia kontaminácie:

— opatrenia na elimináciu samovýsadby/samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných hostiteľských rastlín škodlivého organizmu vrátane burinného spoločenstva patriaceho do čeľade ľuľkovitých,

a

— vynechanie výsadby/výsevu:

— hľúz zemiakov alebo rastlín zemiakov alebo pravého osiva,

— rastlín rajčiakov a osiva rajčiaka,

— prihliadajúc na biológiu organizmu,

— iných hostiteľských rastlín organizmu,

— rastlinných druhov z rodu Brassica, pri ktorých preukázateľne existuje riziko prežívania škodlivého organizmu,

— plodín, pri ktorých preukázateľne existuje riziko šírenia škodlivého organizmu,

— v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po období uvedenom v predchádzajúcej zarážke a za podmienky, že pole bolo minimálne počas dvoch pestovateľských rokov pred rokom vysadenia bez rastlín zemiakov alebo rajčiakov vyrastených zo samovýsadby/samovýsevu, ako i bez iných hostiteľských rastlín vrátane burinného spoločenstva patriaceho do čeľade ľuľkovitých,

— v prípade zemiakov sa povoľuje len produkcia konzumných zemiakov,

— v prípade zemiakov a rajčiakov, zozbierané zemiakové hľuzy alebo rastliny rajčiaka, podľa potreby, sa budú testovať podľa postupov podrobne popísaných v prílohe II,

— vo vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po vegetačnom období uvedenom v predchádzajúcej zarážke a pri dodržaní vhodného osevného postupu, ktoré trvá najmenej dva roky ak sa majú pestovať sadivové zemiaky, sa vykoná úradný prieskum podľa podrobných ustanovení v článku 2 ods. 1,

alebo

ii) počas piatich pestovateľských rokov nasledujúcich po roku označenia pozemkov za kontaminované:

— opatrenia na potláčanie samovýsadby/samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných prirodzene zistených hostiteľských rastlín škodlivého organizmu vrátane burinného spoločenstva patriaceho do čeľade ľuľkovitých,

a

— počas prvých troch rokov tohto obdobia čierny úhor alebo pestovanie obilnín podľa zisteného rizika alebo trvalá pastvina s častým kosením alebo intenzívnym spásaním alebo pestovanie tráv s cieľom získania semennej produkcie, po ktorých nasledujú dva roky pestovania nehostiteľských rastlín, ktoré preukázateľne nepredstavujú žiadne riziko prežitia alebo šírenia škodlivého organizmu,

— v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po období uvedenom v predchádzajúcej zarážke a pod podmienkou, že pole bolo minimálne počas dvoch pestovateľských po sebe nasledujúcich rokov pred rokom vysadenia bez rastlín zemiakov alebo rajčiakov vyrastených zo samovýsadby/samovýsevu, ako i bez iných hostiteľských rastlín, vrátane burinného spoločenstva patriaceho do čeľade ľuľkovitých,

— v prípade zemiakov sa povoľuje pestovanie sadivových alebo konzumných zemiakov,

— zozbierané zemiakové hľuzy alebo rastliny rajčiaka, podľa potreby, sa budú testovať podľa postupov podrobne popísaných v prílohe II;

b) na všetkých ďalších poliach s kontaminovaným miestom produkcie- pod podmienkou, že zodpovedné úradné orgány súhlasia s tým, že riziko samovysadených rastlín zemiaka a rastlín rajčiaka a ďalších prirodzene sa vyskytujúcich hostiteľských rastlín tohto organizmu, vrátane burinného spoločenstva patriaceho do čeľade ľuľkovitých, podľa potreby, bolo eliminované:

— v roku pestovania po roku označenia kontaminácie,

— žiadne zemiakové hľuzy alebo pravé semená zemiaka alebo iné hostiteľské rastliny daného organizmu sa nezasadania,

alebo

— v prípade zemiakových hľúz, certifikované sadivové zemiaky sa môžu sadiť len pre konzumnú spotrebu,

— v prípade rastlín rajčiakov sa rastliny rajčiakov pestované z osiva, ktoré spĺňa požiadavky smernice 2000/29/ES, môžu sadiť v rámci ovocinárskej produkcie,

— v druhom pestovateľskom roku, ktorý nasleduje po roku, kedy bola označená kontaminácia:

— v prípade zemiakov, len úradne potvrdené sadivové zemiaky alebo sadivové zemiaky, ktoré boli úradne testované na neprítomnosť hnedej hniloby a pestované pod úradnou kontrolou na miestach produkcie iných ako tie, ktoré sa uvádzajú v bode 4.1 sa budú sadiť buď pre produkciu sadivových alebo konzumných zemiakov,

— v prípade rajčiakov sa pestujú len rastliny rajčiakov z osiva, ktoré spĺňa požiadavky smernice 2000/29/ES alebo v prípade vegetatívneho množenia z rastlín rajčiakov takého osiva a pestujú sa pod úradnou kontrolou na miestach produkcie inej ako je uvedené v bode 4.1 v rámci rastlinnej alebo ovocinárskej produkcie,

— minimálne v treťom pestovateľskom roku po roku označenia kontaminácie,

— v prípade zemiakov, vysádzať výlučne úradne certifikované sadivo zemiakov alebo sadivo, ktoré bolo vypestované pod úradným dohľadom z úradne certifikovaného sadiva zemiakov, a to s cieľom produkcie sadivových zemiakov alebo konzumných zemiakov,

— v prípade rajčiakov len rastliny rajčiakov pestované z osiva, ktoré spĺňa požiadavky smernice 2000/29/ES alebo rastliny rajčiakov pestované pod úradnou kontrolou z takýchto rastlín sa môžu sadiť v rámci rastlinnej alebo ovocinárskej produkcie,

— v každom pestovateľskom roku, ktorý sa uvádza v predchádzajúcich zarážkach, sa prijímajú opatrenia na elimináciu rastlín zemiakov vyrastených zo samovýsadby/samovýsevu a iných prirodzene zistených hostujúcich rastlín organizmu v prípade jeho prítomnosti a uskutoční sa úradná inšpekcia pestovanej úrody vo vhodných obdobiach a na každom zemiakovom poli sa zozbierané zemiaky úradne otestujú podľa postupov podrobne popísaných v prílohe II;

c) ihneď po označení kontaminácie podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) a po prvom nasledujúcom pestovateľskom roku:

— riadne vyčistenie a dezinfekcia, podľa potreby, všetkých strojov a skladovacích zariadení nachádzajúcich sa na mieste produkcie, ktoré sa používajú pri produkcii zemiakov alebo rajčiakov, podľa príslušných metód podrobne popísaných v bode 3,

— úradné kontroly zavlažovacích a postrekových programov vrátane, podľa potreby, vyhlásenia zákazu zavlažovania a postrekov s cieľom zabrániť šíreniu škodlivého organizmu;

d) v jednotke chránenej rastlinnej produkcie, ktorá bola podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu ii) označená za kontaminovanú a pri ktorej je možná úplná výmena pestovateľského substrátu:

— vynechanie výsadby zemiakových hľúz alebo rastlín zemiakov alebo pravého osiva alebo iných hostiteľských rastlín škodlivého organizmu vrátane rastlín rajčiakov a výsevu semien rajčiakov dovtedy, pokiaľ sa príslušná prevádzková jednotka pod úradným dozorom nepodrobí opatreniam na zničenie škodlivého organizmu a na odstránenie všetkého materiálu hostiteľských rastlín vrátane minimálne jednej úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a, podľa potreby, dezinfekcie uvedenej jednotky a všetkých zariadení a pokiaľ nebude potom zodpovednými orgánmi udelený súhlas na pestovanie rajčiakov a zemiakov,

a

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

— produkcia rajčiakov sa uskutočňuje z osiva, ktoré spĺňa požiadavky smernice 2000/29/ES alebo, v prípade vegetatívneho množenia, z rastlín rajčiakov takéhoto osiva a pestuje sa pod úradnou kontrolou,

— úradné kontroly zavlažovacích a postrekových programov, vrátane, podľa potreby, vyhlásenia zákazu zavlažovania a postrekov s cieľom zabrániť šíreniu škodlivého organizmu;

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

a) ihneď po označení kontaminácie zabezpečiť primerané vyčistenie a dezinfekciu, všetkých prístrojov a skladovacích zariadení v týchto priestoroch, ktoré sa používajú v súvislosti s produkciou rajčiakov alebo zemiakov, pričom sa použijú príslušné metódy, ako sa uvádza v bode 3,

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

ba) v prípadoch, kedy bolo bezpečnostné pásmo vymedzené podľa článku 5 ods. 1 písm. a) bodu iv):

— zabezpečiť zo strany zodpovedných úradných orgánov dozor nad podnikmi, ktoré pestujú zemiaky a skladujú zemiakové hľuzy alebo rajčiaky a ktoré manipulujú s nimi, ako aj podnikmi, ktoré poskytujú zemiakársku alebo rajčiakovú mechanizáciu dodávateľským spôsobom,

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

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

— požadovať pestovanie len rajčiakových rastlín pestovaných z osiva, ktoré spĺňa požiadavky smernice 2000/29/ES, alebo v prípade vegetatívneho množenia z rastlín rajčiakov z takého osiva a pestovanie pod úradnou kontrolou, čo platí pre všetku úrodu v rámci tejto zóny,

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

bb) v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú podľa článku 5 ods. 1 písm. c) bodu ii) alebo keď sa na povrchovú vodu prihliada pri stanovení možného šírenia škodlivého organizmu podľa bodu 2 prílohy V:

— uskutočniť každoročný prieskum vo vhodnom čase vrátane odobratia vzoriek povrchovej vody a v potrebných prípadoch hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovitých v príslušných vodných zdrojoch a testovanie v súlade s príslušnými metódami uvedenými v prílohe II pre uvedený rastlinný materiál a pre ďalšie prípady,

— zaviesť úradné kontroly programov zavlažovania a postrekovania vrátane vyhlásenia zákazu zavlažovania a postrekovania uvedeného rastlinného materiálu a podľa potreby iných hostiteľských rastlín vodou označenou za kontaminovanú s cieľom zabrániť šíreniu škodlivého organizmu. Tento zákaz sa môže preskúmať na základe výsledkov dosiahnutých pri uvedenom ročnom prieskume a označenia sa môžu zrušiť, keď zodpovedné úradné orgány súhlasia s tým, že povrchová voda už nie je kontaminovaná. Používanie vody, ktorá podlieha zákazu, sa môže povoliť na základe úradnej kontroly na zavlažovanie a postrekovanie hostiteľských rastlín, keď sa použijú úradne schválené techniky, ktoré zaručia elimináciu organizmu a prevenciu jeho šírenia,

— v prípadoch kontaminácie odpadových vôd zaviesť úradné kontroly zneškodňovania pevného alebo tekutého odpadu z prevádzkových priestorov podnikov priemyselného spracovania alebo balenia, ktoré manipulujú s uvedeným rastlinným materiálom;

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

PRÍLOHA VII

Úradne schválené metódy zneškodnenia odpadu uvedené v prílohe VI odsek 1 sú v súlade s týmito ustanoveniami a tak sa odstraňuje každé identifikovateľné riziko šírenia organizmu:

i) Odpad zo zemiakov a rajčiakov (vrátane zamietnutých zemiakov, šúp a rajčiakov) a akéhokoľvek pevného odpadu súvisiaceho so zemiakmi a rajčiakmi (vrátane pôdy, kameňov a sutiny) sa zneškodní buď:

— zneškodnením na úradne schválenej skládke odpadu, na ktorej nie je identifikovateľné riziko úniku organizmu do okolia, napr. priesakom do poľnohospodársky využívanej plochy alebo kontaktu s vodnými zdrojmi, ktoré by sa mohli využívať na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy. Odpad sa prepraví priamo na skládku za dodržania kontrolných podmienok, čím sa zabezpečí, že nedôjde k strate odpadu,

alebo

— spálením,

alebo

— na základe iných opatrení za predpokladu dôkazu o tom, že neexistuje identifikovateľné riziko šírenia organizmu; tieto opatrenia sa oznámia Komisii a členským štátom.

ii) Tekutý odpad: pred zneškodnením podlieha tekutý odpad s obsahom nerozpustných tuhých látok filtrácii alebo procesu usádzania s cieľom odstrániť tieto tuhé látky. Tieto tuhé látky sa zneškodňujú tak, ako je uvedené v bode i).

Tekutý odpad sa buď:

— zahreje v celom objeme na minimálne 60 °C v priebehu 30 minút pred zneškodnením,

alebo

— inak zneškodní na základe úradného schválenia a pod úradnou kontrolou tak, že neexistuje identifikovateľné riziko, že by odpad mohol prísť do kontaktu s poľnohospodársky využívanými plochami alebo vodnými zdrojmi, ktoré by sa mohli využívať na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy. Podrobnosti o tomto spôsobe sa oznámia ostatným členským štátom a Komisii.

Varianty uvedené v tejto prílohe sa taktiež uplatňujú na odpad súvisiaci s manipuláciou a spracovaním kontaminovaných partií.“