ZBIERKA ZÁKONOV
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

Ročník 2007

Vyhlásené: 22.03.2007 Vyhlásená verzia v Zbierke zákonov Slovenskej republiky

Obsah tohto dokumentu má informatívny charakter.

119

NARIADENIE VLÁDY

Slovenskej republiky

z 21. februára 2007,

ktorým sa mení nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 66/2004 Z. z., ktorým sa ustanovujú opatrenia na ochranu proti zavlečeniu hnedej hniloby zemiaka

Vláda Slovenskej republiky podľa § 2 ods. 1 písm. k) zákona č. 19/2002 Z. z., ktorým sa ustanovujú podmienky vydávania aproximačných nariadení vlády Slovenskej republiky v znení zákona č. 207/2002 Z. z. nariaďuje:

Čl. I

Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 66/2004 Z. z., ktorým sa ustanovujú opatrenia na ochranu proti zavlečeniu hnedej hniloby zemiaka sa mení takto:

1. V § 6 ods. 1 písm. c) sa vypúšťa prvý až piaty bod.
2. V § 6 ods. 1 písm. d) sa slová „bodu 1“ nahrádzajú slovami „bodu 2“.
3. V § 6 ods. 1 písm. e) sa slová „bode 2“ nahrádzajú slovami „bode 3“.
4. V § 6 ods. 1 písm. f) sa slová „bode 3“ nahrádzajú slovami „bode 4“.
5. § 11 znie:

„§ 11

Týmto nariadením vlády sa preberajú právne akty Európskych spoločenstiev uvedené v prílohe č. 6.“.

6. Prílohy č. 2 až 6 znejú:

„Príloha č. 2 k nariadeniu vlády č. 66 /2004 Z. z.

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

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

ROZSAH TESTOVACEJ SCHÉMY

V tejto schéme sa popisujú rozličné postupy používané pri

a) diagnostike hnedej hniloby v hľuzách zemiakov a baktériového vädnutia rastlín zemiakov, rajčiakov a niektorých iných hostiteľských rastlín,
b) určovaní prítomnosti *Ralstonia solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov, v hostiteľských rastlinách zemiakov, rajčiakov a iných vo vode a pôde,
c) identifikácii *Ralstonia solanacearum*.

ZÁKLADNÉ PRINCÍPY

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

V protokoloch ide o zisťovanie karanténnych organizmov a zahŕňajú použitie živých kultúr *Ralstonia solanacearum* ako kontrolných materiálov, preto postupy bude potrebné uskutočňovať vo vhodných karanténnych podmienkach s primeranými zariadeniami na likvidáciu odpadov v súlade s príslušným povolením vydaným príslušným úradom pre karanténu rastlín.

Parametre testovania musia zabezpečiť konzistentne a reprodukovateľne odhalenie stupňov výskytu *Ralstonia 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

kontaminácii 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 ak ide o označovanie a dokumentáciu.

Podozrenie na výskyt podľa § 3 ods. 2 znamená pozitívny výsledok pri diagnostických alebo skríningových testoch uskutočnených na vzorke, ako sa určuje v ďalej uvedených vývojových diagramoch. Pozitívny prvý skríningový test, ktorým je imunofluorescenčný (IF) test, polymerázová reťazová reakcia (PCR), fluorescenčná hybridizácia in situ (FISH) a selektívna izolácia, sa musí potvrdiť druhým skríningovým testom založeným na inom biologickom princípe.

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

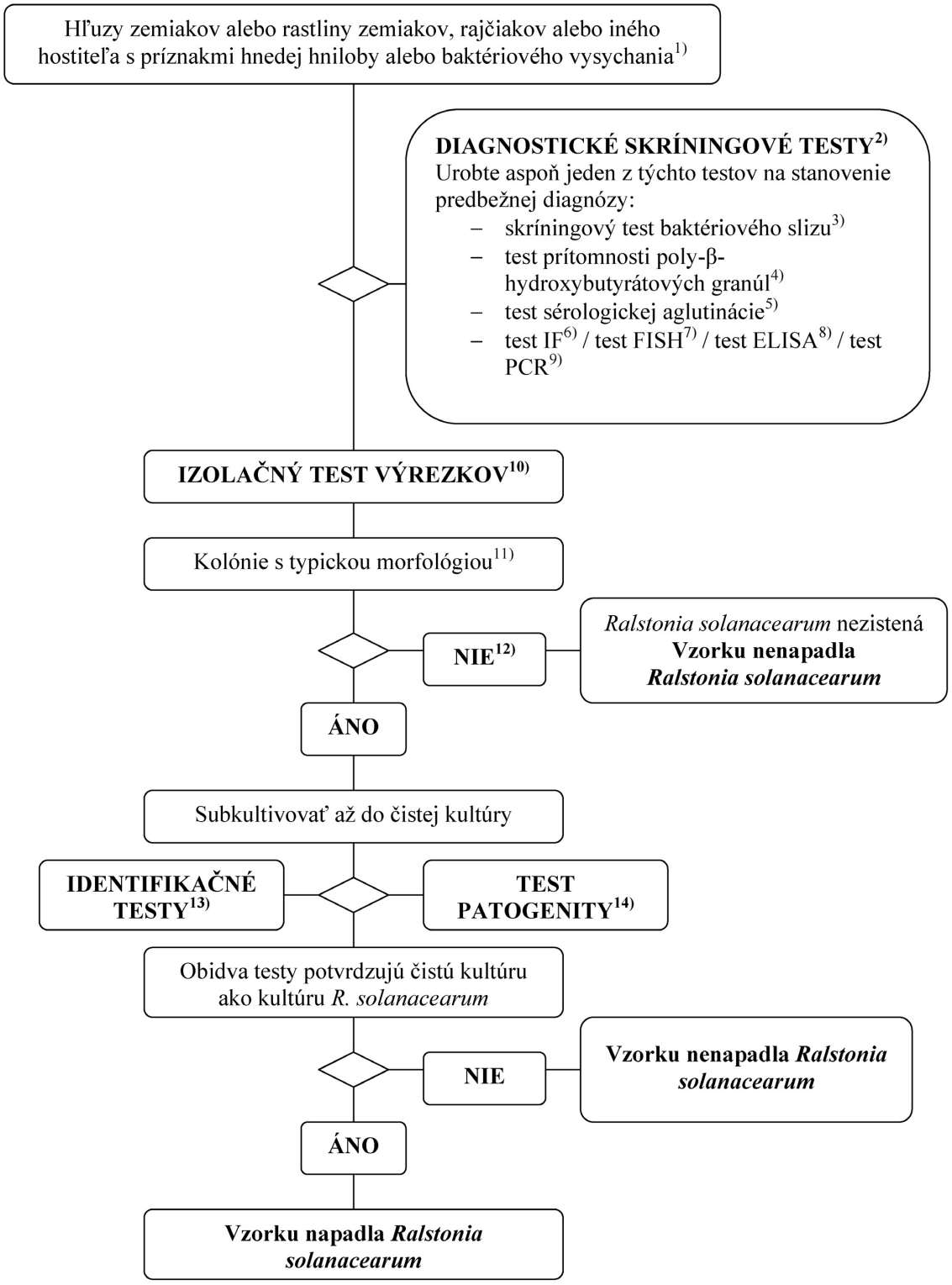
Potvrdená prítomnosť podľa § 5 ods. 1 znamená izoláciu a identifikáciu čistej kultúry *Ralstonia solanacearum* s potvrdenou patogenitou.

ČASŤ A

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

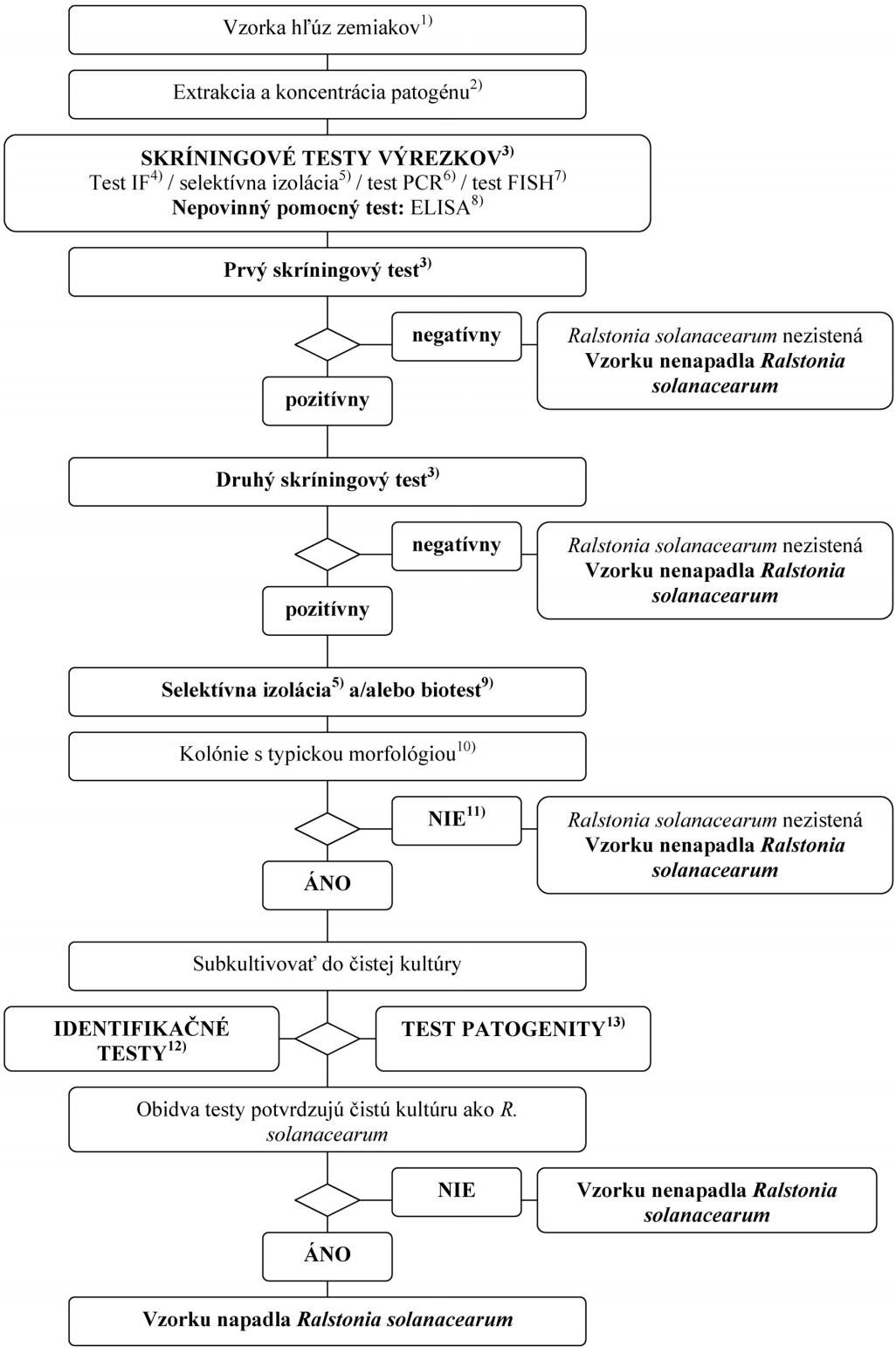
Testovanie je určené pre hľuzy zemiakov a rastliny s typickými príznakmi hnedej hniloby alebo cievneho vädnutia alebo s podozrením na ne. Zahŕňa skríningový test, izoláciu patogénu z infikovaného cievneho pletiva na (selektívnom) médiu a pri pozitívnom výsledku identifikáciu kultúry ako *Ralstonia solanacearum*.


Hľuzy zemiakov alebo rastliny 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)]
Ralstonia solanacearum nezistená
Vzorku nenapadla *Ralstonia 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 *Ralstonia solanacearum*
ÁNO
Vzorku napadla *Ralstonia solanacearum*

[1)] Popis príznakov je uvedený v časti B bode 1.
[2)] Skríningové testy uľahčujú určenie predbežnej diagnostiky, ale nie sú rozhodujúce. Negatívny výsledok vždy nezaručuje neprítomnosť patogénu.
[3)] Skríningový test baktériového slizu z cievnych zväzkov stonky je uvedený v časti F bode A.1.
[4)] Test prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu v bunkách baktérií je uvedený v časti F bode A.2.
[5)] Testy sérologickej aglutinácie na baktériovom slize alebo na pletivovom extrakte s príznakmi sa popisujú v časti F bode A.3.
[6)] Test IF na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte je uvedený v časti F bode A.5.
[7)] Test FISH na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte je uvedený v časti F bode A.7.
[8)] Test ELISA na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte je uvedený v časti F bode A.8.
[9)] Test PCR na baktériovom slize rozptýlenom vo vode alebo na pletivovom extrakte je uvedený v časti F bode A.6.
[10)] Patogén sa zvyčajne dá ľahko izolovať z rastlinného materiálu s príznakmi riedeným platňovým rozterom (časť B bod 3).
[11)] Kolónia s typickou morfológiou je uvedená v časti B bode 3.d).
[12)] Kultivácia môže byť neúspešná pre pokročilé štádiá infekcie spôsobené 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 časti F bode B. Subšpecifická charakteristika nie je povinná, ale odporúča sa pri každom novom prípade.
[14)] Test patogenity je popísaný v časti F bode C.

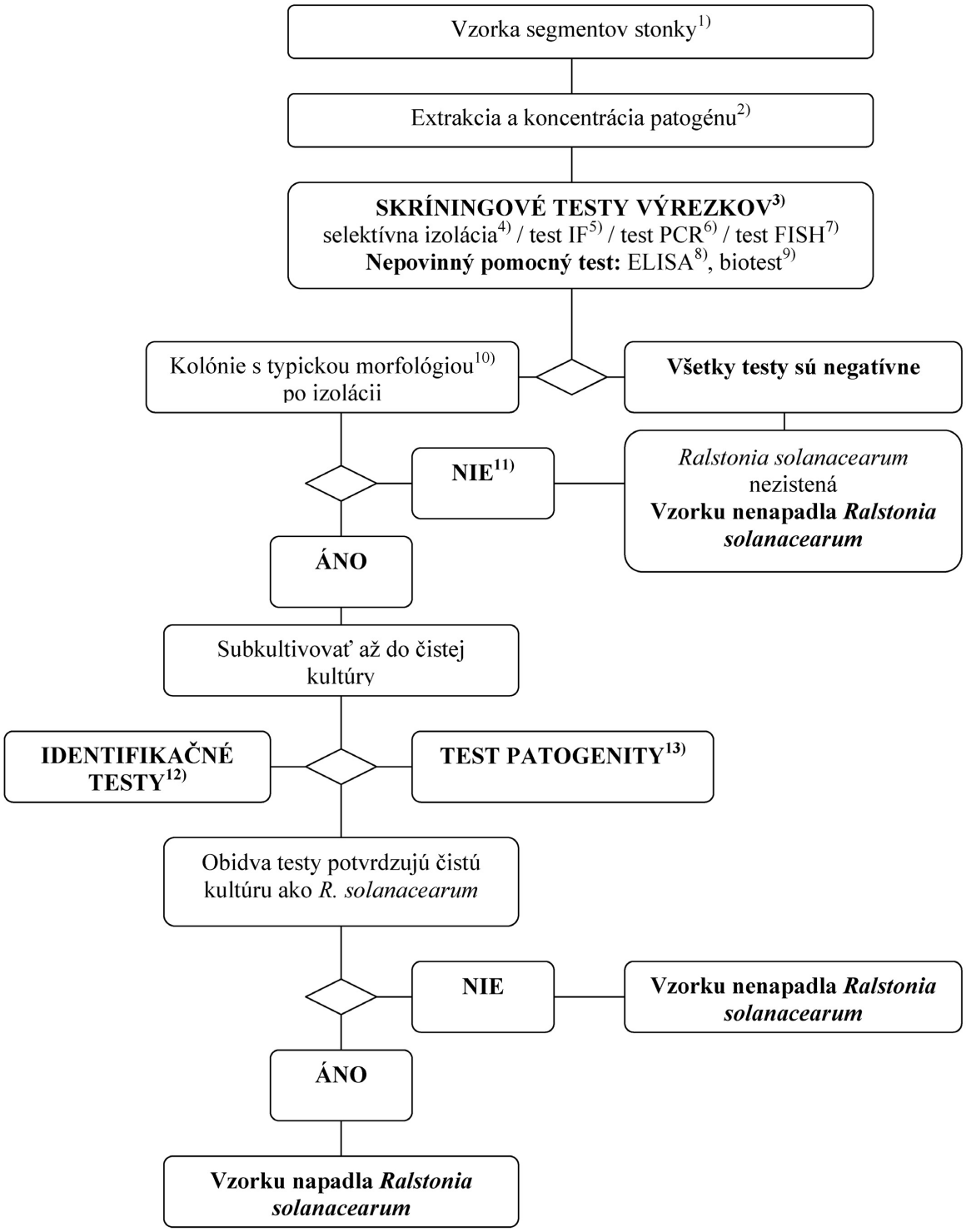
2. Schéma určovania prítomnosti a identifikácie *Ralstonia solanacearum* vo vzorkách hľúz zemiakov bez príznakov

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; pri izolácii 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 koncentráciou 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
Ralstonia solanacearum nezistená
Vzorku nenapadla *Ralstonia solanacearum*
pozitívny
Druhý skríningový test[3)]
negatívny
Ralstonia solanacearum nezistená
Vzorku nenapadla *Ralstonia solanacearum*
pozitívny
Selektívna izolácia[5)] a/alebo biotest[9)]
Kolónie s typickou morfológiou[10)]
NIE[11)]
Ralstonia solanacearum nezistená
Vzorku nenapadla *Ralstonia solanacearum*
ÁNO
Subkultivovať do čistej kultúry
IDENTIFIKAČNÉ TESTY[12)]
TEST PATOGENITY[13)]
Obidva testy potvrdzujú čistú kultúru ako *R. solanacearum*
NIE
Vzorku nenapadla *Ralstonia solanacearum*
ÁNO
Vzorku napadla *Ralstonia solanacearum*

[1)] Štandardná veľkosť vzorky je 200 hľúz, hoci sa tento postup môže použiť aj pri menších vzorkách, ak nie je k dispozícii 200 hľúz.
[2)] Metódy extrakcie a koncentrácie patogénu sa popisujú v časti C bode 1.1.
[3)] Ak sú aspoň dva testy založené na rôznych biologických princípoch pozitívne, musí sa urobiť izolácia a potvrdenie. Urobí sa aspoň jeden skríningový test. Ak je tento test negatívny, považuje sa vzorka za negatívnu. Ak je tento test pozitívny, na overenie prvého pozitívneho výsledku sa vyžaduje druhý test alebo viacero skríningových testov založených na rôznych biologických princípoch. Ak druhý test alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.
[4)] Test IF je uvedený v časti F bode A.5.
[5)] Test selektívnou izoláciou je uvedený v časti F bode A.4.
[6)] Testy PCR sa popisujú v časti F bode A.6.
[7)] Testy FISH sa popisujú v časti F bode A.7.
[8)] Testy ELISA sa popisujú v časti F bode A.8.
[9)] Biotest je uvedený v časti F bode A.9.
[10)] Typická morfológia kolónie je uvedená v časti B bode 3.d).
[11)] Kultivácia alebo biotesty môžu byť neúspešné pre konkurenciu alebo inhibíciu spôsobenú saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch dosiahnu jasne pozitívne výsledky, ale testy izoláciou sú negatívne, zopakujú sa testy izoláciou z toho istého peletu alebo odoberie sa ďalšie cievne pletivo pri rezanom pupkovom konci hľuzy tej istej vzorky, a ak je potrebné, testujú sa ďalšie vzorky.
[12)] Spoľahlivá identifikácia čistých kultúr pravdepodobne podozrivých na prítomnosť baktérie *Ralstonia solanacearum* sa dosiahne pomocou testov, ktoré sa popisujú v časti F bode B.
[13)] Test patogenity je uvedený v časti F bode 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 časti C bode 2.1.
[2)] Metódy extrakcie a koncentrácie patogénu sa popisujú v časti C bode 2.1.
[3)] Ak sú najmenej dva testy založené na rôznych biologických princípoch pozitívne, musí sa urobiť izolácia a potvrdenie. Urobí sa najmenej jeden skríningový test. Ak je tento test negatívny, považuje sa vzorka za negatívnu. Ak je tento test pozitívny, na overenie prvého pozitívneho výsledku sa vyžaduje druhý test alebo ďalšie skríningové testy založené na rôznych biologických princípoch. Ak druhý test alebo ďalšie testy sú negatívne, vzorka sa považuje za negatívnu. Ďalšie testy nie sú potrebné.
[4)] Test selektívnou izoláciou je uvedený v časti F bode A.4.
[5)] Test IF je uvedený v časti F bode A.5.
[6)] Testy PCR sa popisujú v časti F bode A.6.
[7)] Testy FISH sa popisujú v časti F bode A.7.
[8)] Testy ELISA sa popisujú v časti F bode A.8.
[9)] Biotest je uvedený v časti F bode A.9.
[10)] Typická morfológia kolónie je uvedená v časti B bode 3.d).
[11)] Kultivácia alebo biotesty môžu byť neúspešné pre konkurenciu alebo inhibíciu spôsobenú saprofytickými baktériami. Ak sa v skríningových testoch dosiahnu jasne pozitívne výsledky, ale izolačné testy sú negatívne, izolačné testy sa opakujú.
[12)] Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *Ralstonia solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v časti F bode B.
[13)] Test patogenity je uvedený v časti F bode C.

ČASŤ B

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

1. Príznaky

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 sekrét. Ak sa odrezaná stonka umiestni zvislo do vody, z cievnych zväzkov vytekajú vlákna slizu.
Hľuza zemiaka. Hľuzy zemiaka sa musia rozrezať priečne blízko pupkového (stolonového) konca alebo pozdĺžne cez stolonový koniec. Rané štádium infekcie sa prejavuje sklovitožltým 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 červenkastohnedé, 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 patogén (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 vylučujú sfarbené hnedé cievne zväzky biely alebo žltkastý baktériový sliz.

1.3. Príznaky na iných hostiteľoch
Rastliny Solanum dulcamara a Solanum nigrum. V normálnych podmienkach, ak teploty pôdy neprekročia 25 °C alebo ak úroveň inokula nie je extrémne vysoká (napr. pri *Solanum nigrum*, ktoré rastie vedľa infikovaných rastlín zemiaka alebo rajčiaka), sa príznaky vädnutia pri týchto hostiteľských burinách vyskytujú zriedka. Ak sa vädnutie vyskytne, príznaky sú rovnaké, ako sa popisujú pri rajčiaku. Nezvädnuté rastliny *Solanum 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

zvislo do vody, aj pri absencii príznakov vädnutia sa z povrchu rezu cievnych zväzkov vylučuje baktériový sliz alebo vlákna slizu.

2. Testy vytekania baktériového slizu zo stonky

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

2.1. Test vytekania baktériového slizu zo stonky
Rovnako ako časť F bod A.1.

2.2. Určovanie prítomnosti granúl poly-β-hydroxybutyrátu (PHB)
Charakteristické granuly PHB v bunkách *Ralstonia solanacearum* sa zviditeľňujú sfarbením teplom fixovaného rozteru baktériového slizu z infikovaného pletiva na podložnom mikroskopickom sklíčku prostredníctvom nílskej modrej A alebo sudánskej čiernej (časť F bod A.2.).

2.3. Testy sérologickej aglutinácie
Rovnako ako časť F bod A.3.

2.4. Iné testy

K ďalším vhodným skríningovým testom patria test IF (časť F bod A.5.), test FISH (časť F bod A.7.), testy enzýmová imunoadsorbentová analýza (ďalej len „ELISA“) (časť F bod A.8.) a testy PCR (časť F bod A.6.).

3. Postup izolácie

a) Odstráni sa 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 fosfátového tlmivého roztoku (dodatok 4) a nechá sa 5 až 10 minút odstáť.
b) Zo suspenzie sa pripraví viacero desatinných riedení.
c) Objem 50 až 100 µl suspenzie a jednotlivých riedení sa naočkuje na univerzálnu živnú pôdu (NA, YPGA alebo SPA; dodatok 2) a/alebo na Kelmanovo tetrazoliové médium (dodatok 2) a/alebo na validované selektívne médium (napr. SMSA; dodatok 2). Riedenia sa rozotrú 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 dva až šesť dní.
– Na univerzálnych živných pôdach virulentné izoláty *Ralstonia solanacearum* vytvárajú perlovobiele, ploché, nepravidelné a fluidné kolónie, často s charakteristickými špirálkami v strede. Nevirulentné formy *R. solanacearum* vytvárajú malé kruhové, nefluidné, maslovité kolónie, ktoré sú celé smotanovobiele.
– Na Kelmanovom tetrazoliovom 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 *Ralstonia solanacearum*

Testy na potvrdenie identity predpokladaných izolátov *Ralstonia solanacearum* sa uvádzajú v časti F bode B.

ČASŤ C

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

1.1. Príprava vzoriek
– 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 ďalej uvedených metód určovania prítomnosti sa zakladá na skúšaní vzoriek z 200 hľúz.
– Ďalej popísaný 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 °C až 30 °C až do dvoch týždňov pred testovaním podporí množenie všetkých populácií *Ralstonia solanacearum*.
b) Umytie hľúz. Medzi každou vzorkou sa použijú vhodné dezinfekčné prostriedky (ak sa použije test PCR, zlúčeniny chlóru na odstránenie DNA patogénu) a detergenty. Hľuzy sa nechajú na vzduchu vyschnúť. Toto umývanie je užitočné (ale nevyžaduje sa) najmä pri vzorkách, na ktorých sa nachádza príliš veľa zeminy, a ak sa má vykonať test PCR alebo priama izolácia.

1.1.1. Čistým, dezinfikovaným skalpelom alebo kuchynským nožom sa odstráni šupka hľuzy na jej pupkovom (stolonovom) konci tak, aby bolo vidieť cievne pletivo. Z cievneho pletiva na pupkovom konci každej hľuzy sa opatrne vyreže malý výrezok cievneho pletiva z pupkového konca tak, aby sa vyrezalo čo najmenej necievnych pletív.
Vyradia sa všetky (hnijúce) hľuzy vykazujúce symptómy hnedej hniloby a testujú sa 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 dva dni pri izbovej teplote, aby sa umožnila suberizácia (zahojenie reznej rany), a skladuje sa schladená (pri 4 °C až 10 °C) v primeraných podmienkach karantény. Všetky hľuzy vrátane hľúz podozrivých na symptómy sa uchovávajú podľa prílohy III.

1.1.2. Výrezky z pupkových koncov hľúz sa spracujú jedným z týchto postupov:
a) Pridá sa dostatočný objem (asi 40 ml) maceračného tlmivého roztoku (dodatok 4), aby bol výrezok prekrytý, umiestni sa do rotačnej trepačky a inkubuje sa počas štyroch hodín (50 až 100 otáčok/min.) pri teplote pod 24 °C alebo počas 16 až 24 hodín v chlade alebo
b) výrezok sa homogenizuje dostatočným objemom (asi 40 ml) maceračného tlmivého roztoku (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).

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

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

1.1.4. Bakteriálna frakcia sa koncentruje odstredením pri odstredivej sile 7 000 g počas 15 minút (alebo 10 000 g počas desiatich minút) pri teplote od 4 °C do 10 °C a supernatant sa vyleje tak, aby sa neporušil vzniknutý pelet.

1.1.5. Pelet sa resuspenduje v 1,5 ml peletového tlmivého roztoku (dodatok 4). Použije sa 500 μl na test na *R. solanacearum*, 500 μl pre *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a 500 μl na archivačné účely. Pridá sa sterilný glycerín do koncentrácie 10 až 25 % (v/v) k 500 μl alikvotných podielov, pretrepe sa a skladuje sa pri teplote od –16 °C do –24 °C (niekoľko týždňov) alebo pri teplote od –68 °C do –86 °C (niekoľko mesiacov). Testované podiely sa počas testovania uchovávajú pri teplote od 4 °C do 10 °C.

Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie sa neodporúča.

Ak je potrebná preprava extraktu, zabezpečí sa 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. To 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 (časť F bod A.4.)
Test IF (časť F bod A.5.)
Testy PCR (časť F bod A.6.)
Test FISH (časť F bod A.7.)
Testy ELISA (časť F bod A.8.)
Biotest (časť F bod A.9.)

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

2.1. Príprava vzorky
Pri určovaní prítomnosti latentných populácií *R. solanacearum* sa odporúča testovať kompozitné vzorky. Postup možno vhodným spôsobom uplatniť pri kompozitných vzorkách až z 200 častí stoniek. Na účely prehľadov by sa tieto prehľady mali zakladať na štatisticky reprezentatívnej vzorke skúmanej populácie rastlín.

2.1.1. Vložia sa 1 až 2 cm dlhé segmenty stonky do uzatvorenej sterilnej nádoby podľa týchto postupov odoberania vzoriek:
Semenáče rajčiaka z pestovateľskej škôlky: čistým dezinfikovaným nožom sa oddelí 1 cm dlhá časť z dolnej časti každej stonky tesne nad úrovňou zeminy.

Rastliny rajčiaka pestované na poli alebo v skleníku: čistým dezinfikovaným nožom sa oddelí rezom tesne nad miestom vyrastania z hlavnej stonky najnižší postranný výhonok z každej rastliny. Odstráni sa 1 cm dlhá časť z každého postranného výhonku.
Ostatné hostiteľské rastliny: čistým dezinfikovaným nožom alebo záhradníckymi nožnicami sa oddelí 1 cm dlhý úsek z dolnej časti každej stonky tesne nad úrovňou zeminy. Pri *S. dulcamara* alebo iných hostiteľských rastlinách rastúcich vo vode sa oddelia 1 až 2 cm dlhé časti zo stonky rastúcej pod vodou alebo zo stolonov s vodnými koreňmi.
Pri odoberaní vzoriek z osobitných miest sa odporúča testovať štatisticky reprezentatívnu vzorku najmenej desatich rastlín každého potenciálneho burinného hostiteľa na jedno miesto odberu. Určenie prítomnosti patogénu je najspoľahlivejšie neskoro na jar, v lete alebo na jeseň, 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 populácie *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*.
V tomto štádiu možno urobiť vizuálnu prehliadku vnútorných príznakov (sfarbenie cievnych zväzkov alebo baktériový sliz). Všetky segmenty stonky s príznakmi sa oddelia a testujú sa samostatne (časť B).

2.1.2. Segmenty stonky sa krátko dezinfikujú 70 % etanolom a ihneď sa osušia jemným pijavým papierom. Potom sa segmenty stonky spracujú jedným z uvedených postupov:
a) Pridá sa dostatočné množstvo (približne 40 ml) maceračného tlmivého roztoku (dodatok 4), aby boli odrezky stonky prekryté, a inkubujú sa na rotačnej trepačke (50 až 100 otáčok/min.) počas štyroch hodín pri teplote nižšej ako 24 °C alebo v chlade počas 16 až 24 hodín.
b) Odrezky sa okamžite rozdrvia gumeným kladivkom alebo iným vhodným nástrojom na drvenie (napr. Homex) v jednorazovom maceračnom vrecúšku (napr. Stomacher alebo Bioreba) s primeraným množstvom maceračného tlmivého roztoku (dodatok 4). Ak to nie je možné, odrezky sa skladujú v chlade najdlhšie 72 hodín alebo pri izbovej teplote najdlhšie 24 hodín.

2.1.3. Supernatant sa dekantuje asi po 15 minútach usadzovania.

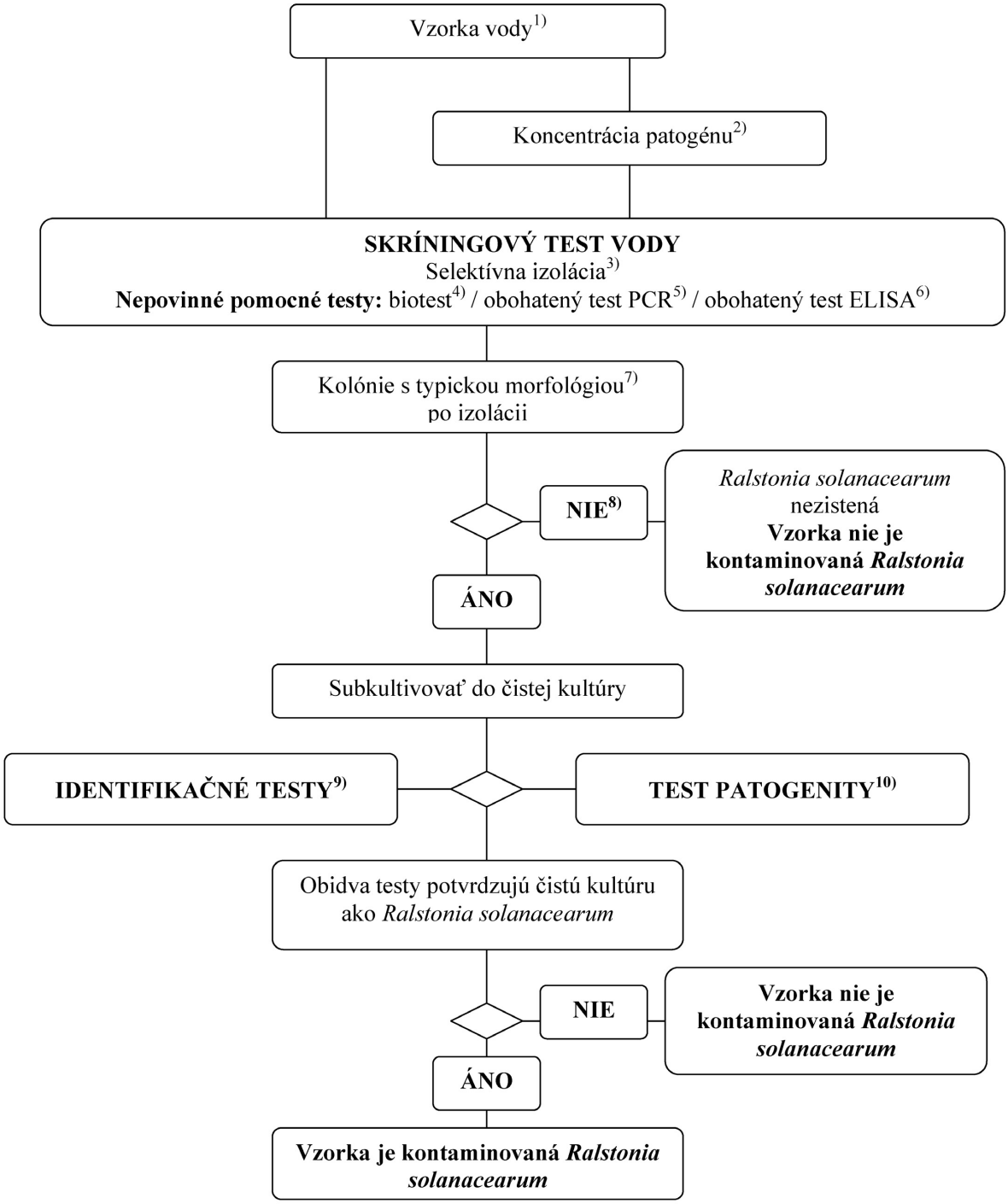
2.1.4. Ďalšie čistenie extraktu ani koncentrácia baktériovej frakcie sa zvyčajne nevyžadujú, ale môžu sa dosiahnuť filtráciou a/alebo odstredením, ako sa popisuje v časti C bodoch 1.1.3. až 1.1.5.

2.1.5. Čistá alebo koncentrovaná vzorka sa rozdelí na dva rovnaké diely. Jeden diel sa uchováva počas testovania pri teplote 4 °C až 10 °C, a ak je potrebné ďalšie testovanie, druhý diel sa skladuje s podielom 10 až 25 % (objem/objem) sterilného glycerínu 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 sú uvedené v príslušných dodatkoch:
Selektívna izolácia (časť F bod A.4.)
Test IF (časť F bod A.5.)
Testy PCR (časť F bod A.6.)
Test FISH (časť F bod A.7.)
Testy ELISA (časť F bod A.8.)
Biotest (časť F bod A.9.)

ČASŤ D

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



[1)] Odporúčané postupy odoberania vzoriek sa uvádzajú v časti D bode 2.1.
[2)] Metódy koncentrácie patogénu sa popisujú v časti D bode 2.1.
[3)] Selektívny izolačný test je uvedený v časti F bode A.4.
[4)] Biotest je uvedený v časti F bode A.9.
[5)] Metódy obohatenia testu PCR sa popisujú v časti F bode A.4.2. a v časti F bode A.6.
[6)] Metódy obohatenia testu ELISA sa popisujú v časti F bode A.4.2. a v časti F bode A.8.
[7)] Typická morfológia kolónie je uvedená v časti B bode 3.d).
[8)] Kultivácia môže byť neúspešná pre konkurenciu alebo inhibíciu saprofytickými baktériami. Ak je podozrenie, že veľké saprofytické populácie ovplyvňujú spoľahlivosť izolácie, izolačné testy po zriedení vzorky vodou sa zopakujú.
[9)] Spoľahlivá identifikácia čistých predpokladaných kultúr *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v časti F bode B.
[10)] Test patogenity je uvedený v časti F bode C.

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

Princíp

Validovaný systém určovania prítomnosti *Ralstonia solanacearum* popísaný v tejto časti 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 ďalej 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 zredukujú počty populácií 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

- Určovanie prítomnosti *Ralstonia 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 sa odoberajú v blízkosti hostiteľských rastlín, ak sa tam vyskytujú.

2.1.1. Na vybraných miestach odberu vzoriek sa odoberú vzorky vody do jednorazových skúmaviek alebo fliaš podľa možnosti v hĺbke 30 cm a do dvoch metrov od brehu. Vzorky na spracovanie odpadových vôd sa odoberajú 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 trikrát za sebou, pričom každá vzorka sa skladá z dvoch opakovaných podvzoriek s objemom najmenej 30 ml. Pri intenzívnej výskumnej práci sa zvolia aspoň tri miesta odberu vzoriek na tri kilometre vodného toku a zabezpečí sa odber vzoriek aj z prítokov vodného toku.

2.1.2. Vzorky sa prepravujú v chlade a tme (4 °C až 10 °C) a testujú sa do 24 hodín.

2.1.3. Baktériová frakcia sa môže koncentrovať niektorou z týchto metód:

a) Odstredí sa 30 až 50 ml podvzorky pri 10 000 g počas desiatich minút (alebo 7 000 g počas 15 minút) najlepšie pri teplote 4 °C až 10 °C, vyleje sa supernatant a resuspenduje sa pelet v 1 ml peletového tlmivého roztoku (dodatok 4).

b) Prefiltruje sa cez membránový filter (minimálna veľkosť pórov 0,45 μm), opláchne sa filter v 5 až 10 ml peletového tlmivého roztoku, ktorý je nutné zachytiť. Táto metóda je vhodná pre väčšie množstvá vody obsahujúcej malé množstvo saprofytov.

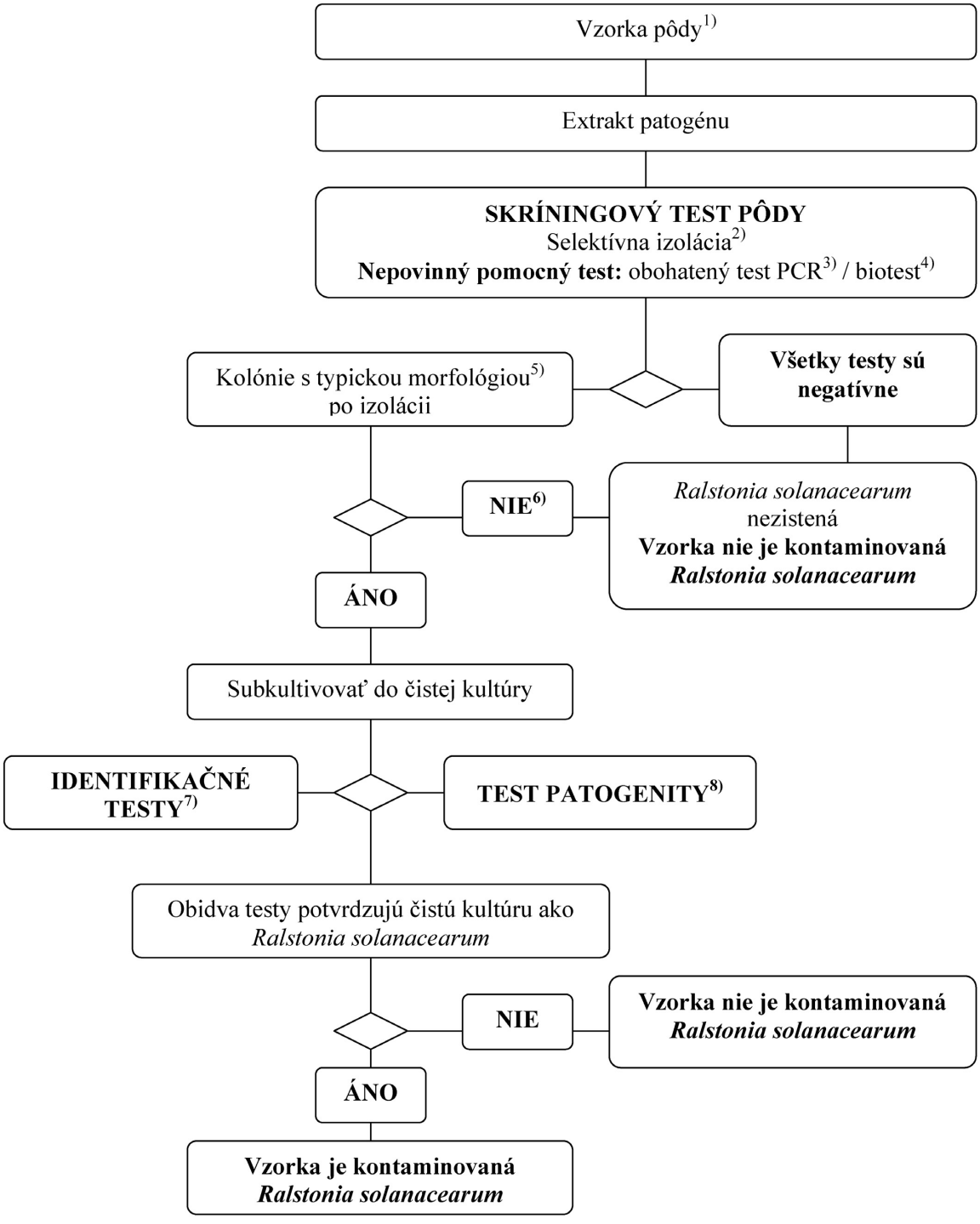
Pri vzorkách vody zo spracovania zemiakov a odpadovej vody sa koncentrovanie zvyčajne neodporúča, pretože zvýšené populácie konkurenčných saprofytických baktérií spomaľujú určovanie prítomnosti *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Testovanie

Podľa vývojového diagramu a popisu testov v relevantných dodatkoch.

ČASŤ E

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



[1] Odporúčané postupy odoberania vzoriek sa uvádzajú v časti E bode 2.1.
[2] Test selektívnej izolácie je uvedený v časti F bode A.4.
[3] Metódy obohacovania testu PCR sa popisujú v časti F bode A.4.2. a časti F bode A.6.
[4] Biotest je uvedený v časti F bode A.9.
[5] Typická morfológia kolónie je uvedená v časti B bode 3.d).
[6] Kultivovanie môže byť neúspešné pre konkurenciu alebo inhibíciu saprofytickými baktériami. Ak je podozrenie, že veľké saprofytické populácie ovplyvňujú spoľahlivosť izolácie, po ďalšom zriedení vzorky sa izolačné testy zopakujú.
[7] Spoľahlivá identifikácia predpokladaných čistých kultúr *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou testov popísaných v časti F bode B.
[8] Test patogenity je uvedený v časti F bode C.

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

Princíp

Validovaný systém určovania prítomnosti *Ralstonia solanacearum*, ktorý je uvedený v tejto časti, je použiteľný pri určovaní prítomnosti patogénov vo vzorkách pôdy, ale môže sa použiť aj na testovanie tuhých odpadov zo spracovania zemiakov alebo splaškových kalov. 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 sa musí brať na zreteľ pri posudzovaní spoľahlivosti všetkých negatívnych výsledkov a takisto vtedy, ak 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 sa musia dodržiavať štandardné postupy odoberania vzoriek háďatiek. Na vzorku sa odoberie 0,5 až 1 kg pôdy zo 60 miest na 0,3 ha z hĺbky 10 až 20 cm (alebo v rastri 7 × 7 m). Ak je podozrenie na prítomnosť patogénu, zvýši sa počet miest odberu na 120 na 0,3 ha. Vzorky pred testovaním sa skladujú pri teplote 12 °C až 15 °C. Vzorka odpadov zo spracovania zemiakov a splaškových kalov sa pripraví zozbieraním celkovo 1 kg materiálu z viacerých miest reprezentujúcich celý objem splaškov, ktoré sa majú testovať. Každá vzorka pred testovaním sa dôkladne zamieša.

2.1.2. Podvzorky z 10 až 25 g pôdy alebo kalu sa rozptýlia pomocou rotačnej trepačky (250 otáčok/min.) v 60 až 150 ml maceračného tlmivého roztoku (dodatok 4) počas dvoch hodín. Ak je to potrebné, podporí sa disperzia pridaním 0,02 % sterilného Tween-20 a 10 až 20 g sterilného štrku.

2.1.3. Počas testovania sa udržiava suspenzia pri teplote 4 °C.

2.2. Testovanie

Podľa vývojového diagramu a popisu testov v relevantných dodatkoch.

ČASŤ F

OPTIMALIZOVANÉ PROTOKOLY NA URČOVANIE PRÍTOMNOSTI A IDENTIFIKÁCIU *RALSTONIA SOLANACEARUM*

A. *DIAGNOSTICKÉ TESTY A TESTY NA URČOVANIE PRÍTOMNOSTI RALSTONIA SOLANACEARUM*

1. Test vytekania baktériového slizu stonky

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

2. Určovanie prítomnosti granúl poly-ß-hydroxybutyrátu

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

2. Pripravia sa pozitívne kontrolné roztery kmeňa biovaru 2 *R. solanacearum*, a ak to je užitočné, aj negatívny kontrolný rozter známeho druhu, ktorý je PHB negatívny.
3. Nechajú sa na vzduchu vyschnúť a spodnou stranou sklíčka sa prejde niekoľkokrát rýchlo ponad plameň, kým sa rozter nezafixuje.
4. Preparát sa sfarbí buď nílskou modrou, alebo sudánskou čiernou a pozoruje sa pod mikroskopom podľa tohto popisu:

Test nílskou modrou

a) Každé sklíčko sa zaleje 1 % vodným roztokom nílskej modrej A a inkubuje sa desať minút pri teplote 55 °C.
b) Nechá sa odtiecť farbiaci roztok. Krátko sa opláchne pod slabo tečúcou vodou. Prebytočná voda sa odsaje jemným pijavým papierom.
c) Rozter sa zaleje 8 % vodným roztokom kyseliny octovej a inkubuje sa jednu minútu pri izbovej teplote.
d) Krátko sa opláchne pod slabo tečúcou vodou. Prebytočná voda sa odsaje jemným pijavým papierom.
e) Opätovne sa zvlhčí kvapkou vody a zakryje sa krycím sklíčkom.
f) Sfarbený rozter sa preskúma 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) Je potrebné si všímať sýtooranžovú fluorescenciu granúl PHB. Pozoruje sa aj za prechádzajúceho bežného svetla a je potrebné sa uistiť, či sú granuly vnútrobunkové a či morfológia buniek je typická pre *R. solanacearum*.

Test sudánskou čiernou

a) Každé sklíčko sa zaleje 0,3 % roztokom sudánskej čiernej B v 70 % etanole a inkubuje sa desať minút pri izbovej teplote.
b) Nechá sa odtiecť roztok farbiva, krátko sa opláchne v tečúcej vode a prebytočná voda sa odsaje jemným pijavým papierom.
c) Sklíčka sa ponoria nakrátko do xylolu a osušia sa 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 nechajú sa desať 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) Pozoruje sa modročierne 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 (dodatok 3) označených príslušnými farebnými značkami, ako sú červené bunky *Staphylococcus aureus*, alebo farebnými latexovými časticami. Ak sa použije komerčne dostupná súprava (dodatok 3), je potrebné dodržiavať pokyny výrobcu. Inak sa dodržiava tento postup:

a) Zmiešajú sa kvapky suspenzie označenej protilátky a baktériový sliz (približne 5 µl z každého) v jamkách viacjamkových testovacích sklíčok.
b) Pripravia sa pozitívne a negatívne kontroly pomocou suspenzií *R. solanacearum* biovaru 2 a jedného nerovnocenného kmeňa.
c) Po jemnom miešaní počas 15 sekúnd sa pozoruje aglutinácia v pozitívnych vzorkách.

4. Selektívna izolácia

4.1. Selektívny platňový rozter

Pred prvým použitím tejto metódy sa urobia 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.

Použije sa primerane validované selektívne médium ako SMSA (modifikované podľa Elphinstone a kol., 1996; 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. Pri podozrení 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 °C do –86 °C.

Ako pozitívne kontroly sa pripravia desatinné riedenia suspenzie s hustotou 10^6 buniek tvoriacich kolónie virulentného kmeňa *R. solanacearum* biovaru 2 (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na 1 ml. Aby sa

vylúčila akákoľvek možnosť kontaminácie, pripravujú sa pozitívne vzorky úplne oddelené 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 sa testuje rovnakým spôsobom ako vzorka alebo vzorky.

4.1.1. Použije sa vhodná zrieďovacia platňová technika rozteru, ktorou sa zabezpečí, aby sa zriedili všetky nežiaduce saprofytické populácie tvoriace kolónie. Rozotrie sa 50 až 100 µl extraktu vzorky na platňu a na každé riedenie.

4.1.2. Platne sa nechajú inkubovať pri teplote 28 °C. Po 48 hodinách sa platne skontrolujú a potom každý deň až do šiestich dní. Typické kolónie *Ralstonia solanacearum* na médiu SMSA sú mliečnobiele, ploché, nepravidelné a fluidné a po 3 dňoch inkubácie sa v strede vytvorí ružové až krvavočervené sfarbenie s vnútornými prúžkami alebo závitmi.
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 *Ralstonia solanacearum* sa po nanesení v prúžkoch alebo po zriedenom roztere na univerzálnu živnú pôdu očistia, aby sa dostali izolované kolónie (dodatok 2).

4.1.4. Kultúry sa krátkodobo uchovajú v sterilnej vode (pH 6 až 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. Identifikujú sa predpokladané kultúry (časť F bod B) a urobí sa test patogenity (časť F bod C).

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

4.2. Obohacovanie
Použije sa validované obohacovacie médium, ako je modifikovaný živný roztok Wilbrink (dodatok 2).
Tento postup možno 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 pre konkurenciu alebo antagonizmus saprofytických organizmov, ktoré sa často súčasne obohatia. Z tohto dôvodu môže byť izolácia R. solanacearum z kultúr obohatených v živných roztokoch ťažká. Keďže sa okrem toho 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 sa prenesie 100 µl extraktu zo vzorky do 10 ml obohateného živného roztoku (dodatok 2), ktorý sa predtým primerane rozdelil 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. Inkubuje sa 72 hodín pri teplote 27 až 30 °C v trepačke alebo staticky s uvoľneným uzáverom, aby sa umožnil prístup vzduchu.

4.2.3. Pred použitím v testoch ELISA alebo PCR sa bakteriálna kultúra dôkladne premieša.

4.2.4. Obohatený živný roztok sa spracuje rovnakým spôsobom ako vzorka v už uvedených testoch.
Ak sa očakáva inhibícia obohacovania *R. solanacearum* pre vysoké populácie určitých konkurenčných saprofytických baktérií, lepšie výsledky sa môžu 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.
Ak 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.
Používa sa validovaný zdroj protilátok *R. solanacearum*. 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 až 10^6 buniek na 1 ml homologického kmeňa *R. solanacearum* a s použitím vhodného konjugátu fluorescenčného izotio-

kyanátu (ďalej len „FITC“) podľa pokynov výrobcu dosahuje optimálna reakcia. Všetky validované polyklonálne antiséra musia mať titer IF najmenej 1 : 2 000. Počas testovania sa používajú protilátky v pracovnom riedení alebo riedeniach blízkych titru alebo na úrovni titra.
Test sa robí s čerstvo pripravenými extraktmi zo vzoriek. Ak treba, môže sa úspešne urobiť aj s extraktmi skladovanými pri teplote –68 až –86 °C v glyceríne. Glycerín sa môže zo vzorky odstrániť pridaním 1 ml peletového tlmivého roztoku (dodatok 4), opakovaným odstredením počas 15 minút pri odstredivej sile 7 000 g a resuspendácii v rovnakom objeme peletového tlmivého roztoku. Toto však často nie je potrebné, najmä ak sú vzorky fixované na podložné sklíčka ich zahrievaním nad plameňom.
Pripravia sa samostatné podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou z homologického kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *Ralstonia solanacearum*, resuspendovaného v extrakte zo zemiaka, ako je špecifikované v dodatku 3B, a prípadne aj v peletovom tlmivom roztoku.
Ak je to možné, ako podobná kontrola na tom istom sklíčku sa použije 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 *Ralstonia solanacearum* s negatívnym výsledkom.
Štandardne pozitívne a negatívne kontrolné materiály, ktoré sú k dispozícii na použitie pri tomto teste, sa uvádzajú v dodatku 3.
Použijú sa viacjamkové podložné sklíčka, najlepšie s desiatimi jamkami, s minimálnym priemerom 6 mm.
Kontrolný materiál sa testuje rovnakým spôsobom ako vzorka alebo vzorky.

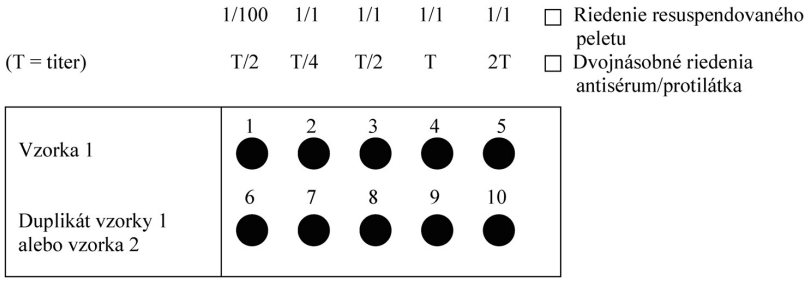
5.1. Podložné sklíčka sa pripravia jedným z týchto postupov:
a) Pri peletoch s relatívne malým sedimentom škrobu:
Pipetou sa nanesie odmeraný štandardný objem (15 µl postačuje na jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť primerane väčší objem) riedenia 1/100 resuspendovaného zemiakového peletu do prvej jamky. Potom sa do zostávajúcich jamiek v rade pipetou nanesie rovnaký objem neriedeného peletu (1/1). Ďalší rad možno použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku 1.
b) Pri ostatných peletoch:
Pripravia sa desatinné riedenia (1/10, 1/100) resuspendovaného peletu v peletovom tlmivom roztoku. Pipetou sa nanesie odmeraný štandardný objem (15 µl postačuje na jamku s priemerom 6 mm – pri väčších jamkách treba použiť primerane väčší objem) resuspendovaného peletu a každého riedenia do radu jamiek. Ďalší rad možno použiť ako duplikát alebo pre druhú vzorku, ako je znázornené na obrázku 2.

5.2. Kvapky sa nechajú vyschnúť pri izbovej teplote alebo ohrievaním pri teplote 40 až 45 °C. Bakteriálne bunky sa fixujú na podložné sklíčko buď ohrievaním (15 minút pri teplote 60 °C), nahrievaním nad plameňom 95 % etanolu, alebo podľa osobitných pokynov od dodávateľa protilátok.
Ak treba, môžu sa fixované podložné sklíčka pred ďalším testovaním skladovať (najviac tri mesiace) zmrazené vo vysušenom boxe.

5.3. Postup pri teste IF
a) Pri príprave podložného sklíčka podľa 5.1.a):
Pripraví sa súprava 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).
b) Pri príprave podložného sklíčka podľa 5.1.b):
Pripraví sa pracovné riedenie (PR) protilátky v tlmivom roztoku IF. Pracovné riedenie ovplyvňuje špecifickosť.

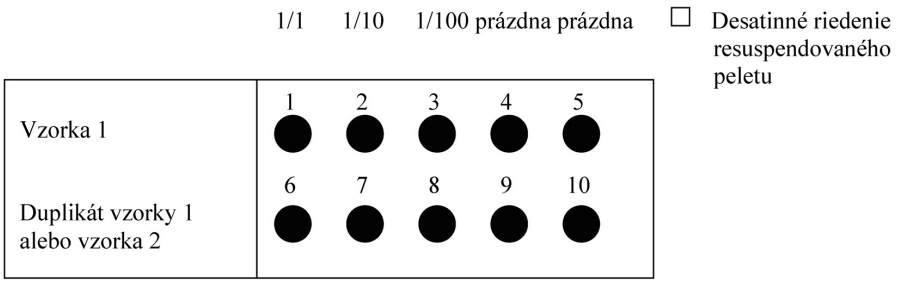
Obrázok 1 Príprava podložného sklíčka postupom podľa 5.1.a) a 5.3.a)

Riedenia resuspendovaného peletu



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

Pracovné riedenie antiséra/protilátky



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

Ak chýbajú osobitné pokyny výrobcov protilátok, mal by sa vykonať tento postup:

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

5.3.3. Kvapky z každého podložného sklíčka sa opatrne strasú a opláchnu tlmivým roztokom IF. Preplachujú sa ponorené päť minút v tlmivom roztoku IF-Tween (dodatok 4) a potom v tlmivom roztoku IF. Zabráni sa rozprašovaniu alebo kvapkaniu, ktoré by mohli spôsobiť krížovú kontamináciu. Prebytočná vlhkosť sa starostlivo odstráni jemným odsatím pijavým papierom.

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

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

5.3.6. Kvapky konjugátu sa opatrne strasú z podložného sklíčka. Oplachuje sa a preplachuje sa rovnako ako v bode 5.3.3.
Dôkladne sa odstráni prebytočná vlhkosť.

5.3.7. Na každú jamku sa napipetuje 5 až 10 µl 0,1M glycerínu tlmeného fosfátom (dodatok 4) alebo inej komerčne dostupnej krycej kvapaliny na udržanie signálu a priloží sa krycie sklíčko.

5.4. Hodnotenie testu IF

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

Najprv sa skontrolujú 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 (časť F bod A.5.) zopakovať.

5.4.2. V testovacích jamkách podložných sklíčok sa pozorujú jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *Ralstonia solanacearum*. Intenzita fluorescencie musí zodpovedať pozitívnemu kontrolnému kmeňu pri rovnakom riedení antiséra. Bunky s neúplným sfarbením alebo so slabou fluorescenciou sa nezohľadňujú.

Ak je akékoľvek podozrenie na kontamináciu, test sa musí zopakovať. Môže to byť vtedy, ak sa na všetkých podložných sklíčkach vo vzorke nájdu pozitívne bunky pre kontamináciu tlmivého roztoku 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 s podobnou veľkosťou a morfológiou ako *R. solanacearum* spôsobujúce krížovú reakciu 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., sa berú do úvahy len fluoreskujúce bunky s typickou veľkosťou a morfológiou.

5.4.5. Vyhodnotenie výsledkov testu IF:
a) Ak sa nájdu jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou, stanoví sa priemerný po-

čet typických buniek na mikroskopické políčko a vypočíta sa 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.

b) 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

Ak sa PCR použije ako hlavný skríningový test a ak je pozitívny, nasleduje izolačný test alebo IF ako druhý povinný skríningový test. Ak sa PCR použije ako druhý skríningový test a ak je pozitívny, na úplnú diagnostiku sa vyžaduje ďalšie testovanie podľa testovacej schémy.

Úplne využitie tejto metódy ako hlavného skríningového testu sa odporúča iba pri špecializovanej odbornosti.

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

Použijú sa validované činidlá a protokoly pre testy PCR (dodatok 6). Prednosť má metóda s vnútornou kontrolou.

Prijmú sa všetky opatrenia na vylúčenie kontaminácie vzorky cieľovou DNA. Test PCR uskutočnia skúsení technici v laboratóriách na molekulárnu biológiu, aby sa na minimum obmedzila možnosť kontaminácie cieľovou DNA.

S negatívnou kontrolou (extrakcie DNA a postupov PCR) sa vždy pracuje ako s poslednou vzorkou celého postupu, aby bolo zrejmé, či sa nevyskytol prenos cieľovej DNA.

Test PCR zahŕňa tieto negatívne kontroly:

- extrakt zo vzorky, ktorá bola predtým testovaná na *R. solanacearum* s negatívnym výsledkom,
- tlmivé roztoky použité na extrahovanie baktérií a DNA zo vzorky,
- reakčná zmes pre PCR.

Zahrnutá je táto pozitívna kontrola:

- alikvotné podiely resuspendovaných peletov, do ktorých sa pridala *Ralstonia solanacearum (príprava v* dodatku 3 B),
- suspenzia 10^6 buniek na 1 ml *Ralstonia solanacearum* vo vode z virulentného izolátu (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; dodatok 3 B),
- ak je to možné, použije sa aj DNA extrahovaná z pozitívnych kontrolných vzoriek pri teste PCR.

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

Extrakty zo vzoriek musia 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

Použijú sa už uvedené pozitívne a negatívne kontroly (dodatok 3).

Kontrolný materiál sa testuje rovnakým spôsobom ako vzorka alebo vzorky.

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 táto metóda:

a) Metóda podľa Pastrika (2000)

1. Pipetou sa nanesie 220 ěl lyzačného tlmivého roztoku [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. Pridá sa 100 ěl extraktu vzorky a umiestni sa na 10 minút do termobloku alebo do vodného kúpeľa s teplotou 95 °C.
3. Skúmavka sa premiestni na päť minút na ľad.
4. Pridá sa 80 ěl koncentrovaného roztoku lyzozýmu (50 mg lyzozýmu na 1 ml v 10 mM Tris HCl, pH 8,0) a inkubuje sa 30 minút pri teplote 37 °C.
5. Pridá sa 220 µl roztoku Easy DNA® solution A (Invitrogen), dobre sa pretrepe a 30 minút sa inkubuje pri teplote 65 °C.
6. Pridá sa 100 µl roztoku Easy DNA® solution B (Invitrogen), dôkladne sa pretrepe, kým precipitát voľne nepláva v skúmavke a vzorka nemá jednotnú viskozitu.
7. Pridá sa 500 µl chloroformu a pretrepáva sa, kým viskozita neklesne a zmes nie je homogénna.
8. Odstreďuje sa 20 minút pri odstredivej sile 15 000 g pri teplote 4 °C, aby sa oddelili fázy a vytvorilo sa rozhranie.
9. Horná fáza sa premiestni do čistej Eppendorfovej skúmavky.
10. Pridá sa 1 ml 100 % etanolu (20 °C), krátko sa pretrepe a inkubuje na ľade desať minút.
11. Odstreďuje sa 20 minút pri odstredivej rýchlosti 15 000 g pri teplote 4 °C a odstráni sa etanol z peletu.

12. Pridá sa 500 µl 80 % etanolu (–20 °C) a premieša sa otočením skúmavky hore dnom.
13. Odstreďuje sa 10 minút pri odstredivej rýchlosti 15 000 g pri teplote 4 °C, pelet sa zachytí a odstráni sa etanol.
14. Pelet DNA sa nechá vyschnúť na vzduchu alebo za vákuového odsávania.
15. Pelet sa resuspenduje v 100 µl sterilnej ultračistej vody (UPW) a nechá sa stáť pri izbovej teplote najmenej 20 minút.
16. Do použitia na test PCR sa skladuje pri teplote –20 °C.
17. Odstredením sa odstráni všetok biely precipitát a na test PCR sa použije 5 µl supernatantu obsahujúceho DNA.

b) Iné metódy

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

6.2. Test PCR

6.2.1. Pripravia sa testované a kontrolné vzorky podľa validovaných protokolov (časť F bod A.6.). Pripraví sa jedno desatinné riedenie extraktu zo vzorky DNA (1 : 10 v UPW).

6.2.2. Podľa uverejnených protokolov (dodatok 6) sa pripraví v prostredí, v ktorom nedôjde ku kontaminácii, vhodná reakčná zmes pre test PCR. Ak to je možné, odporúča sa používať protokol PCR, ktorý obsahuje aj vnútornú kontrolu testu PCR.

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

6.2.4. Vytvorí sa negatívna kontrolná vzorka obsahujúca iba reakčnú zmes PCR a namiesto vzorky sa pridá ultračistá voda (UPW) z toho istého zdroja, ktorý sa použil pri zmesi PCR.

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

6.3. Analýza produktu PCR

6.3.1. Produkty PCR sa analyzujú agarózovou gélovou elektroforézou. Na elektroforézu sa nanáša aspoň 12 µl reakčnej zmesi DNA z každej vzorky zmiešanej s 3 µl nanášacieho tlmivého roztoku (dodatok 6) do 2,0 % (w/v) agarózového gélu v tris-acetát-EDTA tlmivom roztoku (TAE) (dodatok 6) pri napätí 5 až 8 V/cm. Použije sa vhodný marker DNA, napr. 100 bp ladder.

6.3.2. Fragmenty DNA sa zviditeľnia sfarbením pomocou etídium bromidu (0,5 mg/l) počas 30 až 60 minút, pričom pri manipulácii s touto mutagénnou látkou je potrebné použiť ochranné opatrenia.

6.3.3. Gél po sfarbení s etídium bromidom sa pozoruje v UV transiluminátore (λ = 302 nm) a zdokumentuje sa. Porovnajú sa produkty PCR predpokladanej veľkosti vo vzorkách a kontrolách k DNA štandardu (dodatok 6).

6.3.4. Pri všetkých nových zisteniach/prípadoch sa overí autentickosť produktu PCR pomocou reštrikčnej analýzy inkubovaním zvyšného podielu produktu PCR pri optimálnej teplote a optimálne dlhom čase s vhodnou restrikčnou endonukleázou a tlmivým roztokom (dodatok 6). Štiepne fragmenty DNA sa stanovia agarózovou gélovou elektroforézou a sleduje sa štiepny profil fragmentov v UV transiluminátore po sfarbení etídium bromidom a porovná sa s neštiepenou a štiepenou pozitívnou kontrolou.

Vyhodnotenie výsledku testu PCR

Test PCR je negatívny, ak v príslušnej vzorke nebol zistený špecifický produkt PCR *Ralstonia solanacearum* očakávanej veľkosti, ale ak sa zistí vo všetkých pozitívnych kontrolných vzorkách (pri testoch multiplex PCR so špecifickými rastlinnými vnútornými kontrolnými primermi druhý produkt PCR predpokladanej veľkosti sa musí nachádzať v príslušnej testovanej vzorke).

Test PCR je pozitívny, ak sa zistí špecifický produkt PCR *Ralstonia solanacearum* s predpokladanou veľkosťou a reštrikčným profilom, ak sa vyžaduje, za podmienky, že sa neamplifikoval pri žiadnej negatívnej kontrolnej vzorke. Spoľahlivé potvrdenie pozitívneho výsledku sa dosiahne aj opakovaním testu s druhou súpravou primerov PCR (dodatok 6).

Ak sa z pozitívnej kontrolnej vzorky obsahujúcej *Ralstonia solanacearum* vo vode získa predpokladaný produkt PCR, ale z pozitívnych kontrol s *Ralstonia solanacearum* v extrakte zo zemiaka sa získajú negatívne výsledky, môže byť podozrenie na inhibíciu PCR. Pri protokoloch multiplex PCR s vnútornými kontrolami sa inhibícia reakcie prejavuje, ak dôjde k absencii oboch produktov PCR.

Podozrenie na kontamináciu môže byť aj vtedy, ak sa predpokladaný produkt PCR špecifický pre *Ralstonia solanacearum* získa z jednej negatívnej kontroly alebo z viacerých negatívnych kontrol.

7. Test FISH

Princíp

Ak sa test FISH použije ako prvý skríningový test a ak sa zistí, že je pozitívny, musí sa ako druhý povinný skrínin-

gový test vykonať izolačný test alebo test IF. Ak sa test FISH použije ako druhý skríningový test a ak sa zistí, že je pozitívny, na stanovenie úplnej diagnózy sa vyžaduje ďalšie testovanie podľa vývojového diagramu.
Použijú sa validované špecifické oligopróby pre *Ralstonia solanacearum* (dodatok 7). Predbežné testovanie touto metódou by malo umožniť opakovateľné určenie prítomnosti najmenej 10^3 až 10^4 buniek *Ralstonia 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 °C alebo od –68 do –86 °C.
Ako negatívna kontrola sa použije alikvotný podiel extraktu vzorky, ktorá bola predtým testovaná na *R. solanacearum* s negatívnym výsledkom.
Ako pozitívne kontroly sa pripravia suspenzie obsahujúce 10^5 až 10^6 buniek *Ralstonia solanacearum* biovar 2 (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, dodatok 3) na 1 ml 0,01M fosfátového tlmivého roztoku (PB) z 3- až 5-dňovej kultúry. Samostatne sa pripravia podložné sklíčka s pozitívnou kontrolou z homologického kmeňa alebo akéhokoľvek iného referenčného kmeňa *Ralstonia solanacearum* resuspendovaného 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 prítomne 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 sa testuje presne tým istým spôsobom ako vzorka.

7.1. Fixácia extraktu zo zemiaka
Protokol podľa Wullingsa *et al.* (1998):

7.1.1. Pripraví sa fixačný roztok (dodatok 7).

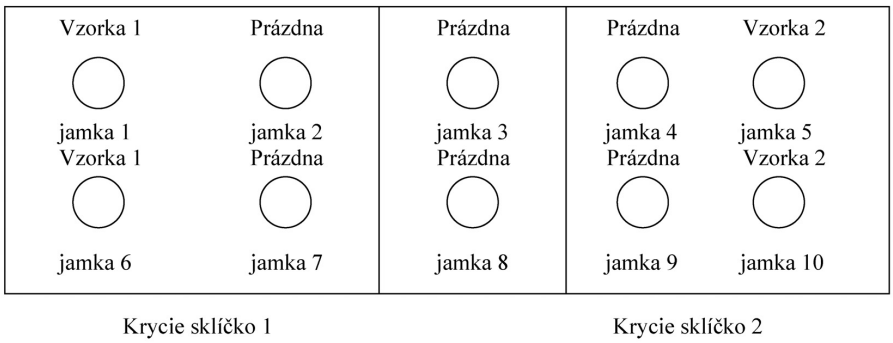
7.1.2. Pipetou sa prenesie 100 ěl každého extraktu zo vzorky do Eppendorfovej skúmavky a sedem minút sa odstreďuje pri odstredivej sile 7 000 g.

7.1.3. Dekantuje sa supernatant a rozpustí sa pelet v 200 ěl fixatívu pripraveného < 24 hodín vopred. Pretrepe sa a jednu hodinu sa inkubuje v chladničke.

7.1.4. Odstreďuje sa sedem minút pri odstredivej rýchlosti 7 000 g, dekantuje sa supernatant a resuspenduje sa pelet v 75 ěl 0,01M PB (dodatok 7).

7.1.5. Nanesie sa 16 ěl zafixovanej suspenzie na čisté viacjamkové podložné sklíčko podľa obrázku 7.1. Na každé podložné sklíčko sa nanesú dve rôzne nezriedené vzorky a použije sa 10 ěl na prípravu roztoku 1 : 100 (v 0,01 M PB). Zvyšná vzorka v roztoku (49 ěl) sa po pridaní 1 objemovej jednotky 96 % etanolu môže skladovať pri teplote –20 °C. Ak skúška FISH vyžaduje opakovanie, odstráni sa etanol odstredením a pridá sa rovnaký objem 0,01 PB (zmieša sa pretrepaním).

Obrázok 7.1 Schéma podložného sklíčka pri teste FISH



7.1.6. Podložné sklíčka sa osušia na vzduchu (alebo v sušičke pri teplote 37 °C) a zafixujú sa zahrievaním nad plameňom.
V tomto štádiu sa proces môže prerušiť a hybridizácia môže pokračovať nasledujúci deň. Podložné sklíčka sa skladujú v bezprašnom prostredí, v suchu a pri izbovej teplote.

7.2. Hybridizácia

7.2.1. Bunky sa dehydratujú postupným ponorením do 50 %, 80 % a 96 % etanolu, do každého na jednu minútu. Podložné sklíčka umiestnené na stojane sa osušia na vzduchu.

7.2.2. Pripraví sa vlhká inkubačná komora tak, že dno vzduchotesnej nádoby sa prikryje hodvábnym alebo

filtrovacím papierom nasiaknutým hybmixom 1x (dodatok 7). Box sa predinkubuje v hybridizačnej peci pri teplote 45 °C najmenej desať minút.

7.2.3. Do 8 jamiek každého podložného sklíčka (jamky 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 a 10; obrázok 7.1) sa dá 10 µl hybridizačného roztoku (dodatok 7) a dve stredné jamky (3 a 8) sa nechajú prázdne.

7.2.4. Na prvé a posledné štyri jamky sa priložia krycie sklíčka (24 × 24 mm) tak, aby v nich nezostal vzduch. Podložné sklíčka sa vložia do predhriatej vlhkej komory a päť hodín sa hybridizujú v tme v peci pri teplote 45 °C.

7.2.5. Pripravia sa 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). Každá kadička sa predinkubuje vo vodnom kúpeli pri teplote 45 °C.

7.2.6. Z podložných sklíčok sa odložia krycie sklíčka a podložné sklíčka sa umiestnia do stojana.

7.2.7. Prebytočná sonda sa vyplaví inkubovaním 15 minút v kadičke s hybromixom 1x pri teplote 45 °C.

7.2.8. Držiak s podložnými sklíčkami sa premiestni do premývacieho roztoku hybmixu 1/8x a inkubuje sa ďalších 15 minút.

7.2.9. Podložné sklíčka sa krátko ponoria do vody Mili Q a položia sa na filtračný papier. Prebytočná voda sa odstráni jemným priložením filtrovacieho papiera na povrch. Pipetou sa pridá do každej jamky 5 až 10 µl roztoku krycej kvapaliny na udržanie signálu (napr. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA alebo rovnocenná) a na celé podložné sklíčko sa priloží veľké krycie sklíčko (24 × 60 mm).

7.3. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH

7.3.1. Podložné sklíčka sa ihneď prehliadnu pod vhodným epifluorescenčným mikroskopom s olejovou imerziou pri 630- alebo 1 000-násobnom zväčšení. S filtrom, ktorý je vhodný na FITC, sú eubaktériové bunky (vrátane väčšiny gramnegatívnych buniek) vo vzorke sfarbené a fluoreskujú na zeleno. Ak sa použije filter na tetrametylrodamín-5-izotiokyanat, bunky *R. solanacearum* sfarbené Cy3 fluoreskujú na červeno. Morfológia buniek sa porovná s morfológiou pozitívnej kontroly. Bunky musia jasno fluoreskovať a musia byť úplne sfarbené. Ak je sfarbenie odlišné, test FISH (časť F bod A.7.) sa musí zopakovať. Jamky sa prehliadnu vo dvoch navzájom kolmých priemeroch a po obvode. Pri vzorkách vykazujúcich malý počet buniek alebo nevykazujúcich žiadne bunky sa prehliadne najmenej 40 mikroskopických políčok.

7.3.2. V jamkách testovacích podložných sklíčok sa pozorujú jasne fluoreskujúce bunky s charakteristickou morfológiou *Ralstonia 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. Pri podozrení na kontamináciu sa test musí zopakovať. Môže to byť vtedy, ak sa na všetkých podložných sklíčkach v sérii nachádzajú pozitívne bunky pre kontamináciu tlmivého roztoku 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 nežiaduce populácie fluoreskujúcich buniek s netypickou morfológiou a saprofytické baktérie s krížovou reakciou podobnej veľkosti a morfológie ako *Ralstonia solanacearum*, hoci zriedkavejšie ako pri teste IF.

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

7.3.6. Vyhodnotenie výsledkov testu FISH:

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

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

8. Testy ELISA

Princíp

Test ELISA možno používať len ako nepovinný test popri teste IF, PCR alebo FISH z dôvodu jeho relatívne nízkej citlivosti. Pri použití testu sendvičovej metódy enzýmovej imunoadsorbentovej analýzy (DASI ELISA) je obohaco-

vanie a použitie monoklonálnych protilátok povinné. 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.
Použije sa validovaný zdroj protilátok pre *Ralstonia solanacearum*. 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 obsahujúca 10^5 až 10^6 buniek homologického kmeňa *R. solanacearum* na 1 ml a keď sa použijú primerané sekundárne protilátkové konjugáty podľa odporúčaní výrobcu. Počas testovania sa protilátky použijú v pracovnom riedení podobnom titru alebo v titri komerčnej receptúry.
Na suspenzii s 10^5 až 10^6 bunkami homologického kmeňa *R. solanacearum* na 1 ml sa určí titer protilátok.
Zahrnie sa extrakt vzorky, ktorá bola pri predchádzajúcom teste na *R. solanacearum* negatívna, a suspenzia baktérie, pri ktorej nedochádza k vzájomným reakciám v roztoku tlmenom fosfátom (STP), ako negatívne kontroly.
Ako pozitívna kontrola sa použije alikvotný podiel vzorkového extraktu, ktorý bol pri predchádzajúcom teste negatívny, zmieša sa s 10^3 až 10^4 bunkami biovaru 2 *R. solanacearum* (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, dodatok 2A a B) na 1 ml. Na porovnanie výsledkov na každej platni sa použije štandardná suspenzia z 10^5 až 10^6 buniek *R. solanacearum* na 1 ml roztoku tlmeného fosfátom (STP). Pozitívne kontroly musia byť dobre oddelené na mikrotitračnej platni od testovanej (testovaných) vzorky (vzoriek).
Normalizované kontrolné materiály na pozitívne a negatívne kontroly, ktoré sú dostupné pre tento test, sa uvádzajú v dodatku 3 bode A.
Kontrolný materiál sa otestuje rovnakým spôsobom ako pri vzorke alebo vzorkách.

Validované sú dva ELISA protokoly.

a) Nepriamy test ELISA (Robinson Smith a kol., 1995)
   1. Použije sa 100 – 200 ěl alikvotného podielu vzorkového extraktu. (Zahriatím na 100 °C na 4 minúty vo vodnom kúpeli alebo v zahrievacom bloku sa môžu v niektorých prípadoch zničiť nešpecifické výsledky.)
   2. Pridá sa alikvotný objem dvojnásobne silného krycieho tlmivého roztoku (dodatok 4) a premieša sa.
   3. Použije sa 100 ěl alikvotného podielu pre každú z najmenej dvoch jamiek mikrotitračnej platne (napr. Nunc-Polysorp alebo ekvivalent) a inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C alebo cez noc pri teplote 4 °C.
   4. Extrakty z jamiek sa celkom odstránia. Jamky sa vymyjú trikrát fosfátovým tlmivým roztokom PBS-Tween (dodatok 4), pričom posledný premývací roztok sa v jamkách ponechá aspoň päť minút.
   5. Pripraví sa vhodné riedenie protilátok pre *R. solanacearum* v blokačnom (protilátkovom) tlmivom roztoku (dodatok 4). Pre validované komerčné protilátky sa použije odporučené riedenie (obyčajne s dvojnásobne vyššou koncentráciou, ako má titer).
   6. Pridá sa 100 µl do každej jamky a inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C.
   7. Z jamiek sa celkom odstráni protilátkový roztok a umyjú sa ako pri predchádzajúcom postupe (bod 4).
   8. Pripraví sa vhodné riedenie sekundárneho konjugátu alkalickej fosfatázy v blokačnom tlmivom roztoku. Pridá sa 100 µl do každej jamky a inkubuje sa jednu hodinu pri teplote 37 °C.
   9. Z jamiek sa celkom odstráni konjugátová protilátka a umyjú sa ako pri predchádzajúcom postupe (bod 4).
   10. Do každej jamky sa pridá 100 µl substrátového alkalického roztoku fosfatázy (dodatok 4). Inkubuje sa na tmavom mieste pri priaznivej teplote a absorbancia sa odčíta pri vlnovej dĺžke 405 nm v pravidelných intervaloch v rozsahu 90 minút.

b) Test DASI ELISA
   1. Pripraví sa primeraný roztok anti - *R. solanacearum* polyklonálnych imunoglobulínov v krycom tlmivom roztoku s pH 9,6 (dodatok 4). Pridá sa 200 µl do každej jamky. Inkubuje sa pri teplote 37 °C počas štyroch až piatich hodín alebo pri teplote 4 °C počas 16 hodín.
   2. Jamky sa umyjú trikrát tlmivým roztokom PBS-Tween (dodatok 4). Pridá sa 190 µl vzorkového extraktu do najmenej dvoch jamiek. Pridajú sa tiež pozitívne a negatívne kontroly do dvoch jamiek na každej platni. Inkubuje sa 16 hodín pri teplote 4 °C.
   3. Jamky sa umyjú trikrát tlmivým roztokom PBS-Tween (dodatok 4).
   4. Pripraví sa vhodné riedenie *R. solanacearum* – špecifické monokolónne protilátky v PBS (dodatok 4), ktoré tiež obsahujú 0,5 % albumínu hovädzieho séra (BSA), a pridá sa 190 µl do každej jamky. Inkubuje sa pri teplote 37 °C počas dvoch hodín.
   5. Jamky sa umyjú trikrát tlmivým roztokom PBS-Tween (dodatok 4).
   6. Pripraví sa vhodné riedenie protimyších imunoglobulínov konjugovaných s alkalickou fosfatázou v PBS. Pridá sa 190 µl do každej jamky. Inkubuje sa pri teplote 37 °C počas dvoch hodín.
   7. Jamky sa umyjú trikrát tlmivým roztokom PBS-Tween (dodatok 4).
   8. Pripraví sa substrátový alkalický roztok fosfatázy obsahujúci 1 mg p-nitrofenylfosfátu na 1 ml substrátového tlmivého roztoku (dodatok 4). Pridá sa 200 µl do každej jamky. Inkubuje sa na tmavom mieste pri priaznivej teplote a absorbancia sa odčíta pri vlnovej dĺžke 405 nm v pravidelných intervaloch v rozsahu 90 minút.

Vyhodnotenie výsledkov testu ELISA:
Test ELISA je negatívny, ak hodnota priemernej optickej denzity (O. D.) z jamiek s duplikátom vzorky je < 2x O. D. kontrolnej jamky negatívneho vzorkového extraktu pod podmienkou, že O. D. pre pozitívne kontroly je vyššia ako

1,0 (po 90 minútach inkubácie so substrátom) a je väčšia ako dvojnásobná O. D. získaná pre negatívne vzorkové extrakty.

Test ELISA je pozitívny, ak priemerné hodnoty O. D. z jamiek s duplikátom vzorky sú > 2x O. D. v jamke s negatívnym, vzorkovým extraktom pod podmienkou, že hodnoty O. D. vo všetkých jamkách s negatívnou kontrolou sú < 2x O. D. 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 k vzájomnej kontaminácii alebo k nešpecifickej protilátkovej väzbe.

9. Biotest

Predbežné testovanie touto metódou umožňuje reprodukovateľné zistenie 10^3 až 10^4 kolóniotvorných buniek *R. solanacearum* na 1 ml pridaných do vzorkových extraktov, ktoré boli v predchádzajúcich testoch negatívne (príprava v dodatku 3).

Najvyššiu citlivosť zistenia možno očakávať, ak sa použije čerstvo pripravený vzorkový extrakt a podmienky na optimálny rast. Metóda sa však môže úspešne použiť pri extraktoch, ktoré boli uskladnené s glycerínom pri teplote –68 až –86 °C.

Nasledujúci protokol vychádza z metódy podľa Jansea (1988):

9.1. Použije sa desať testovacích rastlín citlivého rajčiakového kultivaru (napr. Moneymaker alebo kultivar s rovnakou citlivosťou, aká bola určená v testujúcom laboratóriu) v rastovej fáze tretieho pravého listu pre každú vzorku. Podrobnosti o kultivácii sú uvedené v dodatku 8. Alternatívne sa použijú baklažány (napr. kultivar Black Beauty alebo kultivary s rovnakou vnímavosťou), použijú sa len rastliny v rastovej fáze druhého až tretieho pravého listu. Symptómy sa prejavujú ako menej závažné a ich vývoj v baklažáne je pomalší. Podľa možností sa preto odporúča použiť rajčiakové semenáče.

9.2. Medzi testované rastliny sa rozdelí 100 ěl vzorkového extraktu.

9.2.1. Naočkovanie injekčnou striekačkou
Stonky rastlín sa naočkujú presne nad klíčnymi listami pomocou injekčnej striekačky vybavenej hypodermickou ihlou (najmenej 23 G). Vzorkový extrakt sa rozdelí medzi testované rastliny.

9.2.2. Naočkovanie pozdĺžneho rezu
Rastlina sa uchopí medzi dva prsty a napipetuje sa kvapkou (asi 5 až 10 ěl) rozptýleného peletu na stonku medzi klíčne listy a prvý pravý list.
Skalpelom sa urobí do stonky priečny rez asi 1 cm dlhý, približne do hĺbky 2/3 hrúbky stonky, počnúc od kvapky rozptýleného peletu.
Rez sa uzavrie sterilnou vazelínou z injekčnej striekačky.

9.3. Rovnakým postupom sa naočkuje päť semenáčov s vodnou suspenziou 10^5 až 10^6 buniek na 1 ml pripravenou zo 48-hodinovej kultúry virulentného kmeňa biovaru 2 *R. solanacearum* ako pozitívnou kontrolou a s peletovým tlmivým roztokom (dodatok 4) ako negatívnou kontrolou. Oddelia sa rastliny s pozitívnou a negatívnou kontrolou od ostatných rastlín, aby nedochádzalo ku vzájomnej kontaminácii.

9.4. Testovacie rastliny sa pestujú v karanténnych zariadeniach najdlhšie štyri týždne pri teplote 25 až 30 °C a vysokej relatívnej vlhkosti s príslušným zalievaním, aby nedochádzalo k podmokaniu alebo vädnutiu v dôsledku nedostatku vody. Na zabránenie kontaminácii sa inkubujú rastliny s pozitívnou a negatívnou kontrolou na jasne oddelených častiach v skleníku alebo v miestnosti na pestovanie, alebo v obmedzenom priestore sa zabezpečí prísne oddelenie medzi jednotlivými postupmi. Ak musia byť rastliny na rôzne vzorky inkubované v tesnej blízkosti, oddelia sa vhodným spôsobom, ktorý zamedzí ich priamy kontakt. Pri prihnojovaní, zalievaní, kontrole a iných manipuláciách nesmie dôjsť k vzájomnej kontaminácii. Skleníky a miestnosti na pestovanie sa musia chrániť pred škodlivým hmyzom, ktorý môže preniesť baktériu zo vzorky na vzorku.
Pozorujú sa symptómy vädnutia, epinastie, chlorózy a zakrpatenia.

9.5. Izolujú sa bakteriálne kultúry z infikovaných rastlín (kapitola II.3.) a prečistené sa identifikujú ako predpokladaná kultúra *R. solanacearum* (kapitola VI. B).

9.6. Ak sa po troch týždňoch nepozorujú žiadne symptómy, uskutoční sa IF/PCR/izolácia na zmiešanej vzorke z 1 cm častí stonky každej testovanej rastliny, ktoré sa odoberú nad miestom očkovania. Ak je test pozitívny, vykoná sa riedenie na platni s rastovým médiom (kapitola 4.1.).

9.7. Určí sa každá vyčistená kultúra predpokladanej populácie *R. solanacearum* (kapitola VI. B).
Zhodnotenie výsledkov biotestu
Platné výsledky biotestu sa získajú, ak 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 *Ralsto-*

nia solanacearum sa zistí pri pozitívnych kontrolách.
Biotest je pozitívny, ak sú testované rastliny infikované baktériou *R. solanacearum*.

B. *IDENTIFIKAČNÉ TESTY*
Pomocou najmenej dvoch z nasledujúcich testov založených na rozličných biologických princípoch sa identifikujú čisté kultúry izolátov predpokladanej baktérie *R. solanacearum*.
V potrebných prípadoch sa pre každý uskutočňovaný test zahrnú známe referenčné kmene (dodatok 3).

1. Nutričné a enzymatické identifikačné testy
Určia sa nasledujúce fenotypické vlastnosti, ktoré sú všeobecne prítomné alebo neprítomné v *R. solanacearum*, na základe metód podľa Lelliotta a Steada (1987), Klementa *a kol.* (1990), Schaada (2001).

Test	Očakávaný výsledok
Produkcia fluoreskujúceho pigmentu	–
Prítomnosť poly-ß-hydroxybutyrátu	+
Oxidačno-fermentačný test (O/F)	O+/F-
Katalázova 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. Pripraví sa suspenzia približne z 10^6 buniek na 1 ml v tlmivom roztoku IF (dodatok 4).

2.2. Pripraví sa séria dvojnásobného riedenia príslušného antiséra.

2.3. Použie sa postup IF (kapitola VI.A.5.).

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

3. Test ELISA
Ak sa robia len dva identifikačné testy, k tejto metóde sa nepoužije žiadny dodatočný sérologicky test.

3.1. Pripraví sa suspenzia z približne 10^8 buniek na 1 ml v 1x STP (PBS) (tlmivý fosfátový pufor) (dodatok 4).

3.2. Uskutoční sa príslušný postup ELISA so špecifickou monoklonálnou protilátkou pre *Ralstonia solanacearum*.

3.3. Pozitívny test ELISA sa dosiahne, ak hodnota testu ELISA získaná pri kultúre testovanej vzorky je aspoň polovičná v porovnaní s hodnotou získanou pri pozitívnej kontrole.

4. Testy PCR

4.1. Pripraví sa suspenzia približne z 10^6 buniek na 1 ml ultračistej sterilnej vody (UPW).

4.2. Zahreje sa 100 ěl bunkovej suspenzie v uzavretých skúmavkách štyri minúty v termobloku alebo vo vriacom vodnom kúpeli pri teplote 100 °C. Vzorky možno následne uložiť pri teplote –16 až –24 °C.

4.3. Použije sa niektorý z odporučených postupov PCR na syntézu špecifických produktov PCR *Ralstonia solana-*

cearum [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. Pozitívna identifikácia *Ralstonia solanacearum* sa dosiahne, ak majú produkty PCR rovnakú veľkosť a rovnaké štiepne profily po restrikčnej analýze dĺžkového polymorfizmu (ďalej len „RFLP“) ako pozitívna kontrola.

5. Test FISH

5.1. Pripraví sa suspenzia približne z 10^6 buniek na 1 ml UPW.

5.2. Uskutočnia sa postupy FISH (kapitola VI.A.7.) s najmenej dvoma *R. solanacearum* špecifickými oligopróbami (dodatok 7).

5.3. Pozitívny test FISH sa dosiahne, ak sa rovnaké reakcie dosiahnu pri kultúre testovanej vzorky aj pri pozitívnej kontrole.

6. Analýza mastných kyselín (FAP)

6.1. Kultúra sa pestuje na tryptikázovom sójovom agare (Oxoid) 48 hodín pri teplote 28 °C.

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

6.3. Pozitívny test FAP sa dosiahne, 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 na charakterizáciu kmeňa

Charakterizácia kmeňa pomocou jednej z nasledujúcich metód sa odporúča pre každý nový prípad izolácie *Ralstonia solanacearum*.
V potrebných prípadoch sa zahrnú pre každý uskutočňovaný test známe referenčné kmene (dodatok 3).

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

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Použitie maltózy	–	+	+	–	+
Použitie laktózy	–	+	+	–	+
Použitie D (+) cellobiózy	–	+	+	–	+
Použitie manitu	–	–	+	+	+
Použitie sorbitu	–	–	+	+	–
Použitie dulcitu	–	–	+	+	–

Dodatočné testy diferencujú 2 subfenotypy 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)] Lelliot a Stead (1987).

7.2. Genomic fingerprinting
Molekulárna diferenciácia kmeňov v komplexe *R. solanacearum* sa dosiahne pomocou viacerých techník vrátane

7.2.1. analýzy polymorfizmu dĺžky reštrikčných 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 dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP) (Van der Wolf *a kol.*, 1998).

7.3. Metódy PCR
Špecifické primery PCR (Pastrik *a kol*, 2002; dodatok 6) možno použiť na diferenciáciu kmeňov patriacich do bodu 1 (biovary 3, 4 a 5) a bodu 2 (biovary 1, 2A a 2T) *R. solanacearum* na základe pôvodného členenia podľa analýzy RFLP (Cook *a kol.*, 1989) a 16S rDNA sekvenovania (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 *Ralstonia solanacearum*.

1. Pripraví sa očkovacia látka z približne 10^6 buniek na 1 ml z 24- až 28-hodinovej kultúry izolátu určeného na testovanie a príslušný kmeň *R. solanacearum* s pozitívnou kontrolou (napr. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; dodatok 3).
2. Naočkuje sa päť až desať vnímavých rajčinových alebo baklažánových semenáčov v rastovej fáze tretieho pravého listu (kapitola VI.A.9.).
3. Inkubuje sa najviac dva týždne pri teplote 25 až 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 *Ralstonia solanacearum*.
4. Pozorujú sa symptómy vädnutia, epinastie, chlorózy a zakrpatenia.
5. Zo symptomatických rastlín sa izoluje časť stopky asi 2 cm nad bodom očkovania. Rozptyľuje sa v malom množstve sterilnej destilovanej vody alebo 50 mM fosforečnanového tlmivého roztoku (dodatok 4). Izoluje sa zo suspenzie rozstreknutím alebo vstreknutím roztoku na vhodné živné médium preferenčne na selektívne médium (dodatok 2), inkubuje sa 48 až 72 hodín pri teplote 28 °C a pozoruje sa 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 Unitá 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 Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Španielsko
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Španielsko
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Švédsko

[1)] Kontaktní vedeckí odborníci.

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

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

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

Rozpustia sa prísady a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.
Kelmanovo tetrazoliové médium

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

Rozpustia sa prísady a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.
Ochladí sa na 50 °C a pridá sa filtrom sterilizovaný roztok 2,3,5-trifenyl tetrazolium chloridu (Sigma), aby sa dosiahla konečná koncentrácia 50 mg/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)	15,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

Rozpustia sa prísady a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.
Ochladí sa na 50 °C a pridajú sa filtrom sterilizované vodné zásobné roztoky nasledujúcich prísad, aby sa získali špecifické konečné koncentrácie:

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

1. Používanie iných reagencií, ako sú tie, ktoré sú špecifikované vyššie, môže ovplyvniť rast *R. solanacearum*.
2. Oxoid Agar #1 možno použiť namiesto Bacto-agaru (Difco). V takom prípade sa rast *R. solanacearum* spomalí, aj keď rast konkurenčných saprofytov sa môže tiež spomaliť. Typické kolónie *R. solanacearum* sa môžu formovať o 1 až 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/l môže zredukovať populácie konkurenčných baktérií bez toho, aby sa ovplyvnil rast *Ralstonia solanacearum*.

Médiá sa uskladnia a roztoky antibiotík sa uložia pri teplote 4 °C na tmavom mieste a použijú sa v priebehu jedného mesiaca.
Podložné sklíčka sa pred použitím zbavia povrchovej kondenzácie.
Treba sa vyhnúť priamemu vysušovaniu podložných sklíčok.
Kontrola kvality sa uskutoční po príprave každej novej dávky média platňovým testom suspenzie referenčnej kultúry *R. solanacearum* (dodatok 3) a pozorovaním vytvárania typických kolónií po inkubovaní pri teplote 28 °C dva až päť dní.

c) Validované obohacovacie médiá

Roztok SMSA (Elphinstone a kol., 1996)
Pripraví sa ako pre selektívne agarové médium, ale vynechá sa Bacto-agar a 2,3,5-tetrazolium chlorid.
Modifikovaný Wilbrinkov roztok (Caruso a kol., 2002)

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

Sterilizuje sa v autokláve pri teplote 121 °C počas 15 minút a ochladí sa na 50 °C.
Pridajú sa zásobné roztoky antibiotík 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 (tabuľka 1), alebo počas optimalizácie testov, aby nedošlo k 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 Bacteries Phytopathogenes (CFBP), INRA Station Phytobacteriologie, Angers, Francúzsko.

Tabuľka 1 Referenčný SMT panel izolátov *Ralstonia 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

*) Použije sa ako štandardný referenčný kmeň biovaru 2 *Ralstonia solanacearum* (rasa 3).

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

Tabuľka 2 Referenčný SMT panel sérologicky 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)] Potenciálne spriahnuto reagujúci kmeň pri sérologickom teste (IF a/alebo ELISA) s polyklonálnymi antisérami.
[2)] Kmeň, z ktorého sa môže amplifikovať v niektorých laboratóriách produkt PCR rovnakej veľkosti, aká sa očakáva pri použití špecifických primerov OLI-1 a Y-2 (dodatok 6).
[3)] Zjavne spôsobujúci spriahnutú 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.
Zmrazí sa vysušený pelet zemiakového extraktu z 200 zdravých zemiakových hľúz ako negatívna kontrola pre všetky testy.
Zmrazí sa 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 pozitívna kontrola pre sérologický test a test PCR. Keďže životnosť bunky sa počas zmrazovania a vysušovania narúša, nie sú to vhodné štandardné kontroly pre izolačné alebo biologické testy.
Vo formalíne fixované suspenzie biovaru 2 *R. solanacearum* (kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) s koncentráciou 10^6 buniek na 1 ml ako pozitívne kontroly pre sérologické testy.

B. Príprava pozitívnych a negatívnych kontrol pre skríningové testy výrezkov PCR/IF a FISH
Vyrobí sa 48-hodinová kultúra virulentného kmeňa *R. solanacearum* rasa 3/biovar 2 (napr. kmeň NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) na základnom médiu SMSA a suspenduje sa v 10 mM fosfátovom tlmivom roztoku, aby sa dosiahla koncentrácia buniek približne 2×10^8 na 1 ml. Toto sa obyčajne dosiahne prípravou slabo zakalenej suspenzie, ktorá je ekvivalentná s optickou denzitou 0,15 pri 600 nm.
Odstránia sa kužeľovité výrezky pupkových koncov z 200 hľúz pochádzajúcich z produkcie odrody s bielou šupkou, ktorá neobsahuje *R. solanacearum*.
Pupkové konce sa upravia ako obyčajne a pelet sa resuspenduje v 10 ml.
Pripraví sa 10 sterilných 1,5 ml mikroskúmaviek s 900 µl resuspendovaného peletu.
100 µl suspenzie R. *solanacearum* sa umiestni do prvej mikroskúmavky. Pretrepe sa.
Stanovia sa decimálne úrovne kontaminácie pomocou ďalšieho riedenia v ďalších piatich mikroskúmavkách.
Šesť kontaminovaných mikroskúmaviek sa použije ako pozitívne kontroly. Štyri nekontaminované mikroskúmavky sa použijú ako negatívne kontroly. Mikroskúmavky sa príslušne označia.

Pripraví sa alikvotný podiel 100 µl v sterilných mikroskúmavkách s objemom 1,5 ml a získa sa tak 9 replík každej kontrolnej vzorky. Uskladnia sa 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 sa uskutoční extrakcia DNA zo vzoriek pozitívnej a negatívnej kontroly pre každú sériu testovaných vzoriek.
Pre testy IF a FISH sa uskutočnia skúšky na vzorkách pozitívnej a negatívnej kontroly pre každú sériu testovaných vzoriek.
Pre skúšky IF, FISH a PCR sa *R. solanacearum* musí identifikovať prinajmenšom v riedeniach 10^6 a 10^4 buniek pozitívnych kontrol /ml a nesmie byť v žiadnej negatívnej kontrole.

Dodatok 4

Tlmivé roztoky pre testovacie postupy

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

1. Tlmivé roztoky k extrakčným postupom

1.1. Extrakčný tlmivý roztok (50 mM fosfátový tlmivý roztok, pH 7,0)
Tento tlmivý roztok sa používa na extrakciu baktérie z rastlinného tkaniva pomocou homogenizácie alebo pretrepaním.

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

Rozpustia sa prísady, skontroluje sa pH a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C počas 15 minút.
Dodatočné zložky môžu byť užitočné nasledujúcim spôsobom:

	Účel	Množstvo (na L)
Vločky Lubrol	antivločkovací prípravok *)	0,5 g
DC silicone antifoam (protipenový prípravok)	protipenové činidlo *)	1,0 ml
Tetrasodium pyrofosfát	antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	viazanie inhibítorov PCR	50 g

*) Na použitie pri homogenizačnej extrakčnej metóde.

1.2. Peletový tlmivý roztok (10 mM fosfátový tlmivý roztok, pH 7,2)
Tento tlmivý roztok sa používa pri resuspendácii a riedení extraktov výrezkov pupkových koncov zemiakových hľúz podľa koncentrácie do peletu pomocou odstreďovania.

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

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

2. Tlmivé roztoky pre test IF

2.1. Tlmivý roztok IF [10 mM fosfátový tlmivý roztok s NaCl (PBS), pH 7,2]
Tento tlmivý roztok sa používa na riedenie protilátok.

$Na_2HP_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilovaná voda	1,0 l

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

2.2. Tlmivý roztok IF-tween
Tento tlmivý roztok sa používa na umývanie podložných sklíčok.

Pridá sa 0,1 % tween 20 do tlmivého roztoku IF.

2.3. Glycerín tlmený fosfátom, pH 7,6
Tento tlmivý roztok sa používa ako krycia kvapalina v jamkách podložných sklíčok IF na podporu fluorescencie.

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

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

3. Tlmivé roztoky pre nepriamy test ELISA

3.1. Dvojnásobne silný krycí tlmivý roztok, pH 9,6

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

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

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

3.4. Blokačný (protilátkový) tlmivý roztok (musí byť čerstvo pripravený)

10X PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % tween 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

Zmieša sa a koncentrovanou HCl sa ustáli na pH 9,8.
Doplní sa destilovanou vodou na objem 1 litra.
Pridá sa 0,2 g $MgCl_2$.
V každých 15 ml roztoku sa rozpustia dve tablety s hmotnosťou 5 mg substrátovej fosfatázy (Sigma).

4. Tlmivé roztoky pre test DASI ELISA

4.1. Krycí tlmivý roztok, pH 9,6

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

Rozpustia sa prísady a skontroluje sa pH 9,6.

4.2. 10x roztok tlmený fosfátom (STP), pH 7,2 – 7,4

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

4.3. PBS-tween

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

4.4. Substrátový tlmivý roztok, pH 9,8

Dietanolamín	100 ml
Destilovaná voda	900 ml

Premieša sa a koncentrovanou HCl sa ustáli na pH 9,8.

Dodatok 5

Určovanie stupňa kontaminácie pri testoch IF a FISH

1. Vypočíta sa priemerný počet typických fluoreskujúcich buniek na zorné pole (c)
2. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek v jamke mikroskopického sklíčka (C)
   $C = c \times S/s$ kde S = povrchová plocha poľa viacjamkového podložného sklíčka
   s = povrchová plocha poľa objektívu:
   $s = \text{đi}^2/4G^2K^2$ 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. Vypočíta sa počet typických fluoreskujúcich buniek na 1 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 reagencie

Predbežné testovanie by malo umožniť reprodukovateľné stanovenie minimálne 10^3 až 10^4 buniek *Ralstonia solanacearum* na 1 ml vzorkového extraktu.

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

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

1.1. Primery

Forward primer OLI-1	5'- GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC - 3'
Reverse primer Y-2	5'- CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT - 3'

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z cieľovej DNA *R. solanacearum* = 288 bp.

1.2. Reakčná zmes PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	17,65 µl	
10xPCR tlm. Roztok [1] (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
d-NTP zmes (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1,0 µM
Primer OLI-2 (20 µM)	1,25 µl	1,0 µM
Taq polymeráza (5U/µl)[1]	0,1 µl	0,5 U
Objem vzorky	2,0 µl	
Celkový objem	25,0 µl	

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

1.3. Reakčné podmienky PCR
Spustí sa nasledujúci program:
1 cyklus: a) 2 minúty pri teplote 96 °C (denaturácia cieľovej DNA)
35 cyklov: b) 20 sekúnd pri teplote 94 °C (denaturácia cieľovej DNA)
c) 20 sekúnd pri teplote 64 °C (pripájanie primerov)
d) 30 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
1 cyklus: e) 10 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
f) drží sa pri teplote 4 °C
Tento program je optimalizovaný na použitie s termocyklérom Perkin Elmer 9600. Zmena v trvaní krokov cyklov b) až d) sa môže vyžadovať pri použití iných modelov.

1.4. Analýza RFLP
Produkty PCR amplifikované z DNA *Ralstonia solanacearum* tvoria po inkubácii pri teplote 37 °C s enzýmom *Ava II* fragmenty charakteristickej dĺžky.

2. Protokol PCR podľa Pastrika a Maissa (2000)

2.1. Oligonukleotidové primery

Forward primer Ps-1	5' - AGT CGA ACG GCA GCG GGG G - 3'
Reverse primer Ps-2	5' - GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA - 3'

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z cieľovej DNA *Ralstonia solanacearum* = 553 bp.

2.2. Reakčná zmes PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	16,025 µl	
10xPCR tlm.roztok[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 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.
Pôvodne optimalizované pre termocyklér MJ Research PTC 200 s Gibco Taq polymerázou.
Perkin Elmer AmpliTaq a tlmivý roztok sa môžu rovnako používať pri rovnakých koncentráciách.

2.3. Reakčné podmienky PCR
Spustí sa nasledujúci program:
1 cyklus: a) 5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)

35 cyklov: b) 30 sekúnd pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
c) 30 sekúnd pri teplote 68 °C (pripájanie primerov)
d) 45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
1 cyklus: e) 5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
f) drží sa pri teplote 4 °C

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

2.4. Analýza RFLP
Produkty PCR amplifikované z DNA *R. solanacearum* tvoria po inkubácii pri teplote 65 °C počas 30 minút s enzýmom *Taq I* charakteristické fragmenty, ktoré majú veľkosť 457 bp a 96 bp.

3. Protokol PCR s internou kontrolou PCR (Pastrik a kol., 2002)

3.1. Oligonukleotidové primery

Forward primer RS-1-F	5' - ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA - 3'
Reverse primer RS-1-R	5' - CCC AGT CAC GGC AGA GAC T - 3'
Forward primer NS-5-F	5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'
Reverse primer NS-6-R	5' - GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC - 3'

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z DNA *R. solanacearum* = 718 bp (RS-primery).
Predpokladaná veľkosť produktu PCR z 18S rRNA internej kontroly PCR = 310 bp (NS-primery).

3.2. Reakčná zmes PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	12,625 µl	
10xPCR tlm. roztok[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 PS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer PS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM)[2]	0,15 µl	0,06
Primer NS-6-R (10 µM)[2]	0,15 µl	0,06
Taq polymeráza (5U/ 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) (kapitola VI.A.6.1.a). Reoptimalizácia koncentrácií reagencií sa bude vyžadovať, ak sa použije extrakcia pretrepaním alebo iné metódy izolácie DNA.

3.3. Reakčné podmienky PCR
Spustí sa nasledujúci program:
1 cyklus: a) 5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
35 cyklov: b) 30 sekúnd pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
c) 30 sekúnd pri teplote 58 °C (pripájanie primerov)
d) 45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
1 cyklus: e) 5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
f) drží sa pri teplote 4 °C

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

3.4. Analýza. RFLP
Produkty PCR amplifikované z DNA *Ralstonia solanacearum* sa štiepia enzýmom *Bsm I* alebo jeho izoschizomérom (napr. Mva 1269 I) po inkubácii pri teplote 65 °C počas 30 minút na charakteristické fragmenty.

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

4.1. Oligonukleotidové primery

Forward primer Rs-1-F	5' - ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA - 3'
Reverse primer Rs-1-R	5' - CCC AGT CAC GGC AGA GAC T - 3'
Reverse primer Rs-3-R	5' - TTC ACG GCA AGA TCG CTC - 3'

Predpokladaná veľkosť produktu PCR z cieľovej DNA *Ralstonia 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 – špecifická PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	12,925 µl	
10x PCR tlmivý roztok[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)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Taq polymeráza (5U/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.

b) Biovar 3/4/5 – špecifická PCR

Činidlo	Množstvo na reakciu	Konečná koncentrácia
Sterilné UPW	14,925 µl	
10x PCR tlmivý roztok[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)	1,0 µl	0,4 µM
Primer RS-3-R (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Taq polymeráza (5U/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.

4.3. Reakčné podmienky PCR
Spustí sa nasledujúci program pre biovar 1/2- a biovar 3/4/5 – špecifické reakcie:
1 cyklus: a) 5 minút pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
35 cyklov: b) 30 sekúnd pri teplote 95 °C (denaturácia cieľovej DNA)
c) 30 sekúnd pri teplote 58 °C (pripájanie primerov)
d) 45 sekúnd pri teplote 72 °C (predlžovanie kópie)
1 cyklus: e) 5 minút pri teplote 72 °C (konečné predĺženie)
f) drží sa pri teplote 4 °C

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

4.4. Analýza RFLP
Produkty PCR amplifikované z DNA *Ralstonia solanacearum* pomocou primerov RS-1-F a RS-1-R tvoria charakteristické fragmenty s enzýmom *Bsm I* alebo s 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 nemajú reštrikčné miesto.

5. Príprava nanášacieho tlmivého roztoku

5.1. Bromfenolová modrá (10 % zásobný roztok)

Bromfenolová modrá	5 g
Destilovaná voda (bidest)	50 ml

5.2. Nanášací tlmivý roztok

Glycerín (86 %)	3,5 ml
Bromfenolová modrá (10 %)	300 µl
Destilovaná voda (bidest)	6,2 ml

6. 10x koncentrovaný Tris acetát EDTA (TAE) tlmivý roztok, pH 8,0

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

Zriedi sa na 1x pred použitím.
Komerčne je dostupný aj od dodávateľských firiem.

Dodatok 7

Validované reagenty pre FISH test

1. Oligopróby

Ralstonia solanacearum – špecifická próba OLI-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 MÁ TOXICKÉ ÚČINKY. JE POTREBNÉ NASADIŤ SI RUKAVICE A NEVDYCHOVAŤ. ODPORÚČAME PRACOVAŤ V DIGESTORE.]
a) Zahreje sa 9 ml vody molekulárneho gradientu [napr. ultra čistá voda (UPW)] na teplotu asi 60 °C a pridá sa 0,4 g paraformaldehydu. Paraformaldehyd sa rozpúšťa po pridaní piatich kvapiek 1N NaOH a miešaním s magnetickým miešadlom.
b) Upraví sa pH na 7,0 pridaním 1 ml 0,1M fosfátového tlmivého roztoku (PB; pH 7,0) a päť kvapiek 1N HCl. Skontroluje sa pH pomocou indikátorových pásikov a podľa potreby sa upraví pomocou HCl alebo NaOH. [UPOZORNENIE! NESMIE SA POUŽÍVAŤ pH METER V ROZTOKOCH S PARAFORMALDEHYDOM.]
c) Roztok sa prefiltruje cez 0,22 µm membránový filter, zamedzí sa prístupu prachu a uloží sa 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

Zriedi sa na 1x, ako sa vyžaduje.

4. Hybridizačný roztok

1x Hybmix	
Sódium dodecyl sulfát (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %
Probe EUB 338	5 ng/µl
Próba CMSCY301	5 ng/µl

Pripravia sa množstvá hybridizačného roztoku na základe výpočtov v tabuľke. Pre každé podložné sklíčko (obsahujúce dve rôzne vzorky dvojmo) treba 90 ěl hybridizačného roztoku. DÔLEŽITÉ: FORMAMID JE VEĽMI TOXICKÝ, PRETO JE POTREBNÉ NASADIŤ SI RUKAVICE A VYKONAŤ VŠETKY POTREBNÉ PREVENTÍVNE OPATRENIA!

Tabuľka: Navrhované množstvá na prípravu hybridizačnej zmesi

Počet podložných sklíčok	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

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

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

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

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

Dodatok 8

Pestovanie baklažánu a rajčiaka

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

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

ČASŤ G

UCHOVÁVANIE A SKLADOVANIE VZORIEK

1. Pri každom podozrivom výskyte získanom z výsledkov skríningového testu, vykonaného podľa postupu uvedeného v častiach A až F, pred ukončením uvedenej metódy na potvrdenie alebo vyvrátenie výskytu sa do dokončenia tejto metódy uchovajú alebo primerane zakonzervujú
   – všetky hľuzy zemiakov, a ak je to možné, všetky testované rastliny,
   – všetky zostávajúce extrakty a dodatočný pripravený materiál pre skríningové testy, napríklad imunofluorescenčné podložné sklíčka, a
   – celá príslušná dokumentácia.

   Zadržanie zemiakových hľúz umožní v potrebných prípadoch uskutočniť rôzne testy.
2. Pri pozitívnom potvrdení *Ralstonia solanacearum* sa počas minimálne jedného mesiaca po oznámení postupu podľa § 5 ods. 2 a 3 zadržia alebo primeraným spôsobom zachovajú
   – materiály uvedené v odseku 1,
   – vzorka infikovaných rastlín rajčiaka alebo baklažánu naočkovaných extraktom z hľúz alebo rastlín a
   – izolovaná kultúra *Ralstonia solanacearum*.

Príloha č. 3 k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

MIESTA ODBERU VZORIEK NA POTVRDENIE ZDROJA A ROZSAHU KONTAMINÁCIE

Zisťovanie podľa § 5 ods. 1 písm. a) prvého bodu zahŕňa:

a) miesta produkcie,
   1. kde sa pestujú alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, pri ktorých sa potvrdilo napadnutie hnedou hnilobou,
   2. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky pochádzajúce z rovnakého zdroja ako rajčiaky, pri ktorých sa potvrdilo napadnutie hnedou hnilobou,
   3. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky, pri ktorých je nebezpečenstvo pravdepodobnej kontaminácie hnedou hnilobou,
   4. kde sa pestujú alebo sa pestovali zemiaky, ktoré sú klonovo príbuzné so zemiakmi, ktoré boli pestované na miestach produkcie označených za kontaminované hnedou hnilobou,
   5. kde sa pestujú alebo sa pestovali rajčiaky alebo zemiaky, ktoré sa nachádzajú v susedstve kontaminovaných miest produkcie vrátane tých, kde boli priamo alebo prostredníctvom spoločného zmluvného partnera používané poľnohospodárske stroje alebo zariadenia,
   6. na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou,
   7. na ktorých bola na zavlažovanie alebo postrekovanie používaná povrchová voda zo zdrojov používaných aj miestami produkcie, pri ktorých bola dokázaná kontaminácia hnedou hnilobou alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou,
   8. ktoré sú zaplavené alebo boli zaplavené povrchovými vodami, pri ktorých sa potvrdilo, že sú kontaminované hnedou hnilobou alebo pri ktorých existuje podozrenie na kontamináciu hnedou hnilobou,
b) povrchovú vodu používanú na zavlažovanie alebo postrekovanie polí a miesta produkcie, pri ktorých bola potvrdená kontaminácia hnedou hnilobou alebo ktorá tieto polia a miesta produkcie zaplavila.

Príloha č. 4 k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.

PODROBNOSTI NA STANOVENIE PRAVDEPODOBNEJ KONTAMINÁCIE A MOŽNÉHO ŠÍRENIA HNEDEJ HNILOBY

1. Pri určení pravdepodobného rozsahu kontaminácie podľa § 5 ods. 1 písm. a) tretieho bodu a písm. c) tretieho bodu sa prihliada na

1.1. rastlinný materiál pestovaný na mieste produkcie, ktoré bolo podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označené za kontaminované,

1.2. miesta produkcie výrobným spôsobom spojené s hľuzami alebo rastlinami označenými podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu za kontaminované vrátane tých, ktoré s nimi používajú spoločnú mechanizáciu alebo výrobné zariadenia, a to buď priamo, alebo prostredníctvom spoločného dodávateľa,

1.3. rastlinný materiál vypestovaný v miestach produkcie, ktoré sa uvádzajú v bode 1.2. alebo ktorý sa nachádzal na takých miestach produkcie v období, keď sa v budovách alebo na mieste produkcie nachádzali hľuzy alebo rastliny označené podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu za kontaminované,

1.4. priestory, v ktorých sa manipulovalo s rastlinným materiálom z miest produkcie uvedených v bodoch 1.1. až 1.3.,

1.5. všetky strojové zariadenia, vozidlá, lode, skladovacie priestory alebo ich časti a akékoľvek iné predmety vrátane obalového materiálu, ktoré mohli prísť do styku s rastlinným

materiálom, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označený za kontaminovaný,

1.6. akýkoľvek rastlinný materiál, ktorý bol v styku so zariadeniami alebo s objektmi uvedenými v bode 1.5. alebo v nich bol uskladnený pred ich dezinfekciou alebo vyčistením,

1.7. v dôsledku zisťovania a testov podľa § 5 ods. 1 písm. a) prvého bodu v prípade zemiakov tie hľuzy alebo rastliny, ktoré majú súrodenecký alebo rodičovský klonový vzťah k rastlinnému materiálu, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označený za kontaminovaný, a pri rajčiakoch tie rastliny, ktoré pochádzajú z rovnakého osiva ako daný rastlinný materiál a pri ktorých je i pri negatívnom výsledku na základe klonovej príbuznosti kontaminácia pravdepodobná; testovanie odrôd sa môže uskutočniť, aby sa overila identita kontaminovaných a klonovo príbuzných hľúz alebo rastlín,

1.8. miesta produkcie rastlinného materiálu uvedeného v bode 1.7.,

1.9. miesta produkcie rastlinného materiálu, na ktorom sa na zavlažovanie alebo postrekovanie používala voda, ktorá bola podľa § 5 ods. 1 písm. c) druhého bodu označená za kontaminovanú,

1.10. rastlinný materiál vyprodukovaný na poliach, ktoré boli zaplavené povrchovou vodou, v ktorej sa dokázala kontaminácia hnedou hnilobou.

2. Pri stanovení pravdepodobného rozšírenia podľa § 5 ods. 1 písm. a) štvrtého bodu a písm. c) tretieho bodu sa prihliada

a) v prípadoch podľa § 5 ods. 1 písm. a) štvrtého bodu na

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

2. bežnú produkciu a použitie porastov sadivových zemiakov,

3. miesta produkcie, na ktorých sa 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 § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označené za kontaminované,

b) v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú podľa § 5 ods. 1 písm. c) druhého bodu na

1. miesta produkcie, kde sa rastlinný materiál pestuje v priľahlých oblastiach k povrchovej vode označenej za kontaminovanú, alebo ktoré môžu byť touto povrchovou vodou zaplavené,

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

3. 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 podľa § 5 ods. 2 musí obsahovať:

3.1. okamžite po potvrdení prítomnosti hnedej hniloby laboratórnymi testami pomocou metód uvedených v prílohe č. 2 minimálne

3.1.1. pre zemiaky

a) názov odrody danej partie,

b) typ (sadivové, konzumné a pod.), a ak je to potrebné, kategóriu sadivových zemiakov,

3.1.2. pre rastliny rajčiakov názov odrody danej partie, a ak je to potrebné, kategóriu,

3.2. pri riziku kontaminácie rastlinného materiálu pochádzajúceho z iného členského štátu alebo z vývozu do iného členského štátu, kde sa potvrdil výskyt, najmä

a) názov odrody danej partie zemiakov alebo rajčiakov,

b) názov a adresu odosielateľa a príjemcu,

c) dátum doručenia partie zemiakov alebo rajčiakov,

d) objem doručenej partie zemiakov alebo rajčiakov,

e) kópiu rastlinného pasu alebo minimálne číslo rastlinného pasu, a ak je to potrebné, registračné číslo pestovateľa alebo obchodníka a kópiu oznámenia o doručení.

Tieto údaje sa bezodkladne oznámia príslušnému členskému štátu podľa § 5 ods. 3.

Požiadavky na oznámenie podozrenia na výskyt uvedené v § 4 ods. 3 týmto nie sú dotknuté.

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

4. Podrobnosti dodatočného oznámenia podľa § 5 ods. 2 po ukončení všetkých zisťovaní zahŕňajú:

4.1. dátum, kedy sa kontaminácia potvrdila,

4.2. stručný opis zisťovania, ktoré prebehlo s cieľom určiť zdroj a možné rozšírenie kontaminácie vrátane uskutočnenej úrovni odberu vzoriek,

4.3. informácie o zistených alebo predpokladaných zdrojoch kontaminácie,

4.4. podrobné informácie o rozsahu označenej kontaminácie vrátane počtu miest produkcie a pri zemiakoch počtu partií s označením odrody a pri sadivových zemiakoch s označením kategórie,

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

4.6. podrobné informácie o označení vody vrátane názvu a lokality vodného útvaru a rozsahu zákazu zavlažovania,

4.7. pre každú zásielku alebo partiu rajčiakov označenú za kontaminovanú osvedčenia a číslo rastlinného pasu materiálu podľa osobitného predpisu,[1])

4.8. iné údaje tykajúce sa potvrdeného výskytu hnedej hniloby, ktoré môže Komisia požadovať.

Príloha č. 5 k nariadeniu vlády č. 66/2004 Z. z.
OPATRENIA PROTI ŠÍRENIU HNEDEJ HNILOBY

1. Opatrenia podľa § 6 ods. 1 písm. a) vykonané pod dohľadom kontrolného ústavu pre kontaminované hľuzy alebo rastliny zahŕňajú:

1.1. použitie ako krmivo pre zvieratá po tepelnom spracovaní, ktoré vylučuje nebezpečenstvo prežitia hnedej hniloby, alebo

1.2. zneškodnenie na úradne schválených skládkach odpadu, pri ktorých neexistuje žiadne nebezpečenstvo úniku hnedej hniloby do prostredia, napr. priesakom na poľnohospodársky využívané plochy alebo do vodných zdrojov, ktoré sa využívajú na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy, alebo

1.3. spálenie, alebo

1.4. priemyselné spracovanie, a to priamou a bezprostrednou dodávkou spracovateľskému závodu vybavenému úradne schválenými zariadeniami odpadového hospodárstva, pre

ktoré sa stanovilo, že neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby a ktoré je vybavené systémom čistenia a dezinfekcie minimálne odchádzajúcich vozidiel, alebo

1.5. iné opatrenia, ak preukázateľne neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby; také opatrenia a ich odôvodnenie sa bezodkladne oznámia Komisii a ostatným členským štátom.

Odpad, ktorý vznikol na základe jednej z uvedených možností, sa zneškodní úradne schválenými metódami podľa bodu 5.

2. Za vhodné využitie alebo zneškodnenie pravdepodobne kontaminovaného rastlinného materiálu sa podľa § 6 ods. 1 písm. b) pod dohľadom kontrolného ústavu pri vzájomnom informovaní zodpovedných orgánov členských štátov s cieľom zabezpečiť dohľad v ktoromkoľvek okamihu a so súhlasom zodpovedného orgánu[2]) členského štátu, v ktorom sa zemiaky majú baliť alebo spracúvať v zariadeniach na zneškodňovanie odpadu uvedených v bodoch 2.1.1. a 2.1.2., považuje:

2.1. v prípade zemiakových hľúz

2.1.1. použitie ako konzumných zemiakov už zabalených na priame doručenie a použitie bez opätovného balenia v mieste s vhodným odpadovým hospodárstvom; so zemiakmi pestovanými na sadivo sa môže manipulovať len na rovnakom mieste, ak sa tak robí oddelene alebo po čistení a dezinfekcii, alebo

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

2.1.3. iné využitie alebo zneškodnenie po schválení kontrolným ústavom, ak preukázateľne neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby,

2.2. v prípade iných častí rastlín vrátane stoniek a listového odpadu

2.2.1. zničenie alebo

2.2.2. iné využitie alebo zneškodnenie po schválení kontrolným ústavom, ak preukázateľne neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby.

3. Medzi vhodné metódy dekontaminácie predmetov podľa § 6 patrí čistenie alebo dezinfekcia, aby bolo zabezpečené, že neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby; používajú sa pod dohľadom kontrolného ústavu.

4. Opatrenia v rámci bezpečnostného pásma vyznačeného podľa § 5 ods. 1 písm. a) štvrtého bodu a písm. c) tretieho bodu zahŕňajú:

4.1. v prípadoch, keď miesta produkcie boli označené za kontaminované podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu

4.1.1. na kontaminovanom pozemku, ktorý bol podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označený za kontaminovaný, buď

4.1.1.1. minimálne počas štyroch rokov nasledujúcich po roku označenia kontaminácie

4.1.1.1.1. opatrenia na likvidáciu samovýsadby alebo samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burín z čeľade ľuľkovitých, a

4.1.1.1.2. vynechanie výsadby alebo výsevu

4.1.1.1.2.1. hľúz alebo rastlín zemiakov, alebo pravého osiva,

4.1.1.1.2.2. rastlín rajčiakov a osiva rajčiaka,

4.1.1.1.2.3. prihliadajúc na biológiu hnedej hniloby,

4.1.1.1.2.3.1 iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby,

.

4.1.1.1.2.3.2 rastlinných druhov z rodu Brassica, pri ktorých preukázateľne existuje
. nebezpečenstvo prežívania hnedej hniloby,

4.1.1.1.2.4. plodín, pri ktorých preukázateľne existuje nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby,

4.1.1.1.3. v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po období uvedenom v bode 4.1.1.1. a pod podmienkou, že pozemok bol minimálne počas dvoch pestovateľských rokov pred rokom vysadenia bez rastlín zemiakov alebo rajčiakov vyrastených zo samovýsadby alebo samovýsevu, ako aj bez iných hostiteľských rastlín vrátane burín z čeľade ľuľkovitých,

4.1.1.1.3.1. v prípade zemiakov sa povoľuje len produkcia konzumných zemiakov,

4.1.1.1.3.2. v prípade zemiakov a rajčiakov vykonanie prieskumu, odber vzoriek a testovanie podľa prílohy č. 2,

4.1.1.1.4. vo vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po vegetačnom období uvedenom v bode 4.1.1.1.3. pri dodržaní vhodného osevného postupu, ktoré trvá najmenej dva roky, ak sa majú pestovať sadivové zemiaky, sa vykoná prieskum podľa § 3 ods. 1, alebo

4.1.1.2. počas piatich pestovateľských rokov nasledujúcich po roku označenia pozemkov za kontaminované

4.1.1.2.1. opatrenia na likvidáciu samovýsadby alebo samovýsevu rastlín zemiakov a rajčiakov, ako aj iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby vrátane burín z čeľade ľuľkovitých, a

4.1.1.2.2. počas prvých troch rokov tohto obdobia čierny úhor alebo pestovanie obilnín, alebo trvalý pasienok s častým kosením alebo intenzívnym spásaním, alebo pestovanie tráv s cieľom získať semennú produkciu, po ktorých nasledujú dva roky pestovania nehostiteľských rastlín, ktoré nepredstavujú žiadne nebezpečenstvo prežitia alebo rozširovania hnedej hniloby,

4.1.1.2.3. v prvom vegetačnom období zemiakov a rajčiakov nasledujúcom po období uvedenom v bode 4.1.1.2.2. a pod podmienkou, že pozemok bol minimálne počas dvoch pestovateľských po sebe nasledujúcich rokov pred rokom vysadenia bez rastlín zemiakov alebo rajčiakov vyrastených zo samovýsadby alebo samovýsevu, ako aj bez iných hostiteľských rastlín vrátane burín z čeľade ľuľkovitých,

4.1.1.2.3.1. v prípade zemiakov sa povoľuje pestovanie sadivových alebo konzumných zemiakov,

4.1.1.2.3.2. v prípade zemiakov a rajčiakov vykonanie prieskumu, odber vzoriek a testovanie podľa prílohy č. 2,

4.1.2. na ostatných pozemkoch a pod podmienkou, že nebezpečenstvo samovysadených rastlín zemiaka, rajčiaka a ďalších hostiteľských rastlín vrátane burín z čeľade ľuľkovitých bolo eliminované

4.1.2.1. v pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie

4.1.2.1.1. buď vynechať výsadbu zemiakových hľúz alebo pravých semien zemiaka alebo iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby, alebo

4.1.2.1.2. sa môžu vysádzať len certifikované sadivové zemiaky určené len na konzumnú spotrebu,

4.1.2.1.3. sa môžu sadiť v rámci ovocinárskej produkcie rastliny rajčiakov pestované z osiva, ktoré spĺňa požiadavky osobitného predpisu,[1])

4.1.2.2. v druhom pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie

4.1.2.2.1. sa môžu sadiť len certifikované sadivové zemiaky, ktoré boli úradne testované na neprítomnosť hnedej hniloby a pestované pod kontrolou na miestach produkcie iných ako tie, ktoré sa uvádzajú v bode 4.1, určené buď na produkciu sadivových alebo konzumných zemiakov,

4.1.2.2.2. sa môžu pestovať v rámci rastlinnej alebo ovocinárskej produkcie len rastliny rajčiakov z osiva, ktoré spĺňa požiadavky osobitného predpisu,[3]) alebo pri vegetatívnom rozmnožovaní z rastlín rajčiakov vypestovaných z takého osiva a pestujú sa pod kontrolou na miestach produkcie iných, ako je uvedené v bode 4.1,

4.1.2.3. minimálne v treťom pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie

4.1.2.3.1. sa môžu sadiť len certifikované sadivové zemiaky alebo sadivové zemiaky vypestované pod kontrolou z certifikovaných sadivových zemiakov, určené buď na produkciu sadivových, alebo konzumných zemiakov,

4.1.2.3.2. sa môžu pestovať v rámci rastlinnej alebo ovocinárskej produkcie len rastliny rajčiakov z osiva, ktoré spĺňa požiadavky osobitného predpisu,[3]) alebo rastliny rajčiakov vypestovaných pod kontrolou z takých rastlín,

4.1.2.4. v každom pestovateľskom roku, ktorý sa uvádza v bodoch 4.1.2.1. až 4.1.2.3., sa prijmú opatrenia na likvidáciu samovysadených rastlín zemiakov a iných hostiteľských rastlín hnedej hniloby a vykoná sa prieskum, odber vzoriek a ich testovanie podľa prílohy č. 2,

4.1.3. ihneď po označení kontaminácie podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu a po prvom pestovateľskom roku nasledujúcom po roku označenej kontaminácie

4.1.3.1. vykonať riadne vyčistenie a dezinfekciu všetkých strojov a skladovacích zariadení nachádzajúcich sa na mieste produkcie, ktoré sa používajú pri produkcii zemiakov alebo rajčiakov, podľa tretieho bodu,

4.1.3.2. vykonať kontroly zavlažovacích a postrekových programov, prípadne vyhlásenie zákazu zavlažovania a postrekovania s cieľom zabrániť šíreniu hnedej hniloby,

4.1.4. v mieste produkcie, ktoré bolo podľa § 5 ods. 1 písm. a) druhého bodu označené za kontaminované a pri ktorom je možná úplná výmena pestovateľského substrátu

4.1.4.1. sa nesmú vysádzať žiadne hľuzy alebo rastliny zemiakov, alebo pravé semená, alebo iné hostiteľské rastliny hnedej hniloby vrátane rastlín rajčiakov a výsevu semien rajčiakov dovtedy, kým sa miesto produkcie pod dohľadom kontrolného ústavu nepodrobí opatreniam na zničenie hnedej hniloby a odstráneniu akéhokoľvek materiálu hostiteľských rastlín vrátane aspoň jednej úplnej výmeny pestovateľského substrátu, vyčistenia a dezinfekcie miesta produkcie a všetkého vybavenia bez udelenia súhlasu na pestovanie zemiakov a rajčiakov, a

4.1.4.2. produkcia zemiakov sa musí uskutočňovať z certifikovaného zemiakového sadiva alebo z minihľúz, alebo z minirastlín pochádzajúcich z testovaných zdrojov,

4.1.4.3. produkcia rajčiakov sa uskutočňuje z osiva, ktoré spĺňa požiadavky osobitného predpisu,[3]) alebo pri vegetatívnom rozmnožovaní z rastlín rajčiakov takého osiva a pestuje sa pod kontrolou,

4.1.4.4. kontroly zavlažovacích a postrekových programov, prípadne vyhlásenie zákazu zavlažovania a postrekovania s cieľom zabrániť šíreniu hnedej hniloby,

4.2. v rámci vyznačeného bezpečnostného pásma, bez toho, aby boli dotknuté opatrenia uvedené v bode 4.1., opatrenia, ktoré vykonáva kontrolný ústav podľa osobitného predpisu,[3])

4.2.1. ihneď po označení kontaminácie zabezpečiť vyčistenie a dezinfekciu všetkých strojov a skladovacích priestorov, ktoré sa používajú pri výrobe rajčiakov alebo zemiakov, s použitím príslušných metód uvedených v bode 3,

4.2.2. bezprostredne po označenej kontaminácii a v priebehu najmenej troch vegetačných období nasledujúcich po nej

4.2.2.1. v prípadoch, keď bolo bezpečnostné pásmo vymedzené podľa § 5 ods. 1 písm. a) štvrtého bodu

4.2.2.1.1. zabezpečiť dozor nad podnikmi, ktoré pestujú zemiaky a skladujú zemiakové hľuzy alebo rajčiaky a manipulujú s nimi, ako aj nad podnikmi poskytujúcimi zemiakarsku alebo rajčiakovú mechanizáciu dodávateľským spôsobom,

4.2.2.1.2. vyžadovať, aby v takomto bezpečnostnom pásme boli všetky porasty zemiakov vysádzané výlučne z certifikovaného sadiva, alebo aby bolo používané sadivo vypestované pod úradným dohľadom a aby sadivové zemiaky, ktoré boli pestované na miestach produkcie, ktoré boli podľa § 5 ods. 1 písm. a) bodu 3 označené za pravdepodobne kontaminované, boli po zbere testované,

4.2.2.1.3. vyžadovať osobitnú manipuláciu s uskladnenými sadivovými zemiakmi a konzumnými zemiakmi vo všetkých priestoroch alebo systém čistenia a dezinfekciu, ktorá sa uskutoční medzi manipuláciou so sadivovými a konzumnými zemiakmi,

4.2.2.1.4. požadovať pestovanie len rajčiakových rastlín pestovaných z osiva, ktoré spĺňa požiadavky osobitného predpisu,[3]) alebo pri vegetatívnom rozmnožovaní z rastlín rajčiakov takého osiva pestovaného pod kontrolou,

4.2.2.1.5. podľa § 2 ods. 1 vykonávať prieskumy

4.2.2.2. v prípadoch, keď bola povrchová voda označená za kontaminovanú podľa § 5 ods. 1 písm. c) druhého bodu, alebo keď sa na povrchovú vodu prihliada pri stanovení možného šírenia hnedej hniloby podľa prílohy č. 4 bodu 2,

4.2.2.2.1. uskutočniť každoročný prieskum vrátane odberu vzoriek povrchovej vody a hostiteľských rastlín z čeľade ľuľkovitých v príslušných vodných zdrojoch a testovanie v súlade s prílohou č. 2,

4.2.2.2.2. zaviesť 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 rozširovaniu hnedej hniloby; tento zákaz sa môže následne prehodnotiť na základe výsledkov každoročného prieskumu,

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

4.2.3. v priebehu primeraného obdobia a podľa potreby zaviesť program výmeny všetkých sadivových zemiakov.

5. S cieľom predísť akémukoľvek nebezpečenstvu rozširovania hnedej hniloby úradne schválené metódy zneškodnenia odpadu materiálu uvedeného v bode 1 musia spĺňať nasledujúce podmienky:

5.1. odpad zo zemiakov a rajčiakov (vrátane vyradených zemiakov, šúp a rajčiakov) a iný pevný odpad súvisiaci so zemiakmi a s rajčiakmi (vrátane pôdy, kameňov a iného odpadového materiálu) sa musí zneškodniť

5.1.1. zneškodnením na úradne schválenej skládke odpadu, na ktorej neexistuje žiadne nebezpečenstvo úniku hnedej hniloby do prostredia, napr. priesakom do poľnohospodárskej pôdy alebo kontaktom s vodnými zdrojmi, ktoré by sa mohli využívať na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy; odpad sa musí prepraviť priamo na skládku, pričom sa musí kontrolovať, aby nevzniklo nebezpečenstvo straty odpadu, alebo

5.1.2. spálením, alebo

5.1.3. iným spôsobom za predpokladu, že neexistuje žiadne nebezpečenstvo rozširovania hnedej hniloby; tieto opatrenia sa musia oznámiť Komisii a členským štátom,

5.2. tekutý odpad, ktorý obsahuje nerozpustné tuhé látky, sa musí pred zneškodnením prefiltrovať alebo nechať sedimentovať, aby sa odstránili tieto pevné látky; pevné látky sa zneškodňujú tak, ako je uvedené v bode 5.1. Tekutý odpad sa musí

5.2.1. pred zneškodnením celý zahriať minimálne na 60 °C počas 30 minút alebo

5.2.2. zneškodniť iným spôsobom, ktorý je úradne schválený a pod úradnou kontrolou, aby nevzniklo žiadne nebezpečenstvo, že odpad by mohol prísť do styku s poľnohospodárskou pôdou alebo vodnými zdrojmi, ktoré by sa mohli využívať na zavlažovanie poľnohospodárskej pôdy; podrobnosti o tomto spôsobe sa musia oznámiť ostatným členským štátom a Komisii.

Možnosti uvedené v tejto prílohe sa uplatňujú aj na odpad súvisiaci s manipuláciou a so spracovaním kontaminovaných partií.

Príloha č. 6 k nariadeniu vlády č. 66 /2004 Z. z.
ZOZNAM PREBERANÝCH PRÁVNYCH AKTOV EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV

1. Smernica Rady 98/57/ES z 20. júla 1998 o potláčaní choroby Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. (Mimoriadne vydanie Ú. v. EÚ, kap. 3/zv. 23).
2. 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. (Úradný vestník Európskych spoločenstiev L 206, 27. 7. 2006).“.

Čl. II

Toto nariadenie vlády nadobúda účinnosť 1. apríla 2007.

Robert Fico v. r.

1) § 10 ods. 2 písm. d) a príloha č. 5 časť A nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 199/2005 Z. z. o ochranných opatreniach proti zavlečeniu a rozširovaniu organizmov škodlivých pre rastliny alebo rastlinné produkty v znení nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 245/2006 Z. z.

1) Nariadenie vlády Slovenskej republiky č. 199/2005 Z. z. v znení nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 245/2006 Z.z.

2) § 2 písm. c) nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 199/2005 Z. z. v znení nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 245/2006 Z.z.

3) § 25 zákona č. 193/2005 Z. z. o rastlinolekárskej starostlivosti.

Vydavateľ Zbierky zákonov Slovenskej republiky a prevádzkovateľ právneho a informačného portálu Slov-Lex dostupného na webovom sídle www.slov-lex.sk je Ministerstvo spravodlivosti Slovenskej republiky, Župné námestie 13, 813 11 Bratislava, tel.: 02 571 01 000, e-mail: helpdesk@slov-lex.sk.