



# MONITORUL OFICIAL

## AL

### ROMÂNIEI

Anul 175 (XIX) — Nr. 524

PARTEA I  
LEGI, DECRETE, HOTĂRĂRI ȘI ALTE ACTE

Joi, 2 august 2007

#### SUMAR

<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>	<u>Nr.</u>	<u>Pagina</u>
<b>HOTĂRĂRI ALE GUVERNULUI ROMÂNIEI</b>			
718.	— Hotărâre privind aprobarea Acordului dintre Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare, semnat la București la 21 decembrie 2006, pentru aplicarea Convenției dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnată la București la 27 aprilie 2004.....	2	
Acord între Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare pentru aplicarea Convenției dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnată la București la 27 aprilie 2004.....			
747.	— Hotărâre privind reglementarea acțiunilor specifice aferente finanțării asistenței din cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare .....	8–11	
<b>ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE</b>			
586.	— Ordin al ministrului agriculturii și dezvoltării rurale privind controlul bacteriei <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al. ....	12–46	
762.	— Ordin al ministrului economiei și finanțelor privind modificarea Instrucțiunilor pentru stabilirea procedurii privind efectuarea operațiunilor necesare pentru		
			finanțarea de la bugetul de stat în cazul indisponibilității temporare a contribuției financiare a Comunității Europene și în cazul compensărilor efectuate de Comisia Europeană, precum și pentru tratamentul dobânzii acumulate în conturile bancare ale Fondului Național în cadrul programelor ISPA, aprobate prin Ordinul ministrului finanțelor publice nr. 296/2007 .....
		832/1.215/347/146.	— Ordin al ministrului agriculturii și dezvoltării rurale, al ministrului sănătății publice, al președintelui Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor și al președintelui Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor privind modificarea anexei nr. 2 la Normele cu privire la natura, conținutul, fabricarea, calitatea, ambalarea, etichetarea, marcarea și păstrarea sucurilor de legume, aprobate prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor, al ministrului sănătății și familiei și al președintelui Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor nr. 359/671/137/2002 .....
		1.252.	— Ordin al ministrului sănătății publice privind stabilirea cuantumului sumei de participare la concursul organizat pentru ocuparea postului de manager general, persoană fizică, din serviciile de ambulanță județene și al municipiului București .....
			46–47
			47
			48

**HOTĂRÂRI ALE GUVERNULUI ROMÂNIEI****GUVERNUL ROMÂNIEI****HOTĂRÂRE****privind aprobarea Acordului dintre Guvernul României  
și Guvernul Republicii Ungare, semnat la București  
la 21 decembrie 2006, pentru aplicarea Convenției  
dintre România și Republica Ungară  
privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar,  
semnată la București la 27 aprilie 2004**

În temeiul art. 108 din Constituția României, republicată, și al art. 20 din Legea nr. 590/2003 privind tratatele,

**Guvernul României** adoptă prezenta hotărâre.

Articol unic. — Se aprobă Acordul dintre Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare, semnat la București la 21 decembrie 2006, pentru aplicarea Convenției dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnată la București la 27 aprilie 2004, ratificată prin Legea nr. 191/2005.

PRIM-MINISTRU  
**CĂLIN POPESCU-TĂRICEANU**

Contrasemnează:

p. Ministrul internelor și reformei administrative,

**Liviu Radu,**

secretar de stat

Ministrul transporturilor,

**Ludovic Orban**

Ministrul afacerilor externe,

**Adrian Mihai Cioroianu**

Ministrul economiei și finanțelor,

**Varujan Vosganian**

București, 4 iulie 2007.

Nr. 718.

**A C O R D****între Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare pentru aplicarea Convenției dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnată la București la 27 aprilie 2004**

În conformitate cu prevederile art. 3 alin. (4) din Convenția dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnată la București la 27 aprilie 2004, denumită în continuare *Convenție*, Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare, denumite în continuare *părți contractante*, în scopul facilitării punerii în aplicare a Convenției, în vederea accelerării și simplificării controlului traficului la frontiera de stat comună prin intermediul colaborării dintre autoritățile lor,

având în vedere Concluziile Parlamentului European și ale Consiliului adoptate la 27 noiembrie 2003, referitoare la aprobarea convențiilor bilaterale de cooperare privind controlul persoanelor la frontierele comune de uscat ale unor state membre ale Uniunii Europene în urma extinderii, precum și dispozițiile referitoare la controalele comune prevăzute în Codul comunitar asupra regulilor privind circulația persoanelor peste frontiere (denumit în continuare *Codul frontierelor Schengen*), stabilit prin Regulamentul Parlamentului European și al Consiliului nr. 562/2006/CE,

au convenit următoarele:

**CAPITOLUL I**  
**Dispoziții generale**

**ARTICOLUL 1**

(1) În scopul celor de mai sus, părțile contractante convin să controleze împreună, în cadrul unei singure opriri, persoanele care trec frontiera prin punctele rutiere de trecere a frontierei româno-maghiare, precum și obiectele aflate în proprietatea acestora și mijloacele de transport. În cursul controlului comun la o singură oprire, efectuat potrivit dispozițiilor art. 7 din Codul

frontierelor Schengen, autoritățile competente ale părților contractante efectuează controlul în cadrul propriei lor sfere de atribuții.

(2) Expresiile utilizate în prezentul acord au sensul stabilit în Convenție.

(3) Autoritățile competente ale părților contractante se informează reciproc asupra modernizării punctelor de trecere a frontierei care implică și cealaltă parte contractantă, respectiv asupra limitărilor, devierilor provizorii de trafic și asupra lucrărilor

care implică locurile de serviciu, cu suficient timp înaintea începerii acestora.

(4) Părțile contractante stabilesc în scris și publică, conform legislației lor interne, drumurile care traversează frontiera de stat pe care pot fi transportate mărfuri periculoase.

(5) În cursul punerii în aplicare a prezentului acord, limbile de contact între persoanele de serviciu sunt limbile română și maghiară. Cu ocazia menținerii legăturii, personalul de serviciu poate conveni și asupra folosirii unei alte limbi.

## ARTICOLUL 2

(1) Controlul traficului de frontieră în traficul feroviar se efectuează în staționare, pe timpul staționării trenului în punctul de trecere a frontierei.

(2) La punctele feroviare de trecere a frontierei, personalul de serviciu al fiecărei părți contractante efectuează separat controlul traficului de frontieră, pe teritoriul propriului său stat.

(3) În vederea fluidizării controlului traficului feroviar al persoanelor, respectiv al circulației feroviare, precum și în scopul reducerii timpului de așteptare, părțile contractante pot conveni asupra controlului comun, din mers, al traficului feroviar de persoane, asupra regulilor detaliate și condițiilor controlului, în primul rând pe tronsoanele de cale ferată dintre stațiile feroviare Arad—Curtici (Kürtös) — Lökösháza — Békéscsaba, precum și dintre Oradea (Nagyvárad) — Episcopia Bihorului (Biharpüspöki) — Biharkeresztes — Püspökladány.

## ARTICOLUL 3

(1) Autoritățile de control al traficului de frontieră ale părților contractante vor stabili printr-o înțelegere regulile privind regimul de funcționare a punctelor de trecere a frontierei.

(2) Înțelegerea privind regimul funcționării punctelor de trecere a frontierei trebuie să cuprindă următoarele:

- a) regulile primirii autovehiculelor;
- b) locul și regulile controlului;
- c) alte condiții necesare efectuării controlului (cum ar fi scoaterea de sub tensiune a garniturilor de tren);
- d) modul de întoarcere la frontiera comună a persoanelor și bunurilor;
- e) locul de control al mărfurilor periculoase și transporturilor de animale vii;
- f) regulile privind măsurile necesare în cazul unor accidente grave sau al altor evenimente deosebite petrecute la punctul de trecere a frontierei;
- g) modul de amplasare a inscripțiilor informative pe teritoriul punctului de trecere a frontierei;
- h) regulile referitoare la prevenirea și eliminarea încălcării dispozițiilor stabilite în regulamentul punctului de trecere a frontierei;
- i) parcările de serviciu desemnate.

## CAPITOLUL II

### Puncte de trecere rutiere a frontierei comune

## ARTICOLUL 4

### Cenad (Nagycsanád) — Kiszombor

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane, precum și pentru traficul internațional de mărfuri, până la limita de greutate totală de 7,5 tone.

(2) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României prin punctul de trecere rutier Cenad (Nagycsanád) — Kiszombor — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(5) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(6) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(7) În cazul creării condițiilor necesare de personal, tehnice și de infrastructură, părțile contractante autorizează traficul internațional de mărfuri prin punctul de trecere a frontierei, până la limita unei greutăți totale de 12,5 tone, despre a căruia introducere se va conveni pe cale diplomatică.

## ARTICOLUL 5

### Nădlac (Nagylak) — Nagylak

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României prin punctul de trecere rutier de la Nădlac (Nagylak) — Nagylak are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei indicat la alin. (1) are loc într-un loc comun pe teritoriul Republicii Ungare. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(5) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(6) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(7) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control și cabinelor de serviciu aferente acestora, atât pe terminalul de ieșire, cât și de intrare;
- d) parcării de serviciu.

## ARTICOLUL 6

**Turnu (Tornya) — Battonya**

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane, precum și pentru traficul internațional de mărfuri, până la limita de greutate totală de 7,5 tone.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României prin punctul de trecere rutier Turnu (Tornya) — Battonya — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(5) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(6) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

## ARTICOLUL 7

**Vărșand (Gyulavarsánd) — Gyula**

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României pe la punctul de trecere rutier Vărșand (Gyulavarsánd) — Gyula are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei indicat la alin. (1) are loc într-un loc comun de pe teritoriul Republicii Ungare. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(5) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(6) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(7) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control și cabinelor de serviciu aferente acestora, atât pe terminalul de ieșire, cât și de intrare;
- d) parcării de serviciu.

## ARTICOLUL 8

**Salonta (Nagyszalonta) — Méhkerék**

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane, precum și pentru traficul internațional de mărfuri, până la limita de greutate totală de 7,5 tone.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României pe la punctul de trecere rutier de la Salonta (Nagyszalonta) — Méhkerék — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare — inclusiv controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri — are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(5) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

(6) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) benzilor de circulație de control;
- d) parcării de serviciu.

## ARTICOLUL 9

**Borș (Bors) — Ártánd**

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României prin punctul de

trecere rutier de la Borş (Bors) — Ártánd are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei indicat la alin. (1) are loc într-un loc comun de pe teritoriul Republicii Ungare. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(5) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(6) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control;

d) parării de serviciu.

(7) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control și cabinelor de serviciu aferente acestora, atât pe terminalul de ieșire, cât și de intrare;  
d) parării de serviciu.

#### ARTICOLUL 10

##### Valea lui Mihai (Érmihályfalva) — Nyirábrány

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane.

(2) Controlul traficului internațional de persoane la punctul de trecere a frontierei rutier Valea lui Mihai (Érmihályfalva) — Nyirábrány are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(3) În cazul creării condițiilor necesare de personal, tehnice și de infrastructură, părțile contractante autorizează traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei, până la limita unei greutate totale de 3,5 tone, despre a cărui introducere se va conveni pe cale diplomatică.

(4) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(5) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control;

d) parării de serviciu.

#### ARTICOLUL 11

##### Urziceni (Csánalos) — Vállaj

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane.

(2) Controlul traficului internațional de persoane la punctul de trecere a frontierei rutier Urziceni (Csánalos) — Vállaj are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(3) În cazul creării condițiilor necesare de personal, tehnice și de infrastructură, părțile contractante autorizează traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei, până la limita unei greutate totale de 3,5 tone, despre a cărui introducere se va conveni pe cale diplomatică.

(4) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(5) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control;

d) parării de serviciu.

#### ARTICOLUL 12

##### Petea (Pete) — Csengersima

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Controlul traficului de persoane care ies de pe teritoriul Republicii Ungare și intră pe teritoriul României prin punctul de trecere rutier Petea (Pete) — Csengersima are loc pe teritoriul României, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul României se înființează un loc de serviciu maghiar pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Controlul traficului internațional de persoane care ies de pe teritoriul României și intră pe teritoriul Republicii Ungare are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(4) Controlul persoanelor participante la traficul internațional de mărfuri la punctul de trecere a frontierei indicat la alin. (1) are loc într-un loc comun de pe teritoriul Republicii Ungare. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(5) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(6) Pentru personalul de serviciu maghiar, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul României, se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control;

d) parării de serviciu.

(7) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, existent pe teritoriul Republicii Ungare, se extinde asupra:

a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;  
b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;

c) benzilor de circulație de control și cabinelor de serviciu aferente acestora, atât pe terminalul de ieșire, cât și de intrare;  
d) parării de serviciu.

#### ARTICOLUL 13

##### Săcuieni (Székelyhíd) — Létavértes

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane, cu excepția traficului de autobuze,

precum și pentru traficul internațional de mărfuri, până la limita de greutate totală de 7,5 tone.

(2) Controlul traficului internațional de persoane la punctul de trecere a frontierei rutier Săcuieni (Székelyhid) — Létavértes are loc pe teritoriul Republicii Ungare, într-un loc comun. În acest scop pe teritoriul Republicii Ungare se înființează un loc de serviciu român pentru controlul traficului de frontieră.

(3) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 6,00 la ora 22,00, ora locală.

(4) Pentru personalul de serviciu român, teritoriul de funcționare la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră se extinde asupra:

- a) încăperilor de serviciu desemnate, încăperilor comune;
- b) drumului public care duce de la frontiera de stat la locul de serviciu;
- c) unei benzi de circulație de control pe fiecare sens și cabinelor de serviciu;
- d) parcării de serviciu.

(5) În cazul creării condițiilor de infrastructură necesare, părțile contractante autorizează traficul de autobuze, asupra căruia se informează reciproc pe cale diplomatică.

#### ARTICOLUL 14

În privința art. 4—13 și 20, încăperile de serviciu necesare în statul de teritoriu personalului de serviciu al statului vecin sunt asigurate de statul de teritoriu, iar asupra utilizării și condițiilor de exploatare a acestora organele competente ale părților contractante vor conveni cu administratorul în cadrul unui contract de drept civil.

#### CAPITOLUL III

##### Puncte de trecere a frontierei feroviare

#### ARTICOLUL 15

##### Curtici (Kürtös) — Lökösháza

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

#### ARTICOLUL 16

##### Salonta (Nagyszalonta) — Kötegyán

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

#### ARTICOLUL 17

##### Episcopia Bihorului (Biharpüspöki) — Biharkeresztes

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

#### ARTICOLUL 18

##### Valea lui Mihai (Érmihályfalva) — Nyirábrány

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

#### ARTICOLUL 19

##### Carei (Nagykároly) — Tiborszállás/Ágerdömajor

(1) Punctul de trecere a frontierei este deschis pentru traficul internațional de persoane și de mărfuri.

(2) Programul de lucru al punctului de trecere a frontierei este zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

#### CAPITOLUL IV

##### Punctul comun de contact

#### ARTICOLUL 20

(1) În scopul dezvoltării colaborării internaționale și schimbului de informații dintre organele de poliție, la punctul de trecere a frontierei Borș—Ártánd, părțile contractante mențin în funcționare, pe teritoriul Republicii Ungare, un punct comun de contact, cu un program zilnic de la ora 00,00 la ora 24,00.

(2) Pentru persoanele de serviciu desemnate de autoritatea competentă română, teritoriul de funcționare la punctul comun de contact se extinde asupra:

— drumului de la frontiera de stat comună la locul de serviciu pentru controlul traficului de frontieră, în scopul deplasării la serviciu;

— încăperilor de serviciu desemnate la punctul de trecere a frontierei, precum și încăperilor grupurilor sociale aferente acestora;

— parcării de serviciu desemnate.

(3) Părțile contractante asigură condițiile pentru persoanele de serviciu, necesare funcționării punctului comun de contact. Persoanele desemnate să-și îndeplinească serviciul la punctul comun de contact trebuie să cunoască bine — în scris și verbal — limba oficială a statului vecin.

#### ARTICOLUL 21

În punctul comun de contact, partea contractantă maghiară asigură încăperile de serviciu, permițând totodată părții contractante române exploatarea echipamentelor de telecomunicații și operare a datelor instalate de aceasta și realizarea racordurilor necesare la rețeaua corespunzătoare a părții contractante române, având în vedere cele prevăzute la art. 27 din Convenție.

#### ARTICOLUL 22

(1) În scopul facilitării colaborării și schimbului de informații dintre organele de control al traficului de frontieră și cele de combatere a infracționalității, părțile contractante pot înființa noi puncte comune de contact. Despre aceasta, precum și despre sarcinile locurilor de serviciu comune deja funcționale și lărgirea sferei de atribuții a organelor care colaborează se va conveni pe calea schimbului de note diplomatice în scopul aplicării prezentului acord.

(2) Funcționarii care își îndeplinesc serviciul în punctul comun de contact își desfășoară activitatea pe baza prevederilor cuprinse în prezentul acord și a legislației interne în vigoare. Funcționarii pot primi dispoziții exclusiv de la șefii lor ierarhici.

(3) Structura organizatorică și regulile de funcționare de detaliu ale punctului comun de contact sunt cuprinse în regulamentul de organizare și funcționare, aprobat de autoritățile competente ale părților contractante.

#### ARTICOLUL 23

(1) În punctele comune de contact persoanele de serviciu desemnate de autoritățile competente ale părților contractante colaborează în concordanță cu legislația lor internă în vigoare:

- a) în schimbul de informații care interesează controlul traficului de frontieră, analiza acestora, simplificarea, fluidizarea și armonizarea traficului de frontieră;

b) pentru desfășurarea unui schimb direct de informații în vederea prevenirii, descoperirii și împiedicării delictelor de trecere a frontierei;

c) în coordonarea intervențiilor împotriva imigrației ilegale și acțiunilor ilegale conexe;

d) la cerere, oferă sprijin în vederea soluționării problemelor apărute în cursul aplicării acordului de readmisie în vigoare încheiat între părțile contractante.

(2) În scopul realizării colaborării stabilite la alin. (1), precum și la art. 22 alin. (1), persoanele de serviciu, în conformitate cu sarcinile și competențele lor, desfășoară un schimb permanent și direct de informații, îndeosebi în următoarele domenii:

— descoperirea delictelor legate de trecerea frontierei sau săvârșite în apropierea frontierei și a altor fapte ilegale, analiza și evaluarea comportamentelor ilegale tipice și a noilor metode de săvârșire;

— experiența generală acumulată în cursul controalelor traficului de frontieră și tendințele care se pot stabili pe baza acesteia;

— experiența activității în cadrul punctului comun de contact;  
— evenimente probabile mai importante, cu impact asupra traficului de frontieră (de exemplu, obstacole mai mari de circulație), manifestări deosebite, creșterea intensă, de durată, a traficului de persoane, măsurile speciale care influențează traficul de frontieră;

— legislația internă ce interesează obiectul prezentului acord, precum și modificările acesteia.

(3) Părțile contractante:

a) în scopul menținerii unei legături permanente:

— desemnează persoanele de serviciu responsabile cu menținerea legăturii;

— trimit experți și fac schimb de experiență în scopul dezvoltării colaborării reglementate prin prezentul acord;

b) în domeniul pregătirii și perfecționării:

— efectuează schimb de experiență asupra metodelor de control și supraveghere a traficului de frontieră;

— oferă sprijin în pregătirea profesională și privind limbile străine a personalului de serviciu al celeilalte părți contractante;

— sprijină perfecționarea specialiștilor lor în cadrul unor manifestări, întâlniri de lucru, programe de perfecționare comune.

#### ARTICOLUL 24

(1) Persoanele de serviciu, precum și reprezentanții desemnați ai organelor pentru combaterea infracționalității (denumiți în continuare *funcționari*) ai părților contractante își desfășoară activitatea în locul comun și răspund în cel mai scurt timp posibil la solicitarea funcționarului celeilalte părți contractante.

(2) Referitor la modul de rezolvare a solicitărilor, în ceea ce privește protecția datelor personale și a informațiilor furnizate, vor fi aplicate prevederile Acordului dintre Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare privind readmisia cetățenilor proprii și a altor persoane, semnat la București la 10 decembrie 2001, iar în privința protecției datelor personale și a informațiilor de natură penală, vor fi aplicate prevederile Acordului dintre Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare de cooperare în domeniul combaterii crimei organizate, terorismului și a traficului ilicit de droguri, semnat la Budapesta la 19 februarie 1997.

Pentru Guvernul României,  
**Vasile Blaga**,  
ministrul administrației și internelor

(3) În sensul prezentului acord, autorități competente pentru combaterea infracționalității sunt cele autorizate să ducă la îndeplinire sarcini de prevenire și combatere a infracționalității, conform normelor de drept interne ale părților contractante:

— din partea României: Poliția de Frontieră Română;

— din partea Republicii Ungare: Grănicerii Republicii Ungare, Garda Financiară și Vamală.

### CAPITOLUL V Dispoziții finale

#### ARTICOLUL 25

(1) Părțile contractante asigură protecția bazelor de date comunitare și unionale accesibile doar uneia dintre părțile contractante. Partea contractantă căreia nu i se permite accesul dă posibilitate celeilalte părți contractante să utilizeze liniile protejate și să aplice regulile de siguranță pe teritoriul propriului stat.

(2) Diferențele rezultate din interpretarea sau aplicarea prezentului acord vor fi soluționate de părțile contractante în cadrul Comisiei mixte româno-ungare de trafic de frontieră, pe calea negocierilor, iar în caz de nereușită, pe cale diplomatică.

(3) Aplicarea prezentului acord poate fi suspendată temporar, în totalitate sau parțial, de oricare parte contractantă, pentru executarea obligațiilor asumate în acordurile internaționale și a altor obligații juridice internaționale, precum și din motive de ordine publică, de siguranță publică ori de sănătate publică. Asupra introducerii sau revocării unei asemenea măsuri cealaltă parte contractantă trebuie informată fără întârziere, pe cale diplomatică. Suspendarea, respectiv încetarea suspendării, în situațiile care reclamă măsuri imediate, produce efecte începând cu primirea notei verbale, iar în celelalte cazuri produce efecte în a 15-a (cincisprezecea) zi după primirea notei verbale.

#### ARTICOLUL 26

(1) Prezentul acord se încheie pentru o perioadă nedeterminată. Prezentul acord trebuie aprobat în conformitate cu legislația internă a statelor părților contractante și asupra aprobării părților contractante se înștiințează reciproc pe cale diplomatică.

(2) Prezentul acord intră în vigoare în cea de-a 15-a zi de la data primirii ultimei note diplomatice prin care se comunică aprobarea, acordul aplicându-se provizoriu începând cu data aderării României la Uniunea Europeană, 1 ianuarie 2007.

(3) Începând cu ziua intrării în vigoare a prezentului acord își încetează valabilitatea Acordul dintre Guvernul României și Guvernul Republicii Ungare privind aplicarea Convenției dintre România și Republica Ungară privind controlul traficului de frontieră rutier și feroviar, semnat la București la 27 aprilie 2004.

(4) Prezentul acord poate fi denunțat în scris de oricare dintre părțile contractante, pe cale diplomatică. Prezentul acord își încetează valabilitatea în a 30-a (treizecea) zi de la primirea comunicării privind denunțarea.

(5) În cazul suspendării aplicării Convenției, se suspendă și aplicarea prezentului acord.

(6) În cazul încetării valabilității Convenției, își pierde valabilitatea și prezentul acord.

Semnat la București la 21 decembrie 2006, în două exemplare originale, în limbile română și maghiară, toate textele fiind egal autentice.

Pentru Guvernul Republicii Ungare,  
**dr. Janos Terenyi**,  
ambasador extraordinar și plenipotențiar  
al Republicii Ungare la București

## GUVERNUL ROMÂNIEI

## HOTĂRÂRE

**privind reglementarea acțiunilor specifice aferente finanțării asistenței  
din cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare**

În temeiul art. 108 din Constituția României, republicată, și al art. 3 alin. (2) din Legea nr. 404/2006 privind finanțarea asistenței pentru dezvoltare din cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare,

**Guvernul României** adoptă prezenta hotărâre.

**CAPITOLUL I  
Dispoziții generale**

Art. 1. – (1) Prezenta hotărâre reglementează acțiunile specifice aferente finanțării asistenței din cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

(2) Prezenta hotărâre stabilește:

a) formele de asistență pentru dezvoltare acordate de România în cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare;

b) procedurile de programare și acordare a asistenței pentru dezvoltare;

c) cadrul instituțional al gestionării resurselor aferente implementării asistenței pentru dezvoltare.

Art. 2. – (1) Prioritățile geografice și sectoriale ale asistenței pentru dezvoltare sunt cele prevăzute de Strategia națională privind politica de cooperare internațională pentru dezvoltare, aprobată prin Hotărârea Guvernului nr. 703/2006.

(2) Statele partenere beneficiare de asistența pentru dezvoltare, precum și fondurile financiare alocate în acest scop începând cu anul 2008 se stabilesc de Ministerul Afacerilor Externe și sunt aprobate pe bază de memorandum de Guvernul României, în conformitate cu angajamentele asumate de România pe plan internațional în materie de finanțare și eficacitate a asistenței pentru dezvoltare, cu excepția asistenței financiare acordate sub forma reducerii/ștergerii datoriilor țărilor debitoare României, care intră sub incidența Legii nr. 29/1994 privind autorizarea Guvernului de a aproba negocierea în vederea recuperării creanțelor României provenite din activitatea de comerț exterior și cooperare economică internațională, derulată înainte de 31 decembrie 1989, cu modificările ulterioare, și a Ordonanței Guvernului nr. 59/1994 privind reglementarea operațiunilor de import-export care se derulează prin cliring, barter și cooperare economică internațională în baza acordurilor comerciale și de plăți guvernamentale, republicată.

Art. 3. – În sensul prezentei hotărâri, termenii și expresiile menționate mai jos au următoarea semnificație:

a) *asistență pentru dezvoltare* – suma resurselor alocate de România statelor partenere în conformitate cu criteriile de clasificare a asistenței oficiale pentru dezvoltare elaborate de Comitetul Asistență pentru Dezvoltare din cadrul Organizației pentru Cooperare și Dezvoltare Economică (denumită în continuare OCDE);

b) *obiectivele de dezvoltare ale mileniului* – cele 8 obiective adoptate cu ocazia Summitului Mileniului, găzduit în septembrie 2000 de Organizația Națiunilor Unite, de realizat până în 2015, cu țintele și indicatorii aferenți, după cum urmează: eradicarea sărăciei extreme și a foametei; realizarea educației primare universale; promovarea egalității șanselor și împuternicirea femeilor; reducerea mortalității infantile; îmbunătățirea sănătății materne; combaterea HIV/SIDA, a malariei și a altor boli infecțioase; asigurarea durabilității mediului înconjurător; dezvoltarea unui parteneriat global pentru dezvoltare;

c) *stat partener* – statul terț în curs de dezvoltare, cu venit mic sau mediu, căruia România îi acordă asistență pentru dezvoltare și care este catalogat la data acordării asistenței drept potențial beneficiar de asistență oficială pentru dezvoltare de către Comitetul Asistență pentru Dezvoltare din cadrul OCDE;

d) *stat partener prioritar* – stat partener căruia România îi acordă asistență pentru dezvoltare pe o bază multianuală și pentru care volumul de asistență pentru dezvoltare oferită depășește valoarea în lei a sumei de 5 milioane de euro anual, calculată la cursul Băncii Naționale a României la data planificării bugetare a asistenței;

e) *stat partener în atenție* – stat partener căruia România îi acordă asistență pentru dezvoltare pentru un proiect specific și/sau anuală și pentru care volumul de asistență pentru dezvoltare oferită excedează valoarea în lei a sumei de 1 milion de euro, dar nu depășește valoarea în lei a sumei de 5 milioane de euro anual, sume calculate la cursul Băncii Naționale a României la data planificării bugetare a asistenței;

f) *stat donator* – stat care acordă asistență pentru dezvoltare;

g) *ajutorul bugetar direct* – transferul de fonduri direct la bugetul unui stat partener, realizat în vederea susținerii unui program guvernamental urmărind creșterea economică, reducerea sărăciei, ajustarea fiscală, întărirea instituțională, precum și a proceselor bugetare, acestea fiind cheltuite conform sistemelor de gestiune financiară ale statului partener;

h) *proiecte de asistență pentru dezvoltare* – setul de activități interconectate, vizând realizarea unui obiectiv punctual de dezvoltare;

i) *programe de asistență pentru dezvoltare* – setul de activități și proiecte de asistență pentru dezvoltare, interconectate, urmărind consolidarea unui sector specific de interes al statului partener;

j) *înfărățire instituțională* – setul de activități destinate întăririi capacității administrative și judiciare a statelor partenere realizate în colaborare cu instituțiile publice românești.

**CAPITOLUL II**

**Forme de asistență pentru dezvoltare**

Art. 4. – Guvernul României utilizează următoarele modalități de distribuție a asistenței pentru dezvoltare:

a) *asistență bilaterală* – include activitățile de cooperare pentru dezvoltare derulate direct între România și statul partener ori indirect, prin intermediul unor contractanți;

b) *asistență trilaterală* – include asistența pentru dezvoltare prin cofinanțare acordată de România statului partener în cooperare cu alt stat donator și/sau o organizație internațională;

c) *asistență multilaterală* – include contribuții către organizațiile internaționale care își derulează activitatea, parțial sau integral, în aria cooperării pentru dezvoltare și aflate pe lista Comitetului Asistență pentru Dezvoltare al OCDE, precum și către fondurile special administrate de acestea, în acest scop.

Art. 5. – Guvernul României acordă următoarele tipuri de asistență pentru dezvoltare:



a) asistență tehnică, prin furnizarea de servicii, produse și lucrări în vederea susținerii procesului de dezvoltare a statului partener – inclusiv pregătirea și formarea profesională, furnizarea rezultatelor unor activități de cercetare, burse de studii și stagii de practică, implementarea de proiecte de înfrățire instituțională și alte inițiative de recrutare, formare și plasare de voluntari;

b) asistență financiară – asistența financiară nerambursabilă și ștergerea și/sau reducerea datoriilor țărilor în curs de dezvoltare față de România;

c) asistență umanitară – asistența de urgență acordată statelor în caz de dezastre și conflicte armate prelungite, cu scopul atenuării consecințelor asupra victimelor, inclusiv asistența oferită în procesul de tranziție de la o situație de criză umanitară către procesele de reabilitare sau reconstrucție timpurie;

d) asistență pentru educație pentru dezvoltare și activitățile de conștientizare publică în domeniul dezvoltării – activitățile desfășurate în scopul promovării unei mai bune înțelegeri în rândul populației sau al unor categorii specifice ale populației, a problemelor cu care se confruntă statele în curs de dezvoltare, a necesității solidarizării cu acestea, ce contribuie la crearea unui sprijin puternic, din partea opiniei publice, în favoarea politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

### CAPITOLUL III

#### Cadrul de programare a asistenței pentru dezvoltare

Art. 6. – (1) Ministerul Afacerilor Externe elaborează o strategie de țară pentru fiecare stat partener prioritar.

(2) Strategia de țară reprezintă documentul-cadru de programare întocmit prin consultări cu Guvernul statului partener prioritar, autoritățile competente române și societatea civilă.

(3) Strategia de țară se adoptă de către Guvernul României prin memorandum elaborat și înaintat spre aprobare de către Ministerul Afacerilor Externe.

(4) Strategia de țară conține următoarele elemente:

a) descrierea obiectivelor politicii României în materie de cooperare pentru dezvoltare;

b) descrierea obiectivelor statului partener prioritar în materie de reducere a sărăciei și dezvoltare;

c) analiza situației politice, economice și sociale din statul partener prioritar;

d) descrierea activităților trecute și prezente ale principalilor donatori;

e) strategia de răspuns a României la problemele de dezvoltare ale statului partener prioritar, prin identificarea unui număr limitat de sectoare de intervenție;

f) obiectivele globale ale cooperării pentru perioada de aplicabilitate a Strategiei de țară;

g) alocarea resurselor financiare pentru fiecare sector de intervenție;

h) obiectivele specifice, rezultatele așteptate și indicatorii de performanță pentru fiecare sector de intervenție;

i) modalitățile de integrare a tematicilor orizontale, cu aplicabilitate în mai multe sectoare de intervenție;

j) programele avute în vedere pentru atingerea obiectivelor, precum și tipurile și instrumentele de asistență.

(5) Strategia de țară se aprobă pentru un interval de minimum 3 ani, în funcție de ciclul bugetar al statului partener și de strategiile acestuia de dezvoltare și reducere a sărăciei.

(6) Strategia de țară se revizuieste periodic, pe baza evaluărilor rezultatelor obținute.

Art. 7. – (1) Guvernul României, la propunerea Ministerului Afacerilor Externe, încheie acorduri de cooperare pentru dezvoltare cu fiecare stat partener prioritar. Acordurile de cooperare pentru dezvoltare sunt inițiate și negociate de Ministerul Afacerilor Externe în colaborare cu autoritățile publice din România, cu atribuții în domeniile prevăzute la art. 2 din Legea nr. 404/2006 privind finanțarea asistenței pentru

dezvoltare din cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

(2) Acordurile de cooperare pentru dezvoltare reprezintă instrumentul juridic de reglementare a asistenței pentru dezvoltare acordate de Guvernul României.

(3) Acordurile de cooperare pentru dezvoltare stabilesc termenii și condițiile generale de acordare de asistență pentru dezvoltare, inclusiv domeniile de intervenție, alocările financiare indicative, precum și drepturile și obligațiile părților.

(4) Acordurile de cooperare pentru dezvoltare au caracter de contract de stat și nu intră sub incidența Legii nr. 590/2003 privind tratatele.

Art. 8. – (1) Ministerul Afacerilor Externe încheie memorandumuri de înțelegere cu toate statele partenere, cu excepția statelor debitoare României care beneficiază de asistența financiară pentru dezvoltare acordată sub forma reducerii/ștergerii datoriilor care intră sub incidența Legii nr. 29/1994, cu modificările ulterioare, și a Ordonanței Guvernului nr. 59/1994, republicată.

(2) Pentru statele partenere prioritare memorandumurile de înțelegere au la bază acordurile de cooperare pentru dezvoltare și stabilesc elementele specifice de asistență (sprijin bugetar, proiecte, programe) agreeate între cele două părți.

(3) Pentru statele partenere în atenție și celelalte state partenere memorandumurile de înțelegere stabilesc atât cadrul general de cooperare, cât și elementele specifice de asistență (sprijin bugetar, proiecte, programe) agreeate între cele două părți.

Art. 9. – (1) Ministerul Afacerilor Externe elaborează Planul anual de acțiune care cuprinde:

a) descrierea activităților planificate pentru următoarele 12 luni;

b) calendarul activităților și îndeplinirii obiectivelor;

c) bugetul pentru anul fiscal aferent.

(2) Planul anual de acțiune fundamentează memorandumurile de înțelegere și este aprobat prin ordin al ministrului afacerilor externe, la propunerea secretarului de stat responsabil pentru politica națională de cooperare internațională pentru dezvoltare din cadrul Ministerului Afacerilor Externe.

Art. 10. – (1) Ministerul Afacerilor Externe elaborează o strategie multianuală pentru acordarea de asistență pentru dezvoltare în plan multilateral.

(2) Strategia prevăzută la alin. (1) conține următoarele elemente:

a) descrierea obiectivelor politicii României în materie de cooperare pentru dezvoltare;

b) analiza globală a activităților tematice și geografice desfășurate de organizațiile internaționale în materie de dezvoltare;

c) strategia de cooperare multilaterală pentru dezvoltare a României prin identificarea unor priorități de acțiune;

d) alocarea resurselor financiare între priorități.

(3) Strategia pentru asistență multilaterală se aprobă pentru un interval de minimum 3 ani, în funcție de calendarul atingerii obiectivelor de dezvoltare ale mileniului.

(4) Strategia pentru asistență multilaterală se adoptă de Guvernul României, prin memorandumul elaborat și înaintat spre aprobare de Ministerul Afacerilor Externe.

### CAPITOLUL IV

#### Proceduri de acordare a asistenței pentru dezvoltare

Art. 11. – Achizițiile de produse, servicii și lucrări finanțate în cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare se realizează potrivit prevederilor legale române în materie de achiziții publice.

Art. 12. – (1) Ministerul Afacerilor Externe cofinanțează proiecte și programe de asistență pentru dezvoltare atunci când acestea sunt în concordanță cu Strategia de țară în cazul statelor partenere prioritare sau dacă aceste proiecte și programe fac obiectul unui memorandum de înțelegere specific

încheiat între toate statele donatoare cofinanțatoare și statul partener.

(2) Memorandumul de înțelegere specific stabilește drepturile și obligațiile părților, legislația aplicabilă pentru atribuirea contractelor de achiziție publică și metodologia, termenii și condițiile de efectuare a plăților.

Art. 13. – Ministerul Afacerilor Externe contribuie la finanțarea de proiecte și programe de asistență pentru dezvoltare implementate de organizații multilaterale, inclusiv fondurile administrate de acestea, în sprijinirea dezvoltării statelor partenere, cu respectarea priorităților stabilite prin strategiile de țară, în cazul în care există, sau pe baza memorandumurilor de înțelegere încheiate cu fiecare stat partener.

Art. 14. – Ministerul Afacerilor Externe contribuie la finanțarea bugetului organizațiilor internaționale, inclusiv fondurile administrate de acestea, în baza strategiei multianuale pentru asistență multilaterală.

Art. 15. – Finanțarea contribuțiilor prevăzute la art. 13 și 14 se realizează în baza unui memorandum de înțelegere încheiat între Ministerul Afacerilor Externe și organizația internațională în cauză sau conform procedurilor legale aplicabile organizației internaționale respective.

Art. 16. – (1) Organizațiile neguvernamentale din România pot beneficia de finanțare nerambursabilă din bugetul Ministerului Afacerilor Externe destinat finanțării asistenței pentru dezvoltare pentru:

a) derularea de programe și proiecte de cooperare pentru dezvoltare în statele partenere; și

b) derularea de activități de educație pentru dezvoltare și consientizare publică în domeniul dezvoltării.

(2) Finanțarea activităților organizațiilor neguvernamentale din România se realizează în baza Legii nr. 350/2005 privind regimul finanțărilor nerambursabile din fonduri publice alocate pentru activități nonprofit de interes general.

Art. 17. – (1) Ajutorul bugetar direct, la nivel general și/sau sectorial, se acordă statului partener care îndeplinește cumulativ următoarele condiții:

a) demonstrează un angajament credibil în vederea reducerii sărăciei și a creșterii economice, angajament reflectat prin existența unei strategii de reducere a sărăciei sau a unui document echivalent acesteia;

b) există un sistem stabil de gestiune macroeconomică și un mediu propice dezvoltării sectorului privat;

c) calitatea gestionării finanțelor publice este adecvată și/sau există un program credibil de reformă a sistemului de gestionare a finanțelor publice;

d) există un cadru sectorial de cheltuieli pe termen mediu și un buget anual;

e) se realizează coordonarea sectorială între donatori sub conducerea Grupului Băncii Mondiale sau a Comisiei Europene cu participarea activă a Guvernului țării partenere;

f) există un set de indicatori de performanță pentru evaluarea progresului în realizarea obiectivelor politicilor naționale.

(2) Ajutorul bugetar direct se acordă prin memorandumurile de înțelegere prevăzute la art. 8, încheiate de Ministerul Afacerilor Externe cu fiecare stat partener.

Art. 18. – (1) Ministerul Afacerilor Externe cofinanțează din bugetul destinat finanțării asistenței pentru dezvoltare proiecte de înfrățire instituțională cu statele partenere în domenii în care experiența României este relevantă și de interes pentru acestea.

(2) Proiectele de înfrățire instituțională prevăzute la alin. (1) îndeplinesc cumulativ următoarele condiții:

a) se încadrează în prioritățile stabilite în Strategia de țară sau memorandumul de înțelegere aferente țărilor partenere;

b) se desfășoară pe baza unor termeni de referință clari care specifică obiectivele proiectului, activitățile avute în vedere, obligațiile statului partener și rezultatele așteptate;

c) fac obiectul unui acord între Ministerul Afacerilor Externe și instituția publică română în cauză prin care sunt stabiliți termenii și condițiile proiectului de înfrățire instituțională;

d) se desfășoară pe o perioadă cuprinsă între 30 de zile și 36 de luni.

(3) Proiectele de înfrățire instituțională se aprobă prin memorandumurile de înțelegere prevăzute la art. 8, încheiate de Ministerul Afacerilor Externe cu fiecare stat partener.

Art. 19. – Furnizarea de asistență umanitară este un act de voință unilaterală a Guvernului României și este acordată direct statului în cauză ori indirect, prin intermediul unei organizații internaționale cu competențe în domeniu sau al unui fond autonom gestionat de o organizație internațională de profil ori al unui fond constituit în mod special pentru a răspunde necesităților unei crize umanitare sau al unor organizații neguvernamentale române și/sau străine.

Art. 20. – Pentru acordarea de asistență umanitară prin intermediul organizațiilor neguvernamentale, române sau străine, este necesar ca acestea să îndeplinească următoarele criterii:

a) să aibă experiență în domeniul asistenței umanitare;

b) să cunoască circumstanțele și specificul local;

c) să facă dovada deținerii mijloacelor de furnizare rapidă și eficientă a asistenței umanitare către persoanele sinistrate.

Art. 21. – (1) Ministerul Afacerilor Externe înaintează, prin memorandum, spre aprobare Guvernului României propunerile de finanțare de asistență umanitară.

(2) Ministerul Afacerilor Externe asigură finanțarea asistenței umanitare din bugetul destinat asistenței pentru dezvoltare prin ordin al ministrului afacerilor externe.

Art. 22. – Acțiunile de reducere/ștergere a datoriei statelor în curs de dezvoltare față de România provenite din activitatea de comerț exterior și cooperare economică internațională, derulată înainte de 31 decembrie 1989, precum și a celor evidențiate în conturile de cliring, barter și cooperare economică internațională, în baza acordurilor comerciale și de plăți guvernamentale, se realizează potrivit prevederilor legale române în vigoare.

## CAPITOLUL V

### Cadrul instituțional

Art. 23. – Ministerul Afacerilor Externe este coordonatorul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

Art. 24. – Atribuțiile Ministerului Afacerilor Externe în problematica reglementată prin prezenta hotărâre sunt cele prevăzute de Strategia națională privind politica națională de cooperare internațională pentru dezvoltare.

Art. 25. – Aprobarea proiectelor și programelor de asistență pentru dezvoltare se realizează prin ordin al ministrului afacerilor externe în baza Strategiei naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare, a priorităților geografice și a fondurilor financiare aprobate în acest scop de Guvernul României și cu respectarea prevederilor prezentului act normativ.

Art. 26. – (1) Activitatea privind evaluarea tehnică și financiară a proiectelor și programelor de asistență pentru dezvoltare se realizează de către Oficiul de Plăți și Contractare PHARE (OPCP) din cadrul Ministerului Economiei și Finanțelor.

(2) OPCP asigură:

a) organizarea procedurilor de achiziție publică, a selecțiilor publice de proiecte și a licitațiilor;

b) evaluarea și avizarea proiectelor și programelor în vederea aprobării;

c) contractarea proiectelor și programelor;

d) raportarea privind situația financiară a proiectelor și programelor;

e) evaluarea stadiului îndeplinirii obiectivelor proiectelor și programelor;

f) auditarea conturilor de către autoritățile naționale.

(3) Modalitățile specifice de colaborare între Ministerul Afacerilor Externe și Ministerul Economiei și Finanțelor se stabilesc printr-un memorandum de înțelegere încheiat între cele două instituții în termen de 30 de zile de la data intrării în vigoare a prezentei hotărâri.

Art. 27. – În termen de 30 de zile de la data intrării în vigoare a prezentei hotărâri, ministrul afacerilor externe și ministrul economiei și finanțelor aprobă prin ordin comun manualul de implementare a asistenței pentru dezvoltare.

Art. 28. – (1) În procesul de elaborare, implementare și coordonare a politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare, Ministerul Afacerilor Externe colaborează cu autoritățile administrației publice din România, cu atribuții în domeniile prevăzute la art. 2 din Legea nr. 404/2006.

(2) Instituțiile publice române propun Ministerului Afacerilor Externe proiecte și programe de asistență pentru dezvoltare în vederea finanțării acestora din bugetul destinat finanțării politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare. Activitățile de implementare a acestor proiecte și programe sunt realizate de instituțiile publice române inițiatoare.

Art. 29. – (1) La data intrării în vigoare a prezentei hotărâri se înființează, în subordinea Consiliului interministerial pentru relații externe și afaceri europene prevăzut în anexa nr. 2 la Hotărârea Guvernului nr. 750/2005 privind constituirea consiliilor interministeriale permanente, Comisia pentru cooperare economică și dezvoltare internațională, denumită în continuare *Comisia*.

(2) Comisia prevăzută la alin. (1) este alcătuită din câte un reprezentant, la nivel de secretar de stat/președinte, din următoarele instituții:

- a) Ministerul Educației, Cercetării și Tineretului;
- b) Ministerul Economiei și Finanțelor;
- c) Ministerul Mediului și Dezvoltării Durabile;
- d) Ministerul Transporturilor;
- e) Ministerul Sănătății Publice;
- f) Ministerul pentru Întreprinderi Mici și Mijlocii, Comerț, Turism și Profesii Liberale;
- g) Ministerul Justiției;
- h) Ministerul Culturii și Cultelor;
- i) Ministerul Internelor și Reformei Administrative;
- j) Ministerul Comunicațiilor și Tehnologiei Informației;
- k) Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale;
- l) Ministerul Dezvoltării, Lucrărilor Publice și Locuințelor;
- m) Ministerul Muncii, Familiei și Egalității de Șanse;
- n) Agenția Română pentru Investiții Străine;
- o) Autoritatea Națională pentru Reglementarea și Monitorizarea Achizițiilor Publice;
- p) Agenția pentru Strategii Guvernamentale.

(3) Ministerul Afacerilor Externe este reprezentat în Comisie de secretarul de stat pentru afaceri europene și de șeful Departamentului pentru Relațiile cu România de Pretutindeni.

(4) Comisia acționează în calitate de:

- a) forum de analiză, dezbateri și planificare interinstituțională a problematicilor decurgând din gestionarea relației Guvernului României cu OCDE; și
- b) forum de analiză, dezbateri și planificare interinstituțională a problematicilor privind realizarea politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

(5) Ministerul Afacerilor Externe asigură președinția și secretariatul Comisiei. Ședințele în plen se convoacă de către Ministerul Afacerilor Externe ori de câte ori este necesar.

(6) Regulamentul de organizare și funcționare a Comisiei se elaborează de către Comisie, se aprobă în prima ședință a acesteia și constituie anexă la Regulamentul privind organizarea și funcționarea Consiliului interministerial pentru relații externe și afaceri europene.

Art. 30. – (1) În termen de 60 de zile de la data intrării în vigoare a prezentei hotărâri se înființează Consiliul pentru cooperare pentru dezvoltare, denumit în continuare *Consiliul*.

(2) Consiliul prevăzut la alin. (1) este organism fără personalitate juridică, funcționează pe lângă Ministerul Afacerilor Externe, are un rol consultativ și asistă Ministerul Afacerilor Externe în definirea și implementarea politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare.

(3) Consiliul este compus din reprezentanți ai Ministerului Afacerilor Externe, invitați ai organizațiilor membre ale Federației Organizațiilor Neguvernamentale pentru Dezvoltare din România, precum și invitați din partea Parlamentului României, societății civile, instituțiilor de cult, mediului academic, mediului de afaceri, sindicatelor, mediei și alte persoane fizice sau juridice care își desfășoară activitatea în domeniul asistenței pentru dezvoltare.

(4) Ministerul Afacerilor Externe asigură președinția și secretariatul Consiliului. Ședințele în plen se convoacă de către Ministerul Afacerilor Externe ori de câte ori este necesar.

(5) Regulamentul de organizare și funcționare a Consiliului va fi elaborat de către Ministerul Afacerilor Externe în termen de 60 de zile de la data intrării în vigoare a prezentei hotărâri, urmând a fi supus spre aprobare Consiliului, în prima reuniune a acestuia.

(6) Federația Organizațiilor Neguvernamentale pentru Dezvoltare este partener al Guvernului României în eforturile de dezvoltare a politicii naționale de cooperare pentru dezvoltare.

## CAPITOLUL VI

### Cadrul financiar

Art. 31. – (1) Finanțarea acțiunilor specifice aferente asistenței pentru dezvoltare se asigură de la bugetul de stat, prin bugetul Ministerului Afacerilor Externe.

(2) Fondurile aferente finanțării acțiunilor prevăzute la alin. (1) se asigură din bugetul Ministerului Afacerilor Externe de la capitolul „Alte servicii publice generale”, subcapitolul „Asistență națională externă pentru dezvoltare”, titlul „Alte transferuri”, articolul „Transferuri curente în străinătate”, alineatul „Cooperare economică internațională”.

(3) Fondurile aprobate potrivit alin. (2) nu se pot redistribui și utiliza la alte subdiviziuni ale clasificăției bugetare

## CAPITOLUL VII

### Dispoziții finale

Art. 32. – Pe data intrării în vigoare a prezentei hotărâri se suplimentează numărul de posturi prevăzut pentru Ministerul Economiei și Finanțelor cu un număr de 7 posturi, în vederea îndeplinirii sarcinilor Oficiului de Plăți și Contractare PHARE în cadrul politicii naționale de cooperare internațională pentru dezvoltare, conform Hotărârii Guvernului nr. 386/2007 privind organizarea și funcționarea Ministerului Economiei și Finanțelor.

PRIM-MINISTRU

**CĂLIN POPESCU-TĂRICEANU**

Contrasemnează:

Ministrul afacerilor externe,

**Adrian Mihai Cioroianu**

Ministrul economiei și finanțelor,

**Varujan Vosganian**

București, 11 iulie 2007.

Nr. 747.

# ACTE ALE ORGANELOR DE SPECIALITATE ALE ADMINISTRAȚIEI PUBLICE CENTRALE

MINISTERUL AGRICULTURII ȘI DEZVOLTĂRII RURALE

## ORDIN

### privind controlul bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

În temeiul prevederilor art. 5 din Ordonanța Guvernului nr. 136/2000 privind măsurile de protecție împotriva introducerii și răspândirii organismelor de carantină dăunătoare plantelor sau produselor vegetale în România, aprobată cu modificări prin Legea nr. 214/2001,

văzând Referatul de aprobare nr. 292.478 din 1 iunie 2007 al Agenției Naționale Fitosanitare din cadrul Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale,

în temeiul Hotărârii Guvernului nr. 385/2007 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale,

**ministrul agriculturii și dezvoltării rurale** emite prezentul ordin.

Art. 1. – Prezentul ordin stabilește măsurile care se aplică împotriva bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., cunoscută anterior sub denumirea de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, denumită în continuare *organism*, cu privire la plantele-gazdă ale organismului, prevăzute în anexa nr. I secțiunea I, denumite în continuare *material de plantare*, în scopul:

- localizării și determinării distribuției;
- prevenirii apariției și răspândirii; și
- împiedicării răspândirii și controlului în vederea eradicării, dacă a fost semnalată.

Art. 2. – (1) Organismele oficiale responsabile din România, respectiv unitățile fitosanitare județene și a municipiului București, efectuează inspecții oficiale sistematice anuale asupra materialului de plantare originar din raza lor de activitate.

(2) În scopul identificării altor posibile surse de contaminare care amenință producția materialului de plantare, organismele oficiale responsabile efectuează o evaluare a riscului și, cu excepția cazului în care în timpul evaluării nu se identifică niciun risc de răspândire a organismului, desfășoară inspecții în zonele de producție a materialului de plantare pentru detectarea organismului asupra altor plante decât materialul de plantare prevăzut la art. 1, inclusiv asupra plantelor-gazdă solanacee sălbatice, precum și asupra apei de suprafață, asupra deșeurilor lichide provenite din procesările industriale sau din locurile de ambalare, manipulare a materialului de plantare, utilizate pentru irigarea sau stropirea materialului de plantare. În funcție de riscul identificat se determină extinderea inspecțiilor prevăzute la alin. (1).

(3) Organismele oficiale responsabile pot, de asemenea, să desfășoare inspecții oficiale pentru detectarea organismului pe materiale, cum ar fi mediu de creștere, sol și deșeuri solide rezultate din procesările industriale sau locurile de ambalare.

Art. 3. – (1) Inspecțiile oficiale prevăzute la art. 2 sunt efectuate:

- asupra materialului de plantare, în conformitate cu prevederile anexei nr. I secțiunea II pct. 1;
- asupra plantelor-gazdă, altele decât materialul de plantare prevăzut la art. 1, și asupra apei, inclusiv asupra deșeurilor lichide, și, dacă este cazul, sunt prelevate probe și supuse testelor de laborator oficiale sau oficial supravegheate, în conformitate cu metodele corespunzătoare;

c) după caz, asupra altor materiale, în conformitate cu metodele corespunzătoare.

(2) Detaliile suplimentare cu privire la procedurile de inspecție prevăzute la alin. (1), numărul, originea, eșalonarea și perioada prelevării probelor sunt elaborate de Laboratorul Central pentru Carantină Fitosanitară și aprobate de Agenția Națională Fitosanitară din cadrul Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale, pe baza principiilor științifice, statistice și a biologiei organismului, luând în considerare sistemul particular de producție a materialului de plantare și, după caz, al altor plante-gazdă ale organismului.

Art. 4. – (1) Detaliile și rezultatele inspecțiilor oficiale prevăzute la art. 2 trebuie notificate anual celorlalte state membre și Comisiei Europene, denumită în continuare *Comisie*, în conformitate cu prevederile anexei nr. I secțiunea II pct. 2. Aceste notificări sunt prezentate până la 1 iunie, cu excepția celor referitoare la cartofii de sămânță obținuți din propria exploatare, pentru care notificarea este prezentată până la 1 septembrie. Detaliile și rezultatele recoltelor se referă la producția anului precedent. Detaliile acestor notificări pot fi prezentate Comitetului Permanent pentru Sănătatea Plantelor, denumit în continuare *Comitet*.

(2) În conformitate cu procedura stabilită la art. 19 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 pentru aprobarea Normelor metodologice de aplicare a Ordonanței Guvernului nr. 136/2000 privind măsurile de protecție împotriva introducerii și răspândirii organismelor de carantină dăunătoare plantelor sau produselor vegetale în România, pot fi adoptate:

- metode adecvate pentru inspecțiile și testele de laborator prevăzute la art. 3 alin. (1) lit. b);
- metode adecvate pentru inspecțiile prevăzute la art. 3 alin. (1) lit. c);
- detalii suplimentare ale inspecțiilor prevăzute la art. 3 alin. (2) pentru asigurarea unor niveluri comparabile de asigurare între statele membre.

Art. 5. – Organismele oficiale responsabile asigură ca apariția suspectată sau prezența confirmată a organismului pe raza lor de activitate să fie comunicată Agenției Naționale Fitosanitare din cadrul Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale.

Art. 6. – În cazul unei apariții suspectate a organismului, Laboratorul Central pentru Carantină Fitosanitară sau alte laboratoare aprobate de Ministerul Agriculturii și Dezvoltării

Rurale efectuează teste de laborator oficiale sau oficial supravegheate, utilizând pentru materialul de plantare metoda corespunzătoare, conform anexei nr. II și în conformitate cu condițiile prevăzute în anexa nr. III pct. 1, sau, în toate celelalte cazuri, orice altă metodă aprobată oficial, în scopul confirmării sau infirmării apariției suspectate a organismului. În cazul confirmării prezenței organismului, se aplică prevederile anexei nr. III pct. 2.

Art. 7. – (1) În așteptarea confirmării sau infirmării apariției suspectate a organismului conform art. 6, în cazurile de apariție suspectată în care:

a) s-au constatat simptome de diagnostic cauzate de organism și un rezultat pozitiv prin testul/testele de depistare conform anexei nr. II secțiunea I pct. 1 și secțiunea II a fost identificat; sau

b) a fost identificat un rezultat pozitiv prin testul/testele de depistare conform anexei nr. II secțiunea I pct. 2 și secțiunea III, Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale prin unitățile fitosanitare:

1. interzice circulația plantelor și tuberculilor din toate recoltele, loturile sau transporturile din care au fost prelevate probele, aceasta putându-se face doar sub control oficial și cu condiția să se fi stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului;

2. aplică măsurile necesare pentru identificarea originii apariției suspectate;

3. introduce măsuri de precauție suplimentare adecvate, bazate pe gradul de risc estimat, în special, în legătură cu producția materialului de plantare și cu circulația loturilor de cartofi de sămânță, alții decât cei prevăzuți la pct. 1, produși la locul de producție de unde s-au prelevat probele prevăzute la pct. 1, în scopul prevenirii oricărei răspândiri a organismului.

(2) În cazurile aparițiilor suspectate unde există un risc de contaminare a materialului de plantare sau a apei de suprafață din sau într-un alt stat membru (state membre), statul membru pe raza căruia apariția suspectată a fost înregistrată notifică de îndată, în conformitate cu riscul identificat, detaliile apariției suspectate altui stat sau altor state membre implicate și corespunzător cooperării între statele membre menționate. Statul membru (statele membre) care a (au) notificat introduce (introduc) măsuri de precauție conform alin. (1) pct. 3 și iau măsuri suplimentare corespunzătoare, conform art. 6 și alin. (1) din prezentul articol.

(3) În conformitate cu procedura stabilită în art. 19 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 563/2007, sunt adoptate măsurile prevăzute la alin. (1) pct. 3.

Art. 8. – (1) Dacă în urma testelor de laborator oficiale sau oficial supravegheate efectuate pentru materialul de plantare în conformitate cu metoda prevăzută în anexa nr. II sau, în toate celelalte cazuri, cu orice altă metodă aprobată oficial se confirmă prezența organismului într-o probă prelevată în conformitate cu prezentul ordin, organismele oficiale responsabile, având în vedere principiile științifice fundamentate, biologia organismului și producția specifică, comercializarea și sistemele de procesare a plantelor-gazdă ale organismului, dispun măsurile prevăzute la alin. (2), (3) și (4).

(2) În cazul materialului de plantare organismele oficiale responsabile:

a) deschid o investigație pentru determinarea extinderii și sursei sau surselor primare de contaminare, în conformitate cu prevederile anexei nr. IV, cu testări suplimentare în conformitate cu art. 6, cel puțin asupra stocurilor de cartofi de sămânță înrudiți prin clonare; și

b) desemnează ca fiind contaminate materialul de plantare, transportul și/sau lotul din care s-a prelevat proba și utilajele, vehiculul, vasul, depozitul sau părți din acestea și orice alte obiecte, inclusiv materialul de ambalare care a venit în contact cu materialul de plantare din care a fost prelevată proba;

c) desemnează ca fiind contaminate, dacă este cazul, câmpul sau câmpurile, unitatea ori unitățile de producție de culturi protejate și locul sau locurile de producție de unde s-a recoltat materialul de plantare și din care a fost prelevată proba;

d) pentru probele prelevate în perioada de vegetație desemnează ca fiind contaminate câmpul sau câmpurile, locul ori locurile de producție și, dacă este cazul, unitatea sau unitățile de producție de culturi protejate din care a fost prelevată proba; și

e) determină, în conformitate cu prevederile anexei nr. V pct. 1, extinderea contaminării probabile prin contact înainte sau după recoltare, prin legături de producție, irigare ori stropire sau printr-o înrudire clonală cu materialul desemnat contaminat; și

f) demarchează o zonă pe baza desemnării contaminării în conformitate cu prevederile lit. b), c) și d), a determinării extinderii contaminării probabile în conformitate cu lit. e) și a răspândirii posibile a organismului, în conformitate cu prevederile anexei nr. V pct. 2 (i).

(3) În cazul culturilor de plante-gazdă, altele decât cele prevăzute la alin. (2), la care producția de material de plantare este identificată ca risc, organismele oficiale responsabile:

a) deschid o investigație în conformitate cu prevederile alin. (2) lit. a); și

b) desemnează ca fiind contaminate plantele-gazdă ale organismului de la care a fost prelevată proba; și

c) determină contaminarea probabilă și demarchează o zonă în conformitate cu alin. (2) lit. e) și, respectiv, lit. f), în legătură cu producția de material de plantare.

(4) În cazul apelor de suprafață, inclusiv al deșeurilor lichide provenite din procesările industriale sau din locurile de ambalare a materialului de plantare, și pentru plantele-gazdă solanacee sălbatice asociate, acolo unde producția de material de plantare este identificată ca risc prin irigație, stropire sau inundare cu apă de suprafață, organismele oficiale responsabile:

a) deschid o investigație, inclusiv o inspecție în perioade corespunzătoare, pentru probele prelevate din apele de suprafață și, dacă sunt prezente, pentru plantele-gazdă solanacee sălbatice, în vederea stabilirii extinderii contaminării; și

b) desemnează ca fiind contaminată apa de suprafață din care au fost prelevate proba sau probele, corespunzătoare extinderii contaminării și în baza investigațiilor efectuate în conformitate cu lit. a); și

c) determină contaminarea probabilă și demarchează o zonă pe baza desemnării contaminării în conformitate cu lit. b) și a posibilei răspândiri a organismului, ținând seama de prevederile anexei nr. V pct. 1 și pct. 2 (ii).

Art. 9. – (1) Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, prin Agenția Națională Fitosanitară, notifică de îndată altor state membre și Comisiei, în conformitate cu prevederile anexei nr. V pct. 3, orice contaminare stabilită conform art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) și alin. (4) lit. b) și detaliile zonei demarcate conform art. 8 alin. (2) lit. f) și, dacă este cazul, conform art. 8 alin. (4) lit. c). Detaliile notificării efectuate conform prevederilor acestui alineat pot fi prezentate Comitetului.

(2) Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, prin Agenția Națională Fitosanitară, în același timp, va prezenta Comisiei notificări suplimentare conform anexei nr. V pct. 4. Detaliile

notificării efectuate conform prevederilor acestui alineat pot fi prezentate Comitetului.

Art. 10. – În urma notificării în conformitate cu prevederile art. 9, celelalte state membre vizate în notificare deschid o investigație în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. a) și, dacă este cazul, cu art. 8 alin. (4) lit. a) și iau măsuri suplimentare, după caz, în conformitate cu art. 8 și 9.

Art. 11. – Materialul de plantare desemnat ca fiind contaminat conform art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) nu poate fi plantat și de aceea, sub controlul organismelor oficiale responsabile, este supus uneia dintre dispozițiile anexei nr. VI pct. 1, astfel încât să nu existe niciun risc identificabil de răspândire a organismului.

Art. 12. – Materialul de plantare desemnat ca fiind probabil contaminat conform art. 8 alin. (2) lit. e) și alin. (4) lit. c), inclusiv materialul de plantare pentru care a fost identificat un risc, produs în locuri de producție desemnate ca probabil contaminate în conformitate cu prevederile art. 8 alin. (2) lit. e), nu poate fi plantat și, sub controlul organismelor oficiale responsabile, este utilizat sau eliminat în conformitate cu prevederile anexei nr. VI pct. 2, astfel încât să nu existe niciun risc identificabil de răspândire a organismului.

Art. 13. – Orice utilaj, vehicul, vas, depozit sau părți din acestea și orice alte obiecte, inclusiv materialul de ambalare desemnat ca fiind contaminat conform art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) sau desemnat ca fiind probabil contaminat în conformitate cu prevederile art. 8 alin. (2) lit. e) și alin. (4) lit. c), este decontaminat sau distrus, utilizându-se metodele prevăzute în anexa nr. VI pct. 3. După decontaminare niciun astfel de obiect nu mai este considerat ca fiind contaminat.

Art. 14. – Fără a prejudicia măsurile implementate conform prevederilor art. 11–13, organismele oficiale responsabile aplică în zona demarcată conform art. 8 alin. (2) lit. f) și alin. (4) lit. c) o serie de măsuri conform prevederilor anexei nr. VI pct. 4.1 și 4.2. Detaliile acestor măsuri se notifică anual celorlalte state membre și Comisiei. Detaliile acestor notificări pot fi prezentate Comitetului.

Art. 15. – (1) Cartofii de sămânță trebuie să îndeplinească cerințele Hotărârii Guvernului nr. 563/2007 și să provină, în linie directă, dintr-un material obținut în cadrul unui program aprobat oficial, găsit liber de organism în urma testelor de laborator oficiale sau oficial supravegheate, utilizându-se metoda corespunzătoare prevăzută în anexa nr. II.

(2) Testarea prevăzută la alin. (1) este efectuată:

a) în cazurile în care a fost confirmată prezența organismului în producția de cartofi de sămânță, se testează:

1. materialul timpuriu de propagare, inclusiv clonele selectate inițial și clonele de bază de cartofi de sămânță;

2. toate clonele de bază de cartofi de sămânță sau materialul timpuriu de propagare, inclusiv clonele selectate inițial, în cazurile în care s-a stabilit că nu există nicio relație clonală; și  
b) în alte cazuri, pe fiecare plantă obținută din clonele selectate inițial sau eşantioanele reprezentative de cartofi de sămânță de bază ori materialul timpuriu de propagare.

(3) În conformitate cu procedura prevăzută la art. 19 alin. (2) din Hotărârea Guvernului nr. 563/2007, pot fi adoptate următoarele prevederi:

- regulile detaliate ale aplicării prevederilor alin. (2) lit. a);
- regulile privind eşantioanele reprezentative prevăzute la alin. (2) lit. b).

Art. 16. – Deținerea și manipularea organismului sunt interzise.

Art. 17. – Fără a prejudicia prevederile Hotărârii Guvernului nr. 563/2007, Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, prin Agenția Națională Fitosanitară, poate aproba derogări de la măsurile prevăzute la art. 11–14 și 16, pentru testări sau în scopuri științifice și lucrări pentru selecții varietales.

Art. 18. – (1) Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, prin Agenția Națională Fitosanitară, poate adopta măsuri suplimentare sau mai stricte pentru combaterea organismului sau pentru prevenirea răspândirii lui, în conformitate cu prevederile Hotărârii Guvernului nr. 563/2007.

(2) Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale, prin Agenția Națională Fitosanitară, notifică detaliile măsurilor prevăzute la alin. (1) celorlalte state membre și Comisiei. Detaliile acestor notificări pot fi prezentate Comitetului.

Art. 19. – Anexele nr. I–VII fac parte integrantă din prezentul ordin.

Art. 20. – Prezentul ordin transpune prevederile Directivei Consiliului 98/57/CEE privind controlul bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, publicată în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene (JOUE) nr. L 0057 din 30 iulie 2006, modificată și completată prin Directiva Consiliului 2006/63, publicată în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene (JOUE) nr. L 206 din 27 iulie 2006.

Art. 21. – Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor nr. 632/2002 privind controlul bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 327 și 327 bis din 14 mai 2003, se abrogă.

Art. 22. – Prezentul ordin se publică în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul agriculturii și dezvoltării rurale,

**Decebal Traian Remeș**

București, 13 iulie 2007.

Nr. 586.

ANEXA Nr. I

#### SECȚIUNEA I

##### **Lista plantelor-gazdă ale bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. prevăzute la art. 1**

Plante (inclusiv tuberculi), altele decât semințele propriu-zise de *Solanum tuberosum* L (cartof)

Plante, altele decât fructele și semințele de *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex. Farw (tomate)

#### SECȚIUNEA II

##### **Inspecții**

1. Inspecțiile prevăzute la art. 3 din ordin se bazează pe biologia organismului și pe sistemele de producție proprii:

(i) în cazul cartofului:

- în perioade corespunzătoare, inspecția vizuală a culturii și/sau prelevarea de probe atât de cartofi de sămânță, cât și de alte tipuri de cartofi în perioada de

vegetație sau în perioada de depozitare. Aceste probe sunt supuse unei inspecții vizuale prin secționarea tuberculilor; și

– în cazul cartofilor de sămânță și, dacă este cazul, pentru alte tipuri de cartofi se efectuează teste de laborator oficiale sau oficial supravegheate, utilizându-se metoda stabilită în anexa nr. II;

(ii) în cazul tomatelor:

– inspecție vizuală, în perioade corespunzătoare, cel puțin în perioada de vegetație a plantelor destinate replantării în scop profesional.

2. Notificarea inspecțiilor prevăzute la art. 4 alin. (1) din ordin include:

(i) în cazul inspecțiilor asupra cartofilor:

– suprafața totală estimată cultivată, în hectare, cu cartofi de sămânță și alte tipuri de cartofi;

– stratificarea după categorie a cartofilor de sămânță și de consum și, după caz, pe regiune;

– numărul și perioada de prelevare a probelor pentru testare;

– numărul inspecțiilor vizuale din câmp;

– numărul de inspecții vizuale asupra tuberculilor și dimensiunea probei;

(ii) în cazul inspecțiilor la plantele de tomate destinate replantării în scop profesional, în perioada de vegetație:

– numărul total estimat de plante;

– numărul inspecțiilor vizuale;

(iii) în cazul inspecțiilor asupra plantelor-gazdă, altele decât cartofi și tomate, inclusiv plante-gazdă solanacee sălbatice:

– speciile;

– numărul și perioada prelevării probelor;

– zona/râul de unde au fost prelevate probele, acolo unde este cazul;

– metoda de analiză;

(iv) în cazul inspecțiilor asupra apei și deșeurilor lichide deversate din procesarea industrială sau din locurile de ambalare:

– numărul și perioada prelevării probelor;

– zona/râul/ locul de prelevare a probelor, acolo unde este cazul;

– metoda de analiză.

*ANEXA Nr. II*

## PROTOCOLUL DE TESTARE

pentru diagnoza, detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

### SCOPUL PROTOCOLULUI DE TESTARE

Protocolul prezentat descrie diversele proceduri implicate în:

(i) diagnoza putregaiului brun al tuberculilor de cartof și a veștejirii bacteriene la plantele de cartof, tomate, precum și la alte câteva plante-gazdă;

(ii) detecția bacteriei *Ralstonia solanacearum* în probele de tuberculi de cartof, plante de cartof, tomate și în alte plante-gazdă, în apă sau în sol;

(iii) identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

### PRINCIPII GENERALE

Protocoalele optimizate pentru diversele metode, validarea reactivilor și detaliile pregătirii materialului necesar pentru teste și controale figurează în apendici. O listă a laboratoarelor care realizează optimizarea și validarea protocoalelor este prevăzută în apendicele 1.

Dat fiind faptul că protocoalele implică detecția unui organism dăunător care trebuie pus sub carantină și includ utilizarea de culturi viabile de *Ralstonia solanacearum*, în calitate de material de control, este necesară aplicarea de proceduri de carantină corespunzătoare care prevăd instalații adecvate de eliminare a deșeurilor și în condițiile existenței unor licențe corespunzătoare eliberate de către autoritățile oficiale de carantină.

Parametrii testelor trebuie să garanteze o detecție coerentă și reproductibilă a nivelurilor de *Ralstonia solanacearum* la pragurile stabilite prin metodele selecționate.

Pregătirea exactă a controalelor pozitive este imperativă.

Efectuarea testelor în conformitate cu pragurile impuse implică, de asemenea, stabilirea parametrilor corecți, întreținerea și calibrarea echipamentelor, manipularea și păstrarea corectă a reactivilor și toate măsurile menite să împiedice contaminarea între probe, de exemplu, separarea controalelor pozitive și a probelor testate. Trebuie aplicate standarde de control de calitate pentru a se evita erori

administrative și de alt gen, în special în ceea ce privește etichetarea și documentarea.

O apariție suspectă, în sensul art. 7 alin. (1) din ordin, implică un rezultat pozitiv al testelor de diagnostic sau de detecție realizate asupra unei probe în conformitate cu diagramele funcționale prezentate în continuare. Un prim test de detecție pozitiv: testul de imunofluorescență (IF), testul reacției de polimerizare în lanț (PCR), testul de hibridizare fluorescență *in situ* (FISH), izolare selectivă trebuie confirmat de un al doilea test de detecție bazat pe un alt principiu biologic.

În cazul în care primul test de detecție este pozitiv, se suspectează o contaminare cu *Ralstonia solanacearum* și trebuie efectuat un al doilea test de detecție. În cazul în care al doilea test de detecție este pozitiv, presupunerea se confirmă (apariție suspectată) și trebuie continuate testele în conformitate cu procedura. În cazul în care al doilea test de detecție este negativ, proba este considerată ca fiind necontaminată cu *Ralstonia solanacearum*.

Prezența confirmată menționată la art. 8 alin. (1) din ordin implică izolarea și identificarea unei culturi pure de *Ralstonia solanacearum* cu confirmarea patogenității.

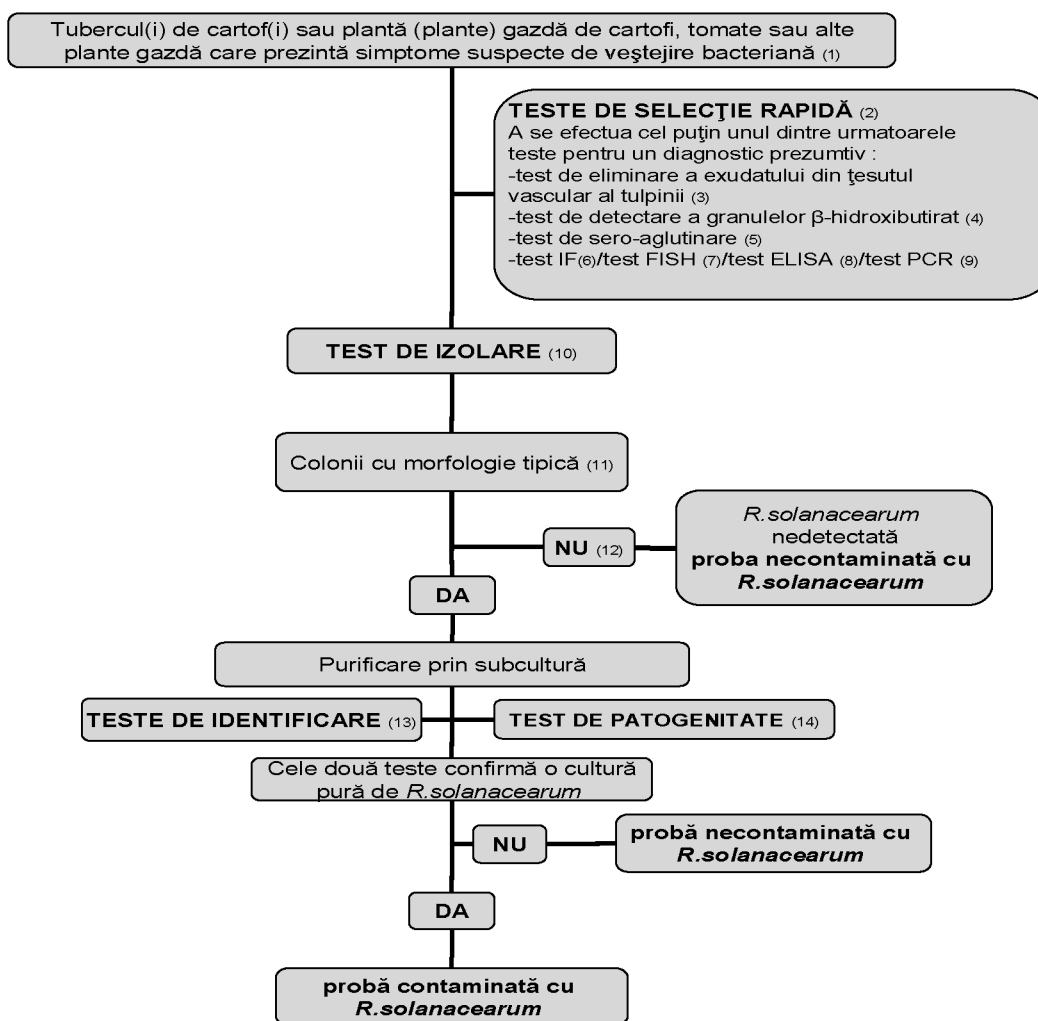
### SECȚIUNEA I

#### Aplicarea protocolului de testare

**1. Procedura de detecție pentru diagnoza veștejirii bacteriene (*Ralstonia solanacearum*) la tuberculi de cartof, plante de cartof, plante de tomate sau alte plante-gazdă care prezintă simptome de veștejire bacteriană**

Protocolul de testare este destinat tuberculilor de cartof și plantelor cu simptome tipice sau suspecte de veștejire bacteriană. Presupune un test de detecție rapidă, izolarea agentului patogen din țesutul vascular infectat pe un mediu (selectiv) și, în cazul unui rezultat pozitiv, identificarea culturii ca fiind *Ralstonia solanacearum*.

## Prezentarea diagramei



(1) Descrierea simptomelor este prevăzută la secțiunea II.1.

(2) Testele de selecție rapidă ușurează diagnosticul prezumtiv, dar nu sunt esențiale. Un rezultat negativ nu garantează întotdeauna absența agentului patogen.

(3) Testul de eliminare a exsudatului din țesutul vascular al tulpinii este descris în secțiunea VI.A.1.

(4) Testul de detecție a granulelor de poli-β-hidroxiubutirat în celulele bacteriene este descris în secțiunea VI.A.2.

(5) Testele de seroaglutinare asupra exsudatului bacterian sau asupra extractelor din țesuturile simptomatice sunt descrise în secțiunea VI.A.3.

(6) Testul IF asupra exsudatului bacterian, suspensiei de apă sau asupra extractelor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.5.

(7) Testul FISH asupra exsudatului bacterian, suspensiei de apă sau asupra extractelor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.7.

(8) Testul ELISA asupra exsudatului bacterian, suspensiei de apă sau asupra extractelor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.8.

(9) Testul PCR asupra exsudatului bacterian, suspensiei de apă sau asupra extractelor din țesuturi simptomatice este descris în secțiunea VI.A.6.

(10) În general, agentul patogen se izolează ușor din materialul vegetal simptomatic prin însămânțare pe mediu nutritiv (secțiunea II.3).

(11) Morfologia coloniei tipice este descrisă în secțiunea II.3.d).

(12) Cultivarea riscă să eșueze în stadiile avansate de infectare din cauza concurenței sau a înmulțirii bacteriilor saprofite. În cazul în care simptomele bolii sunt caracteristice, dar testul de izolare este negativ, izolarea trebuie repetată, de preferință printr-un test de însămânțare pe medii selective.

(13) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolate prezumtive de *Ralstonia solanacearum* necesită efectuarea testelor descrise în secțiunea VI. B. O caracterizare subspecifică este facultativă, dar recomandată pentru fiecare caz nou.

(14) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI. C.

## 2. Procedura pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în probe de tuberculi de cartof asimptomatici

### Principiu

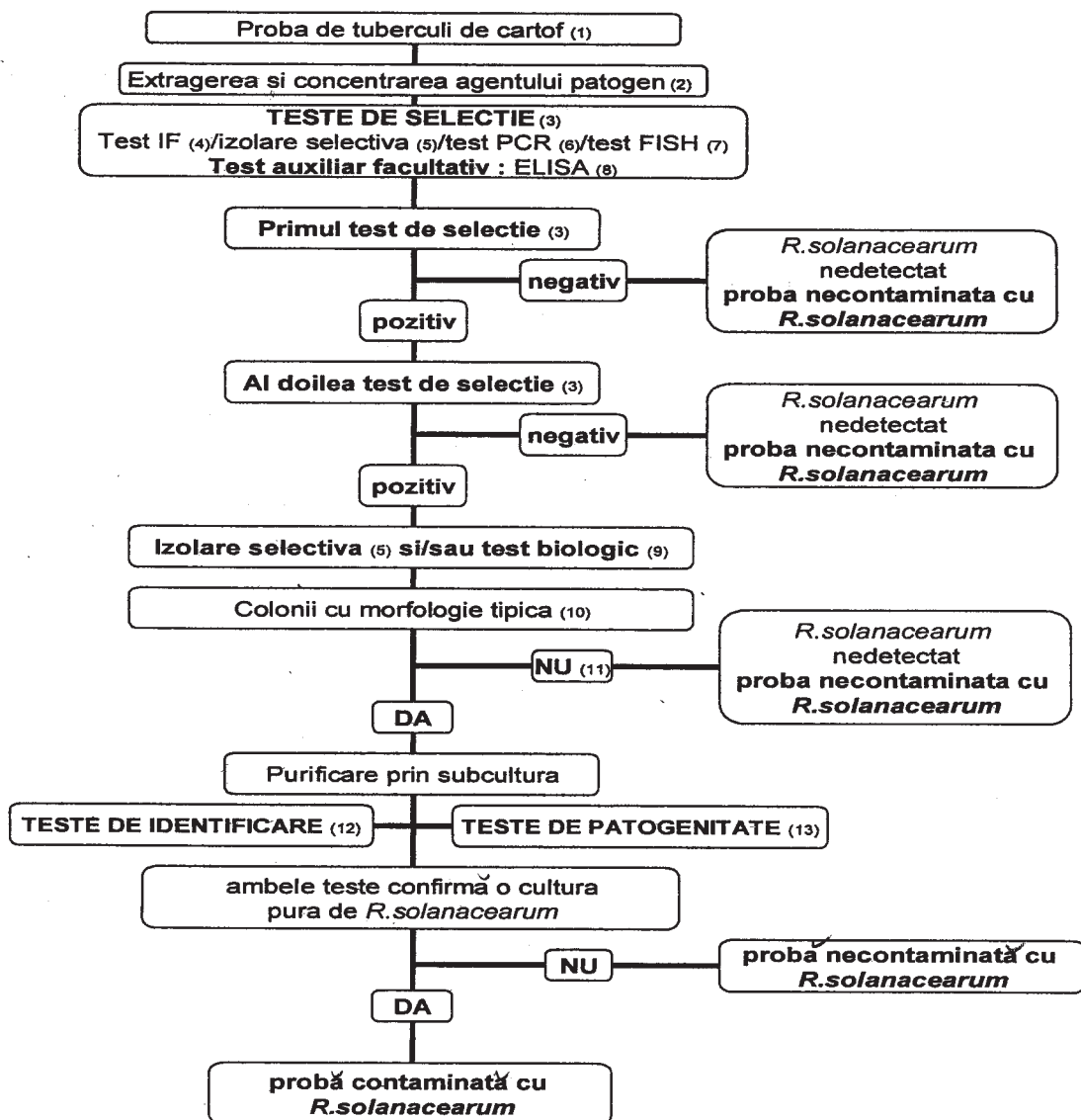
Protocolul de testare este destinat detecției infecțiilor latente ale tubercuilor de cartof. Un rezultat pozitiv a cel puțin două teste de detecție bazate pe principii biologice diferite trebuie completat prin izolarea agentului patogen, urmată, în cazul

izolării coloniilor caracteristice, de confirmarea unei culturi pure ca fiind *Ralstonia solanacearum*. Un rezultat pozitiv la un singur test de detecție nu este suficient pentru a considera proba ca fiind suspectă.

Testele de detecție și testele de izolare trebuie să permită detecția a  $10^3$ – $10^4$  celule pe ml de extract concentrat în suspensie, incluse în fiecare serie de teste în calitate de controale pozitive.



## Prezentarea diagramei



(1) Mărimea standard a probei este de 200 de tuberculi. Cu toate acestea, protocolul poate fi aplicat probelor mai mici în cazul în care nu sunt disponibili 200 de tuberculi.

(2) Extragerea agentului patogen și metodele de concentrare sunt descrise în secțiunea III.1.1.

(3) În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea și confirmarea. A se efectua cel puțin un test rapid de detecție. În cazul în care acest test este negativ, proba este considerată ca fiind negativă. În cazul în care acest test este pozitiv, este nevoie de un al doilea sau mai multe teste de detecție rapidă bazate pe principii biologice diferite pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau celelalte teste sunt negative, proba este considerată ca fiind negativă. Nu sunt necesare alte teste.

(4) Testul IF este descris în secțiunea VI.A.5.

(5) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

(6) Testele PCR sunt descrise în secțiunea VI.A.6.

(7) Testul FISH este descris în secțiunea VI.A.7.

(8) Testele ELISA sunt descrise în secțiunea VI.A.8.

(9) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

(10) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d).

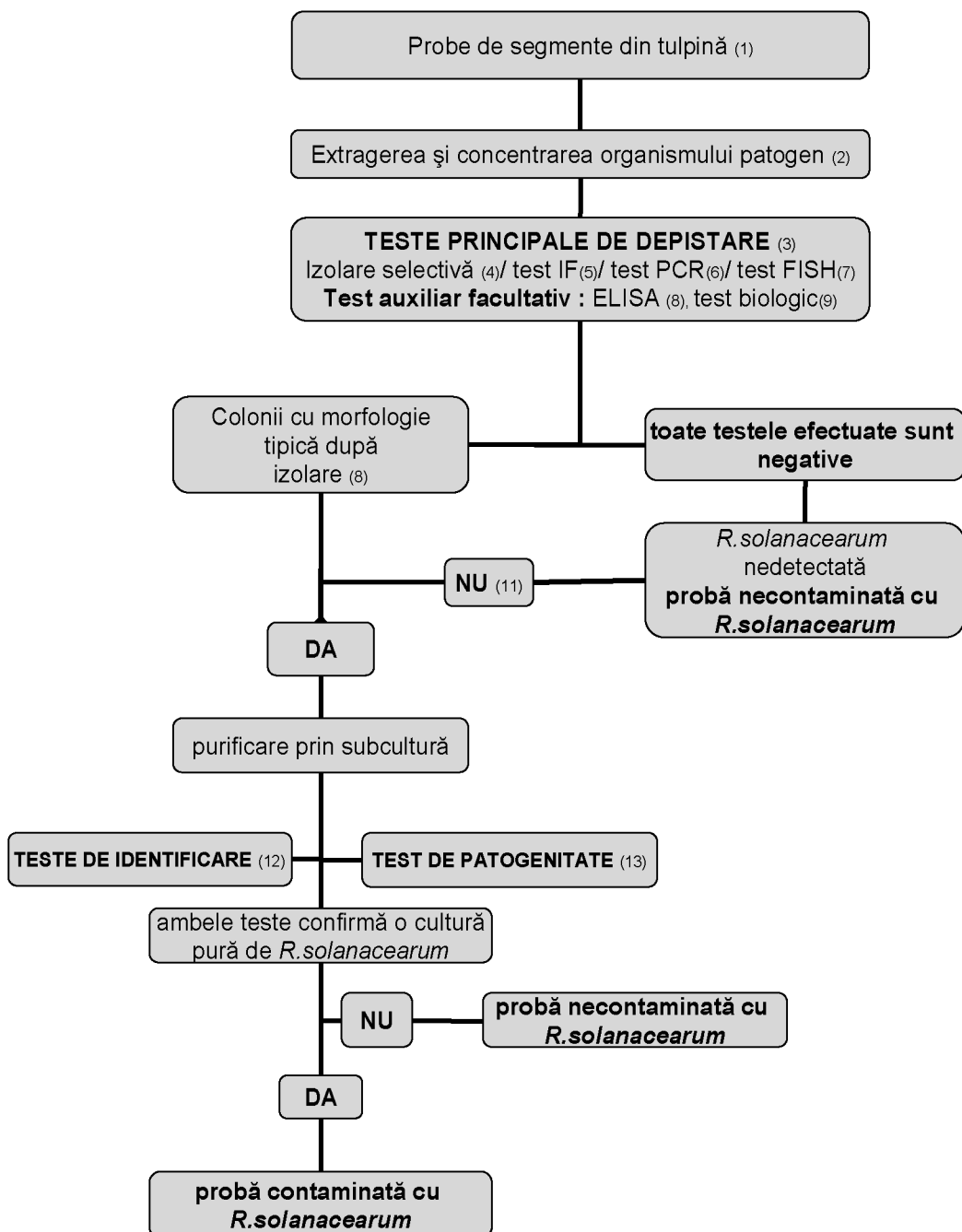
(11) Cultivarea sau testele biologice riscă să eșueze din cauza concurenței sau a inhibiției de către bacteriile saprofite. În cazul în care se obțin rezultate pozitive clare în urma testelor rapide de detecție, însă testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare din același extract concentrat sau din țesutul vascular suplimentar prelevat de la talonul tubercuilor tăiați din aceeași proba și, după caz, trebuie testate probele suplimentare.

(12) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolate prezumtive de *Ralstonia solanacearum* necesită efectuarea testelor descrise în secțiunea VI.B.

(13) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

### 3. Procedură pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în probele de plante-gazdă de cartofi și tomate sau alte plante-gazdă asimptomatice

#### Prezentarea diagramei



(1) Pentru mărimea recomandată a probelor a se vedea secțiunea III.2.1.

(2) Extragerea agentului patogen și metodele de concentrare sunt descrise în secțiunea III.2.1.

(3) În cazul în care cel puțin două teste bazate pe principii biologice diferite sunt pozitive, trebuie efectuate izolarea și confirmarea. A se efectua cel puțin un test rapid de detecție. În cazul în care acest test este negativ, proba este considerată ca fiind negativă. În cazul în care acest test este pozitiv, este nevoie de un al doilea sau mai multe teste de detecție rapidă, bazate pe principii biologice diferite, pentru a verifica primul rezultat pozitiv. În cazul în care al doilea test sau celelalte teste sunt negative, proba este considerată ca fiind negativă. Nu sunt necesare alte teste.

(4) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

(5) Testul IF este descris în secțiunea VI.A.5.

(6) Testele PCR sunt descrise în secțiunea VI.A.6.

(7) Testul FISH este descris în secțiunea VI.A.7.

(8) Testele ELISA sunt descrise în secțiunea VI.A.8.

(9) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

(10) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d).

(11) Cultivarea sau testele biologice riscă să eșueze din cauza concurenței sau a inhibiției de către bacteriile saprofite. În cazul în care se obțin rezultate pozitive clare în urma testelor rapide de detecție, însă testele de izolare sunt negative, trebuie repetate testele de izolare.

(12) Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolări prezumtive de *Ralstonia solanacearum* se obține prin efectuarea testelor descrise în secțiunea VI.B.

(13) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

## SECȚIUNEA a II-a

**Metode detaliate pentru detecția bacteriei *Ralstonia solanacearum* la tuberculii de cartof, la plantele-gazdă de cartof și de tomate sau la alte plante-gazdă cu simptome de vestejire bacteriană**

1. **Simptome** (vezi website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

## 1.1. Simptome la cartof

*Pe plante.* Stadiul incipient al infecției în câmp este reprezentat de vestejirea frunzelor înspre vârful plantei în timpul temperaturilor diurne ridicate și de revenirea la aspect normal în timpul nopții. În cursul primelor stadii de vestejire, frunzele rămân verzi, dar mai târziu apare o îngălbenire și o necroză brună. De asemenea, apare epinastia. Vestejirea unui lăstar sau a unor plante întregi devine repede ireversibilă și duce la moartea plantei. Țesutul vascular în secțiune transversală prin tulpina plantelor vestejite poate deveni brun și un exsudat lăptos apare la suprafața tăieturii sau poate fi extras ușor prin presare. Dacă tulpina secționată se așază în poziție verticală în apă, din țesutul vascular se elimină un exsudat vâscos asemănător unui firicel.

*Pe tuberculi.* Se secționează tuberculii de cartof transversal aproape de hil (punctul de inserție cu stolonul) sau longitudinal până la stolon. În stadiul incipient al infecției apare o decolorare galben-sticloasă spre brun-deschis a inelului vascular din care se elimină un exsudat crem-pal în mod spontan după câteva minute. Ulterior, decolorarea vasculară devine de un brun mai distinct, iar necroza se poate extinde la țesutul parenchimatous. În stadii avansate, infecția se propagă la nivelul stolonilor și al ochilor din care se elimină bacterii ce permit aderarea particulelor de sol. Coaja tubercuilor poate prezenta leziuni de culoare brun-roșcat ușor adâncite, provocate de colapsul intern al țesutului vascular. În stadiile avansate ale bolii se dezvoltă putregaiuri fungice și bacteriene.

## 1.2. Simptome la tomate

*Pe plante.* Primul simptom vizibil este vestejirea aparentă a frunzelor tinere. În condiții favorabile agentului patogen (temperatura solului circa 25°C, umiditate saturată), în câteva zile apar epinastia și vestejirea unei părți din plantă sau a întregii plante, ce duc la colapsul total al plantei. În condiții mai puțin favorabile (temperatura solului sub 21°C), vestejirea este mai puțin pronunțată, dar se poate dezvolta un număr mare de rădăcini adventive pe tulpină. Este posibilă observarea unei benzi subțiri unuroase de-a lungul tulpinii, plecând de la baza acesteia, ce dovedește necroza sistemului vascular. În cazul în care tulpina este secționată transversal, din țesuturile vasculare brun-decolorat ale tulpinii se elimină un exsudat bacterian alb sau gălbui.

## 1.3. Simptome la alte plante-gazdă

*Solanum dulcamara* și *Solanum nigrum*. În condiții naturale rareori se observă simptome de vestejire la aceste plante-gazdă, cu excepția cazurilor în care temperatura solului este mai mare de 25°C sau nivelurile de inoculum sunt extrem de ridicate (de exemplu, pentru *Solanum nigrum* care se dezvoltă în vecinătatea plantelor de cartof sau de tomate bolnave). În cazul în care intervine ofilirea, simptomele sunt identice cu cele descrise pentru tomată. Plantele de *Solanum dulcamara* care nu se vestejesc și se dezvoltă cu tulpina și rădăcina în apă pot prezenta o ușoară decolorare brună a țesutului vascular pe partea transversală a tulpinii sau pe părțile tulpinii aflate sub apă. În cazul în care se pune o tulpină tăiată în poziție verticală în apă, se pot observa fire de exsudat bacterian chiar în absența simptomelor de vestejire.

## 2. Teste rapide de detecție

Testele rapide de detecție facilitează diagnosticul prezumtiv, dar nu sunt esențiale. Se folosesc unul sau mai multe dintre următoarele teste validate:

2.1. Testul eliminării exsudatului bacterian din tulpină (vezi secțiunea VI.A.1)

2.2. Detecția granulelor de poli-β-hidroxitirac (PHB)

Granulele tipice de PHB din celulele de *Ralstonia solanacearum* pot fi vizualizate prin colorarea cu albastru de Nil A sau cu negru de Sudan B (vezi secțiunea VI.A.2) a froiturilor de exsudat bacterian din țesutul infectat, fixate prin flacăra pe o lamă de microscop.

2.3. Testul serologic de aglutinare (vezi secțiunea VI.A.3)

2.4. Alte teste

Alte teste rapide de detecție sunt testul IF (vezi secțiunea VI.A.5), testul FISH (vezi secțiunea VI.A.7), testele ELISA (vezi secțiunea VI.A.8) și testele PCR (vezi secțiunea VI. A.6).

## 3. Procedura de izolare

a) Se îndepărtează exsudatul sau secțiunile de țesut decolorat de la nivelul inelului vascular al tuberculului de cartof sau din căile vasculare ale tulpinii plantei de cartof, plantei de tomată sau de alte plante-gazdă vestejite. Se pune în suspensie, într-un volum mic de apă distilată sterilă sau într-un tampon fosfat de 50 mM (apendicele 4). Se lasă 5–10 minute pe masă.

b) Se prepară o serie de diluții zecimale ale suspensiei.

c) Se transferă 50–100 μl de suspensie și de diluții pe un mediu nutritiv general (NA, YPGA sau SPA; vezi apendicele 2) și/sau pe mediul de tetrazoliu Kelman (apendicele 2) și/sau pe un mediu selectiv validat (de exemplu, SMSA; vezi apendicele 2). Se însămânțează printr-o tehnică corespunzătoare. În cazul în care se consideră util, separat, se însămânțează plăci Petrii cu o suspensie diluată de celule de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 drept control pozitiv.

d) Se incubează plăcile timp de 2–6 zile la 28°C.

– Pe mediu nutritiv general, izolatele virulente de *Ralstonia solanacearum* formează colonii fluide, cu margini neregulate, plate, albicioase, deseori cu verticile caracteristice în centru. Formele avirulente de *Ralstonia solanacearum* formează mici colonii rotunjite, nefluide, untoase, de culoare albicioasă uniformă.

– Pe mediu tetrazoliu Kelman și pe mediu SMSA, verticile sunt de culoare roșu-sângeriu. Formele avirulente de *Ralstonia solanacearum* formează colonii mici, rotunjite, untoase, nefluide de culoare roșu-închis.

4. Teste de identificare a bacteriei *Ralstonia solanacearum*

Testele care permit identificarea izolatelor prezumtive de *Ralstonia solanacearum* sunt prevăzute în secțiunea VI.B.

## SECȚIUNEA a III-a

1. Metode detaliate pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în probe de tuberculi de cartof asimptomatici

## 1.1. Pregătirea probei

NOTE:

– Mărimea standard a unei probe este de 200 de tuberculi. O procedură mai intensivă de prelevare implică efectuarea de teste pe mai multe probe de această mărime. O probă cu un număr mai mare de tuberculi determină o inhibiție sau o interpretare dificilă a rezultatelor. Cu toate acestea, procedura se poate aplica în mod convenabil probelor cu mai puțin de 200 de tuberculi.

– Validarea tuturor metodelor de detecție descrise în continuare se bazează pe efectuarea unor teste pe probe de 200 de tuberculi.

– Extractul de cartof descris în continuare poate fi, de asemenea, utilizat pentru detecția prezenței bacteriei responsabile de putregaiul inelar al cartofului, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opțiuni de pretratere care pot fi efectuate înaintea preparării probei:

a) Se incubează proba la 25–30°C până la două săptămâni pentru a favoriza înainte de efectuarea testelor multiplicarea eventualelor populații bacteriene de *Ralstonia solanacearum*.

b) Se spală tuberculii. Se utilizează dezinfectanți (compuși clorurați în cazul în care testul PCR este folosit pentru a îndepărta ADN patogen) și detergenți corespunzători între fiecare probă. Tuberculii se usucă la aer. Această procedură de spălare este deosebit de utilă (dar nu obligatorie) pentru probele cu particule de sol în exces și în cazul în care se realizează un test PCR sau o procedură de izolare directă.

1.1.1. Cu un bisturiu sau un cuțit pentru legume curat și dezinfectat se îndepărtează coaja de la nivelul hilului (punctul de inserție cu stolonul) fiecărui tubercul, astfel încât să fie vizibil țesutul vascular. Se taie cu atenție un miez mic de țesut vascular (con de țesut vascular) de la nivelul hilului. Cantitatea de țesut extravascular trebuie redusă la minimum (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NOTĂ: Se separă tuberculii (în putrefacție) cu simptome de putregai brun și se testează separat.

În cazul în care, la îndepărtarea conului de țesut vascular de la nivelul hilului, se observă simptome de putregai brun, trebuie să se realizeze o examinare vizuală a tuberculului respectiv și o secționare a acestuia lângă hil. Orice tubercul tăiat care prezintă simptome suspecte trebuie păstrat timp de cel puțin două zile la temperatura ambiantă pentru a permite formarea unui strat de suber, iar apoi depozitat la o temperatură de refrigerare (între 4 și 10°C) în condiții de carantină corespunzătoare. Toți tuberculii, inclusiv cei cu simptome suspecte, trebuie păstrați în conformitate cu anexa nr. III.

1.1.2. Se colectează conurile în recipiente de unică folosință neutilizate care pot fi închise și/sau sigilate (în cazul în care recipientele sunt refolosite, ele trebuie spălate și dezinfectate cu compuși clorinați). Este preferabil ca conurile să fie prelucrate imediat. În cazul în care nu este posibil, acestea se depozitează în recipiente, fără adăugarea unui tampon, pentru cel mult 72 de ore în frigider și cel mult 24 de ore la temperatura ambiantă.

Se prelucrează conurile prin una dintre următoarele proceduri:

a) se acoperă conurile cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) și se agită pe un agitator rotativ (50–100 turații/minut) timp de 4 ore la o temperatură mai mică de 24°C sau la o temperatură de refrigerare timp de 16–24 de ore; sau

b) conurile se omogenizează cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) într-un mixer (de exemplu, Waring sau Ultra Thurax) sau se mărunțesc într-un sac de macerare de unică folosință sigilat (de exemplu, sac Stomacher sau de tip „Bioreba strong gauge polythene” de 150 mm x 250 mm sterilizat prin radiații) cu ajutorul unui ciocan de cauciuc sau al unui dispozitiv de măcinare corespunzător (de exemplu, Homex).

NOTĂ: Riscul de contaminare încrucișată a probelor este considerabil în cazul în care probele sunt omogenizate într-un mixer. A se lua măsuri de precauție pentru a se evita producerea de aerosoli sau scurgeri în timpul procesului de extracție. A se utiliza palete de mixer și recipiente sterilizate pentru fiecare probă. La efectuarea testului PCR, se evită transferul de ADN pe recipientele sau dispozitivele de măcinare. În cazul în care se recurge la testul PCR, se recomandă măcinarea în saci de unică folosință și utilizarea de tuburi de unică folosință.

1.1.3. Se decantează supernatantul. În cazul în care acesta este prea tulbure, se filtrează printr-o centrifugare la viteză mică (la 180 g maximum timp de 10 minute, la o temperatură de 4–10°C) sau printr-o filtrare în vid (40–100 μm), spălându-se filtrul cu un tampon de macerare suplimentar (10 ml).

1.1.4. Bacteriile se concentrează prin centrifugare la 7.000 g timp de 15 minute (sau la 10.000 g timp de 10 minute) la o temperatură de 4–10°C și se îndepărtează supernatantul fără a deranja sedimentul (extract concentrat).

1.1.5. Sedimentul se resuspendă în 1,5 ml tampon concentrat (apendicele 4). Se folosesc 500 μl pentru a testa *Ralstonia solanacearum*, 500 μl pentru *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* și 500 μl pentru referință. Se adaugă glicerol steril la concentrația finală de 10–25 % (volum) la 500 μl de alicote de referință și la alicota de testare rămasă, se omogenizează în vortex și se depozitează la o temperatură situată între – 16 și – 24°C (săptămâni) sau între – 68 și – 86°C (luni). Alicotele de testare se păstrează în timpul testelor la o temperatură de 4–10°C.

Nu se recomandă congelările și decongelările repetate.

În cazul în care extractele trebuie transportate, livrarea trebuie efectuată într-o geantă frigorifică în termen de 24 de ore.

1.1.6. Este absolut necesar ca toate controalele pozitive de *Ralstonia solanacearum* și probele să fie tratate separat pentru a evita orice contaminare. Această condiție se aplică atât pentru lamele de imunofluorescență, cât și pentru toate testele.

## 1.2. Testele

A se vedea diagrama și descrierea testelor și a protocoalelor optimizate în apendicele corespunzătoare:

*Izolare selectivă* (vezi secțiunea VI.A.4)

*Testul IF* (vezi secțiunea VI.A.5)

*Testele PCR* (vezi secțiunea VI.A.6)

*Testul FISH* (vezi secțiunea VI.A.7)

*Testele ELISA* (vezi secțiunea VI.A.8)

*Testul biologic* (vezi secțiunea VI.A.9)

## 2. Metode detaliate pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în probe de plante de cartof și plante de tomate sau alte plante-gazdă asimptomatice

### 2.1. Pregătirea probei

NOTĂ: Pentru detecția populațiilor latente de *Ralstonia solanacearum*, se recomandă testarea unor serii de probe. Procedura poate fi aplicată cu ușurință probelor care conțin până la 200 de bucăți de tulpini. În cazul în care se efectuează supravegheri, acestea trebuie bazate pe o probă reprezentativă din punct de vedere statistic pentru populația vegetală în cauză.

2.1.1. Se colectează bucăți de tulpină de 1–2 cm într-un recipient steril închis, în conformitate cu următoarele proceduri de prelevare:

*Plantule de tomată (răsaduri)*: cu ajutorul unui cuțit curat și dezinfectat se taie o bucată de 1 cm la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra nivelului solului.

*Plante de tomate cultivate în seră sau în câmp*: cu ajutorul unui cuțit curat și dezinfectat se îndepărtează lăstarul cel mai de jos al fiecărei plante, tăind chiar deasupra joncțiunii cu tulpina principală. Se îndepărtează o bucată de 1 cm de la baza fiecărui lăstar lateral.

*Alte plante-gazdă*: cu ajutorul unui cuțit sau al unei foarfeci de grădină curate și dezinfectate se taie o bucată de 1 cm de la baza fiecărei tulpini, chiar deasupra nivelului solului. În cazul buruienii *Solanum dulcamara* sau al altor plante-gazdă care cresc în apă, se taie bucăți de 1–2 cm din tulpinile care se găsesc sub apă sau din stolonii cu rădăcini acvatic.

În caz de prelevare într-o anumită zonă, se recomandă să se testeze o probă reprezentativă din punct de vedere statistic de cel puțin 10 plante pe punct de prelevare pentru fiecare potențială buruiănă-gazdă. Detecția agentului patogen se face

În modul cel mai fiabil la sfârșitul primăverii, vara și toamna, deși infecțiile naturale pot fi detectate pe tot parcursul anului la plantele perene de *Solanum dulcamara* care cresc în apă. Gazdele cunoscute sunt plantele spontane de cartof, *Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*, *Datura stramonium* și alte specii din familia *Solanaceae*. *Pelargonium* spp. și *Portulaca oleracea* sunt, de asemenea, plante-gază. Printre anumite buruieni europene care pot găzdui la nivelul rădăcinii și/sau rizosferei tulpini virulente de *Ralstonia solanacearum* biovar 2, rasa 3, în condiții de mediu specifice, se numără *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* și *Urtica dioica*.

NOTĂ: În această etapă se poate efectua examinarea vizuală a simptomelor interne (colorație vasculară sau exsudat bacterian). Se separă orice bucată de tulpină cu simptome și se testează în mod separat (vezi secțiunea II).

2.1.2. Se efectuează o dezinfectare scurtă a bucăților de tulpină cu etanol de 70% și se usucă de îndată cu ajutorul hârtiei absorbante. Apoi se prelucrează bucățile de tulpină în conformitate cu una dintre următoarele proceduri:

a) se acoperă cu un volum suficient (circa 40 ml) de tampon de extracție (apendicele 4) și se agită pe un agitator rotativ (50–100 turații/minut) timp de 4 ore la o temperatură mai mică de 24°C sau la o temperatură de refrigerare timp de 16–24 de ore; sau

b) bucățile de tulpină se zdrobesc de îndată într-un sac de macerare rezistent (de exemplu, Stomacher sau Bioreba) cu un

volum corespunzător de tampon de extracție (apendicele 4), cu ajutorul unui ciocan de cauciuc sau al unui dispozitiv de măcinare corespunzător (de exemplu, Homex). În cazul în care acest lucru nu este posibil, bucățile se păstrează, fără a depăși 72 de ore, la temperatură de refrigerare sau 24 de ore la temperatura ambiantă.

2.1.3. Se decantează supernatantul după o sedimentare de 15 minute.

2.1.4. De obicei, nu este necesară o limpezire suplimentară a extractului sau a concentratului decantat, dar poate fi realizată prin filtrare și/sau centrifugare în conformitate cu metoda prevăzută la pct. 1.1.3–1.1.5.

2.1.5. Se împarte extractul inițial sau concentrat în două părți egale. Se păstrează jumătate la o temperatură de 4–10°C pe parcursul testului și se conservă cealaltă jumătate cu 10–25 % (volum) glicerol steril la o temperatură situată între – 16 și – 24°C (săptămâni) sau între – 68 și – 86°C (luni), în cazul în care este necesar un test suplimentar.

## 2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor și protocoalelor optimizate în apendicele corespunzătoare:

*Izolarea selectivă* (vezi secțiunea VI. A.4)

*Testul IF* (vezi secțiunea VI. A.5)

*Testele PCR* (vezi secțiunea VI. A.6)

*Testul FISH* (vezi secțiunea VI. A.7)

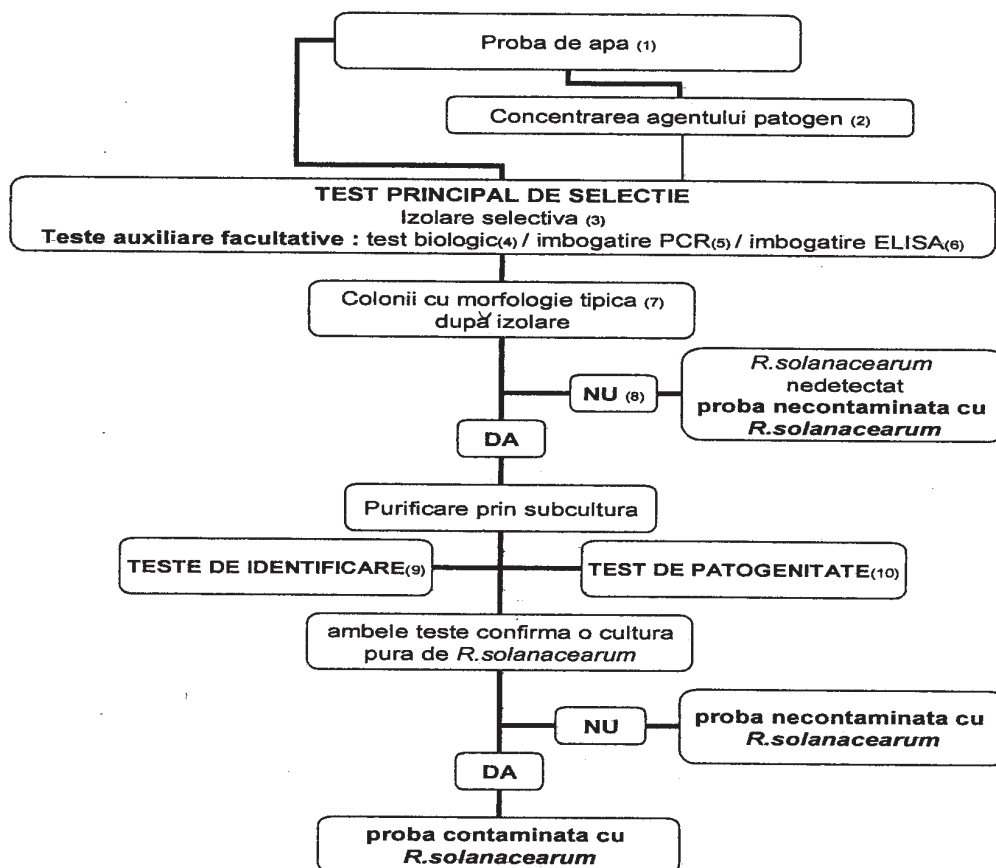
*Testele ELISA* (vezi secțiunea VI. A.8)

*Testul biologic* (vezi secțiunea VI. A.9)

### SECȚIUNEA a IV-a

#### 1. Procedură pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în apă

##### Prezentarea diagramei



(1) A se vedea secțiunea IV.2.1 pentru procedurile de prelevare recomandate.

(2) Metodele de concentrare a agentului patogen sunt descrise în secțiunea IV.2.1. Concentrarea sporește populațiile agentului patogen și ale bacteriilor saprofite concurente și este recomandată numai în cazul în care nu determină inhibarea testului de izolare.

(3) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

## 2. Metode pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în apă

### Principiu

Procedura de detecție validată descrisă în prezenta secțiune se aplică pentru detecția agentului patogen în probe de apă de suprafață și poate fi folosită, de asemenea, pentru a testa probele de deșeuri lichide provenite din prelucrarea cartofilor sau probele provenite din ape reziduale. Cu toate acestea, trebuie reținut faptul că sensibilitatea de detecție variază în funcție de substrat. Sensibilitatea testului de izolare este afectată de populațiile de bacterii saprofite concurente care sunt, în general, mult mai numeroase în probele provenite din prelucrarea cartofilor și din ape reziduale decât în apele de suprafață. În timp ce procedura descrisă în continuare trebuie să detecteze numai  $10^3$  celule/l în apele de suprafață, sensibilitatea de detecție în deșeurile provenite din prelucrarea cartofilor sau ape reziduale poate fi mult mai slabă. Din acest motiv, se recomandă testarea deșeurilor după eventualele tratamente de purificare (de exemplu, sedimentare sau filtrare) pe parcursul cărora se reduc populațiile de bacterii saprofite. Limitele sensibilității procedurii de testare trebuie avute în vedere atunci când se evaluează fiabilitatea rezultatelor negative obținute, după caz. Deși această procedură a fost efectuată cu succes în studiile destinate să stabilească prezența sau absența agentului patogen în apele de suprafață, limitele sale trebuie luate în considerare atunci când este utilizată în lucrări asemănătoare privind deșeurile provenite din prelucrarea cartofilor sau apelor reziduale.

### 2.1. Pregătirea probei

#### NOTE:

– Detecția bacteriei *Ralstonia solanacearum* în apele de suprafață se face în mod mai fiabil la sfârșitul primăverii, vara și toamna, atunci când temperatura apei este mai mare de  $15^{\circ}\text{C}$ .

– Reînceperea prelevării în momente diferite pe parcursul perioadei menționate anterior în punctele de prelevare desemnate va spori fiabilitatea detecției, reducând consecințele variațiilor climatice.

– Trebuie să se țină seama de consecințele ploilor abundente și de geografia cursului apei pentru a evita efectele de diluare considerabile care pot ascunde prezența agentului patogen.

– Se prelevă probe de apă de suprafață în apropierea plantelor-gazdă în cazul în care aceste plante-gazdă sunt prezente.

2.1.1. În punctele de prelevare selecționate, probele de apă se colectează prin umplerea unor tuburi sau sticle sterile de unică folosință la o adâncime, atunci când este posibil, mai mare de 30 cm și la o distanță maximă de 2 m de la mal. Pentru deșeurile provenite din prelucrarea cartofilor sau pentru apele reziduale, se colectează probe din punctul de deversare a acestora. Mărimea recomandată a probelor poate atinge 500 ml pe punct de prelevare. În cazul în care se preferă probe mai mici, se recomandă prelevarea probelor cel puțin în 3 reprize pe punct de prelevare, fiecare probă constând din două subprobe duplicate de cel puțin 30 ml. Pentru un studiu intensiv, se selecționează cel puțin 3 puncte de prelevare pentru 3 km de curs al apei și se prelevă și din afluenții cursului de apă.

2.1.2. Se transportă probele în condiții de refrigerare ( $4-10^{\circ}\text{C}$ ) și la întineric și se testează pe parcursul a 24 de ore.

2.1.3. La nevoie, probele pot fi concentrate prin una dintre următoarele metode:

a) se centrifughează 30–50 ml de subprobă la 10.000 g timp de 10 minute (sau la 7.000 g timp de 15 minute), preferabil la  $4-10^{\circ}\text{C}$ , se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul se resuspendă în 1 ml de tampon concentrat (vezi apendicele 4).

b) Filtrare pe membrană (dimensiunea minimă a porilor, de  $0,45\ \mu\text{m}$ ) urmată de spălarea filtratului în 5–10 ml de tampon concentrat și reținerea soluțiilor de spălare. Această metodă este adecvată pentru volume mari de probe de apă, cu conținut mic de organisme saprofite.

În general, concentrarea nu se recomandă pentru probele de deșeuri provenite din prelucrarea cartofilor sau din ape reziduale, dat fiind faptul că populațiile mai mari de bacterii saprofite concurente vor avea un efect inhibitor asupra detecției bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

### 2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor în apendicii corespunzătoare.

<sup>(4)</sup> Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

<sup>(5)</sup> Metodele de îmbogățire PCR sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.6.

<sup>(6)</sup> Metodele de îmbogățire ELISA sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.8.

<sup>(7)</sup> Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d).

<sup>(8)</sup> Cultivarea riscă să eșueze din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care populațiile mari de saprofite sunt suspectate că ar putea afecta fiabilitatea izolării, testele de izolare trebuie reîncepute după diluarea probei în apă sterilă.

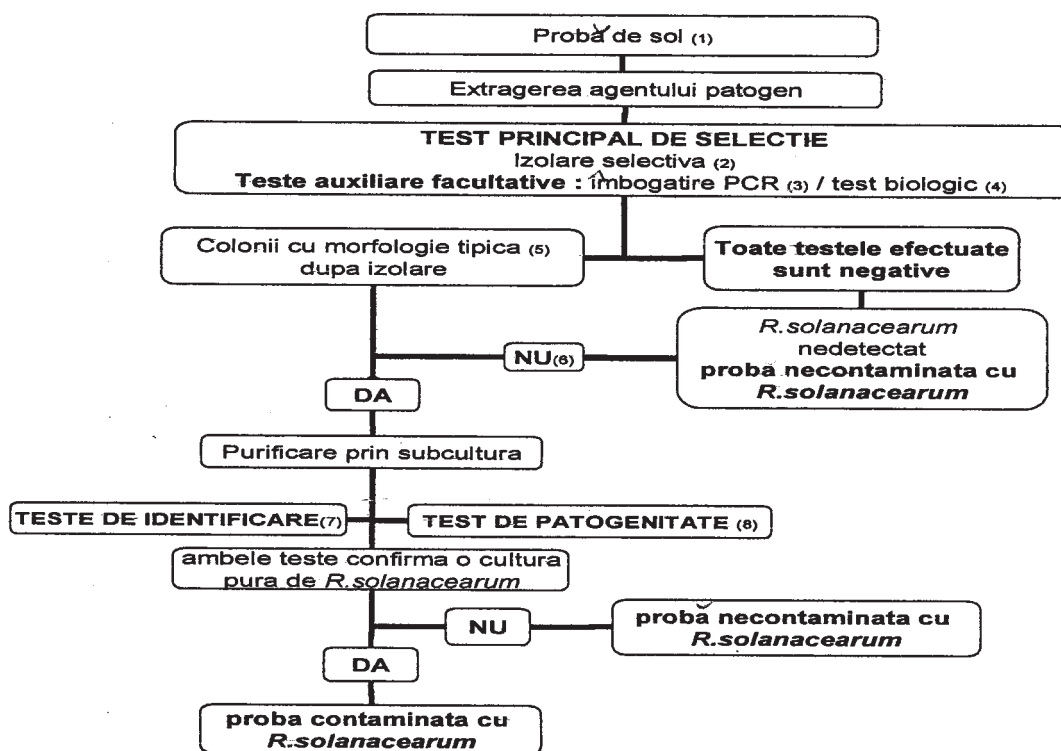
<sup>(9)</sup> Identificarea fiabilă a culturilor pure de izolate prezumtive de *Ralstonia solanacearum* necesită efectuarea testelor descrise la secțiunea VI.B.

<sup>(10)</sup> Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

## SECȚIUNEA a V-a

1. Procedură pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în sol

## Prezentarea diagramei



(1) A se vedea pct. V.2.1 pentru procedurile de prelevare recomandate.

(2) Testul de izolare selectivă este descris în secțiunea VI.A.4.

(3) Metodele de îmbogățire PCR sunt descrise în secțiunile VI.A.4.2 și VI.A.6.

(4) Testul biologic este descris în secțiunea VI.A.9.

(5) Morfologia tipică a coloniei este descrisă în secțiunea II.3.d.

(6) Cultivarea riscă să eșueze din cauza concurenței sau a efectului inhibitor al bacteriilor saprofite. În cazul în care populațiile mari de bacterii saprofite sunt suspectate că ar putea afecta fiabilitatea izolării, testele de izolare trebuie reîncepute după o nouă diluție a probei.

(7) Identificarea fiabilă a culturilor pure prezumtive de *Ralstonia solanacearum* necesită efectuarea testelor descrise la secțiunea VI.B.

(8) Testul de patogenitate este descris în secțiunea VI.C.

## 2. Metode pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* în sol

### Principii

Procedura de detecție validată descrisă în prezenta secțiune se aplică pentru detecția agentului patogen în probe de sol, dar poate fi, de asemenea, utilizată pentru a testa probele de deșeuri solide provenite din prelucrarea cartofilor sau a nămolului de epurare. Cu toate acestea, trebuie remarcat faptul că aceste metode nu sunt destul de sensibile pentru a garanta detecția populațiilor de *Ralstonia solanacearum* cu densitate mică sau dispersate inegal, care ar putea apărea în probele infectate în mod natural cu aceste substraturi.

Limita de sensibilitate a acestei proceduri de testare trebuie avută în vedere la evaluarea fiabilității rezultatelor negative obținute și, de asemenea, la utilizarea sa în studiile destinate să stabilească prezența ori absența agentului patogen în soluri sau în nămol. Cel mai fiabil test de detecție a prezenței agentului patogen în solul unui câmp este plantarea unei plante-gazdă sensibile și supravegherea infectării eventuale a acesteia, însă nici această metodă nu va permite detecția unui nivel slab de contaminare.

### 2.1. Pregătirea probei

2.1.1. Prelevarea solului din câmp trebuie să respecte standardele de bază utilizate pentru prelevarea nematozilor. Se colectează 0,5–1 kg de sol per probă în 60 de puncte, pe o suprafață de 0,3 ha, la o adâncime de 10–20 cm (sau dintr-o grilă de 7 x 7 m). În cazul în care se suspectează prezența

agentului patogen, se mărește numărul de puncte de colectare la 120 pe o suprafață de 0,3 ha. Înainte de testare, probele se păstrează la o temperatură de 12–15°C. Se colectează în total 1 kg de nămol provenit din prelucrarea cartofilor și nămol de epurare în locurile care reprezintă volumul total de nămol de testat. Înainte de testare, fiecare probă se amestecă bine.

2.1.2. Se împart probele în subprobe de 10–25 g de sol sau de nămol cu ajutorul unui agitator rotativ (250 turații/minut) în tampon de extracție de 60–150 ml (apendice 4) timp de două ore cel mult. După caz, pentru a favoriza dispersia, se adaugă 0,02 % de Tween 20 steril și 10–20 g de pietriș steril.

2.1.3. Suspensia se păstrează, în timpul testului, la 4°C.

### 2.2. Teste

A se vedea diagrama și descrierea testelor în apendicii corespunzătoare.

## SECȚIUNEA a VI-a

## Protocoale optimizate pentru detecția și identificarea bacteriei *Ralstonia solanacearum*

### A. DIAGNOSTIC ȘI TESTE DE DETECȚIE

#### 1. Testul eliminării exudatului bacterian din tulpină

Prezența bacteriei *Ralstonia solanacearum* în tulpini ofilite de cartof, tomate sau de alte plante-gazdă poate fi pusă în evidență prin următorul test simplu prezumtiv: se secționează

tulpina chiar deasupra nivelului solului. Se suspendă extremitatea tăiată într-un tub cu apă curată. După câteva minute se observă scurgeri spontane și caracteristice de fire de exudat bacterian din fasciculele vasculare tăiate.

## 2. Detectia granulelor de poli-β-hidroxibutirat

1. Se prepară un frotiu din exudatul bacterian scurs din țesutul infectat pe o lamă de microscop sau se prepară un frotiu dintr-o cultură de 48 de ore de pe mediu YPGA sau SPA (apendice 2).
2. Se prepară frotiuri de control pozitiv din culturi de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 și, în cazul în care se consideră necesar, un frotiu de control negativ cunoscut PHB negativ.
3. Se lasă la uscat și se trece rapid partea inferioară a fiecărei lame de câteva ori prin flacăra până la fixarea frotiului.
4. Se colorează frotiul preparat cu albastru de Nil sau negru de Sudan și se examinează la microscop după cum urmează.

### Testul cu albastru de Nil

- a) Fiecare lamă se scufundă într-o soluție apoasă 1 % de albastru de Nil A și se incubează 10 minute la 55°C.
- b) Se scurge soluția colorantă. Se spală rapid sub jet de apă. Excesul de apă se îndepărtează cu hârtie absorbantă.
- c) Frotiul se scufundă într-o soluție apoasă de acid acetic de 8 % și se incubează un minut la temperatura ambiantă.
- d) Se spală rapid sub jet de apă. Excesul de apă se îndepărtează cu hârtie absorbantă.
- e) Se umezește cu o picătură de apă și se aplică o lamelă de acoperire.
- f) Se examinează frotiul colorat la un microscop cu epifluorescență de 450 nm cu ulei de imersie, la o mărire de 600–1.000, folosindu-se un obiectiv de imersie în ulei sau în apă.

g) Se observă fluorescența portocalie strălucitoare a granulelor PHB. De asemenea, se observă la lumină albă pentru a avea certitudinea că granulele sunt intracelulare și că morfologia celulei este tipică pentru *Ralstonia solanacearum*.

### Testul cu negru de Sudan

- a) Fiecare lamelă se scufundă într-o soluție de 0,3 % negru de Sudan B în 70 % etanol și se incubează 10 minute la temperatura ambiantă.
- b) Se scurge soluția colorantă și se spală rapid sub jet de apă. Se îndepărtează excesul de apă cu hârtie absorbantă.
- c) Lamele se trec rapid prin xilol și se usucă cu hârtie absorbantă. *Atenție! Xilolul este un produs periculos. Luați măsurile de precauție necesare și lucrați într-o hotă chimică.*
- d) Se scufundă lamele în soluție apoasă de safranină 0,5 % și se lasă 10 secunde la temperatura ambiantă. *Atenție! Safranina este un produs periculos. Luați măsurile de precauție necesare și lucrați într-o hotă chimică.*
- e) Se spală sub jet de apă. Se usucă cu hârtie absorbantă și se acoperă cu o lamelă.

f) Se examinează frotiul colorat la un microscop optic, folosindu-se obiectivul de imersie la o mărire de 1.000.

g) Se observă granulele de PHB în celulele de *Ralstonia solanacearum* care se colorează în albastru-negru. Membrana celulară se colorează în roz.

## 3. Teste serologice de aglutinare

Agglutinarea celulelor de *Ralstonia solanacearum* în exudatul bacterian sau în extractele de țesuturi simptomatice se observă cel mai bine folosindu-se anticorpi validați (vezi apendice 3) etichetați cu markeri colorați corespunzători, precum celulele de *Staphylococcus aureus* roșu sau particule de latex colorate. În caz de utilizare a unui material disponibil în comerț (vezi apendice 3), se urmează instrucțiunile producătorului. În caz contrar, se urmează procedura descrisă în continuare:

a) Se amestecă picăturile unei suspensii de anticorpi și de exudat bacterian marcate (circa 5 μl în fiecare caz) pe ferestrele lamelor de testare cu multe godeuri;

b) Se prepară suspensii de control pozitiv și negativ din suspensii de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 și dintr-o tulpina heterologă;

c) Se observă aglutinarea în probele pozitive după o omogenizare ușoară timp de 15 secunde.

## 4. Izolarea pe mediu selectiv

### 4.1. Însămânțare pe mediu selectiv

NOTĂ: Înainte de aplicarea acestei metode pentru prima dată, se efectuează teste preliminare pentru a garanta o detecție reproductibilă a  $10^3$ – $10^4$  celule formatoare de colonii (cfu) per ml de *Ralstonia solanacearum* adăugată la extractele care au dat rezultate negative la testele anterioare.

Se folosește un mediu selectiv validat corespunzător, de exemplu, SMSA (modificat de Elphinstone *et al.*, 1996; vezi apendicele 2).

De asemenea, trebuie diferențiată *Ralstonia solanacearum* de alte bacterii care pot dezvolta colonii în mediul respectiv. În plus, coloniile de *Ralstonia solanacearum* pot prezenta o morfologie atipică în cazul în care plăcile sunt suprapopulate sau în cazul în care sunt, de asemenea, prezente bacterii antagoniste. În cazul în care se suspectează efectele de concurență sau de antagonism, proba trebuie testată din nou, utilizându-se o metodă de testare diferită.

Cea mai mare sensibilitate de detecție, în cadrul acestei metode, poate fi atinsă în cazul în care se folosesc extracte de probe proaspăt preparate. Cu toate acestea, metoda se aplică, de asemenea, extractelor cu glicerol păstrate la o temperatură cuprinsă între – 68 și – 86°C.

Se prepară, pentru control pozitiv, diluții zecimale de suspensie de  $10^6$  ufc/ml dintr-o tulpină virulentă biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* (de exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Pentru a se evita orice posibilitate de contaminare, controalele pozitive se prepară complet separat de probele de testat.

Pentru fiecare lot de mediu selectiv proaspăt pregătit, acesta trebuie testat pentru a se vedea dacă este propice înmulțirii agentului patogen înainte de a-l utiliza pentru testarea probelor de rutină.

Materialul de control se testează în același mod ca și probele.

4.1.1. Testul se efectuează cu ajutorul unei tehnici corespunzătoare de însămânțare cu scopul de a asigura diluarea întregii populații care formează colonii de saprofite. Se însămânțează 50–100 μl din fiecare probă de extract și fiecare diluție.

4.1.2. Plăcile se incubează la 28°C. Citirea plăcilor se face după 48 de ore, iar apoi zilnic pe o perioadă de până la 6 zile. Coloniile tipice de *Ralstonia solanacearum* în mediul nutritiv SMSA sunt de culoare alb-lăptos, plate, neregulate și fluide, iar după 3 zile de incubare dezvoltă o colorație roz spre roșu-sângeriu în centru, prezentând spirale sau striații interne sau verticile (a se vedea website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NOTĂ: Uneori, în acest mediu se formează colonii atipice de *Ralstonia solanacearum*. Ele pot fi mici, în întregime de culoare roșie și nefluide sau parțial fluide, fiind, prin urmare, greu de deosebit de bacteriile saprofite care formează colonii.

4.1.3. Coloniile prezumtive de *Ralstonia solanacearum* se purifică după însămânțare și însămânțare pe mediu nutritiv general pentru a obține colonii izolate (a se vedea apendicele 2).

4.1.4. Culturile pot fi păstrate pe termen scurt în apă sterilă (pH 6–8, fără clor) la temperatura ambiantă la întuneric sau pe termen lung într-un mediu crioprotector corespunzător între – 68 și – 86°C sau liofilizate.

4.1.5. Se identifică culturile prezumtive (vezi secțiunea VI. B) și se efectuează un test de patogenitate (vezi secțiunea VI. C).



*Interpretarea rezultatelor testului de izolare pe mediu selectiv*

Testul de însămânțare pe mediu selectiv este negativ atunci când după 6 zile nu sunt observate colonii bacteriene sau atunci când nu sunt observate colonii caracteristice *Ralstonia solanacearum*, cu condiția să nu fie suspectată o inhibiție datorată competiției sau antagonismului cu alte bacterii și în cazul controalelor pozitive să fie observate colonii caracteristice de *Ralstonia solanacearum*.

Testul de însămânțare pe mediu selectiv este pozitiv atunci când sunt observate colonii prezumtive de *Ralstonia solanacearum*.

**4.2. Procedura de îmbogățire**

A se utiliza un mediu de îmbogățire validat precum mediul nutritiv modificat Wilbrink (a se vedea apendicele 2).

Această procedură poate fi folosită pentru a crește în mod selectiv populațiile de *Ralstonia solanacearum* în probe și pentru a crește sensibilitatea detecției. Procedura permite, de asemenea, diluarea eficientă a inhibitorilor reacției PCR (1:100). Cu toate acestea, trebuie notat faptul că îmbogățirea bacteriei *Ralstonia solanacearum* poate eșua din cauza concurenței sau antagonismului organismelor saprofite care sunt de multe ori îmbogățite simultan. În consecință, izolarea bacteriei *Ralstonia solanacearum* pe medii nutritive de cultură îmbogățite poate fi dificilă. De asemenea, întrucât populațiile de saprofite apropiate din punct de vedere serologic se pot înmulți, în cazul utilizării testului ELISA, se recomandă utilizarea de anticorpi monoclonali specifici în locul anticorpilor policlonali.

4.2.1. Îmbogățirea pentru PCR presupune transferul a 100  $\mu$ l de extract de probă în 10 ml de mediu nutritiv lichid de îmbogățire (apendicele 2) alicotat anterior în tuburi sau flacoane fără urme de ADN. Pentru îmbogățirea ELISA, se pot folosi proporții mai mari de mediu nutritiv lichid (de exemplu, 100  $\mu$ l în 1,0 ml de mediu nutritiv lichid de îmbogățire).

4.2.2. Se incubează timp de 72 de ore între 27 și 30°C într-o cultură agitată sau statică fără a închide ermetic dopul tubului, pentru a permite aerisirea.

4.2.3. Se amestecă bine înainte de a se utiliza pentru testele ELISA sau PCR.

4.2.4. În testele anterioare, mediul nutritiv lichid de îmbogățire se tratează în același mod ca și probele.

NOTĂ: În cazul în care se prevede o inhibiție a îmbogățirii bacteriei *Ralstonia solanacearum* din cauza populațiilor considerabile de anumite bacterii saprofite concurente, îmbogățirea extractelor de probe înainte de centrifugare sau alte etape de concentrare pot determina obținerea unor rezultate mai bune.

**5. Testul de imunofluorescență***Principiu*

Ținându-se seama de capacitatea sa recunoscută de a atinge pragurile impuse, se recomandă utilizarea testului de imunofluorescență ca principal test de detecție rapidă.

În cazul în care testul de imunofluorescență este utilizat ca principal test de detecție rapidă și rezultatul lui este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare, un test PCR sau un test FISH drept test secundar. În cazul în care testul de imunofluorescență este utilizat ca test secundar și rezultatul lui este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare după cum prevede diagrama funcțională.

NOTĂ: Se utilizează o sursă validată de anticorpi de *Ralstonia solanacearum* (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomandă stabilirea titrului pentru fiecare lot nou de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai mare diluție la care se obține o reacție optimă atunci când se testează o suspensie de  $10^5$ – $10^6$  celule pe ml din tulpina omologă de *Ralstonia solanacearum* folosindu-se un conjugat corespunzător de izotiocianat de

fluoresceină (FITC), în conformitate cu recomandările producătorului. Toate antiserurile policlonale validate au un titru de imunofluorescență de cel puțin 1: 2.000. La efectuarea testului, diluțiile de lucru ale anticorpilor trebuie să fie aproximativ egale sau egale cu cele ale titrului.

Testul trebuie efectuat cu extracte de probe proaspăt preparate. După caz, se pot folosi și extracte conservate în soluție de glicerol la o temperatură cuprinsă între – 68°C și –86°C. Glicerolul poate fi separat de probă prin adăugarea a 1 ml de tampon concentrat (vezi apendicele 4), recentrifugarea timp de 15 minute la 7.000 g și resuspendarea în același volum de tampon concentrat. Acest lucru este rareori necesar, mai ales atunci când probele sunt fixate de lame prin flambare.

Separat se prepară lame de control pozitiv dintr-o tulpină omologă sau orice altă tulpină de referință de *Ralstonia solanacearum* în suspensie în extract de cartof, după cum prevede apendicele 3 B, și, facultativ, în tampon.

În cazul în care este posibil, ar trebui să se folosească drept control similar pe aceeași lamă țesut infectat în mod natural (conservat prin liofilizare sau congelare la o temperatură între – 16 și – 24°C).

În calitate de control negativ, se pot folosi alicote de extracte de probe care au dat rezultate negative la testele anterioare de detecție a bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate disponibile pentru acest test sunt prevăzute în apendicele 3.

Se folosesc pentru microscop lame cu multe godeuri, având, de preferință, 10 ferestre cu diametru de cel puțin 6 mm.

Materialul de control se testează în același mod ca și probele.

5.1. Lamele-test se prepară folosindu-se una dintre următoarele metode:

(i) Extracte concentrate cu relativ puțin amidon:

Se pipetează un volum standard (15  $\mu$ l este adecvat unui godeu de 6 mm diametru – volumul se mărește pentru godeuri cu diametru mai mare) dintr-o diluție de 1/100 de sediment resuspendat în primul godeu. Apoi se pipetează un volum similar de sediment nediluat (1/1) în godeurile rămase din primul rând al lamei. Al doilea rând poate fi folosit ca duplicat sau pentru o a doua probă, în conformitate cu cele indicate în figura 1.

(ii) Pentru alte extracte concentrate:

Se pregătesc diluții zecimale (1/10, 1/100) din sedimentul resuspendat în tampon concentrat. Se pipetează un volum standard (15  $\mu$ l este adecvat unui godeu de 6 mm diametru – volumul se mărește pentru godeuri cu un diametru mai mare) din sedimentul resuspendat și din fiecare diluție pe un rând de godeuri. Al doilea rând poate fi folosit ca duplicat sau pentru o a doua probă, în conformitate cu cele prezentate în figura 2.

5.2. Se lasă picăturile să se usuce la temperatura ambiantă sau prin încălzire la o temperatură de 40–45°C. Celulele bacteriene se fixează pe lamă fie prin încălzire (15 minute la 60°C), trecere prin flacăra, cu 95 % etanol sau în conformitate cu instrucțiunile specifice ale furnizorilor de antiseruri.

În cazul în care este necesar, lamele fixate pot fi stocate la congelator într-o cutie uscată, atât cât este necesar (cel mult 3 luni), înainte de un nou test.

5.3. Procedura testului de imunofluorescență

(i) În conformitate cu metoda de pregătire a lamelor-test indicată la pct. 5.1 (i):

Se prepară un set de diluții de 1/2. În primul godeu diluția ar trebui să fie de 1/2 din titru (T/2), celelalte fiind de 1/4 din titru (T/4), 1/2 din titru (T/2), titru (T) și de două ori titrul (2T).

(ii) În conformitate cu metoda de pregătire a lamelor-test indicată la punctul 5.1(ii):

Se prepară diluția de lucru a anticorpilor în tampon IF. Diluția de lucru are efect asupra specificității.

Figura 1: Pregătirea lamei-test în conformitate cu pct. 5.1 (i) și 5.3 (i)

#### Diluții ale extractului concentrat resuspendat

1/100 1/1 1/1 1/1 1/1 Diluții ale extractului concentrat resuspendat  
 (T = T/2 T/4 T/2 T 2T Diluții duble ale antiserului/anticorpilor  
 titru)

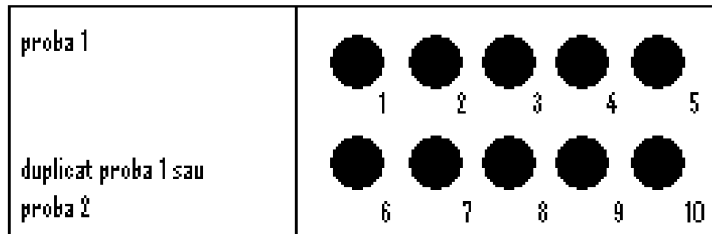
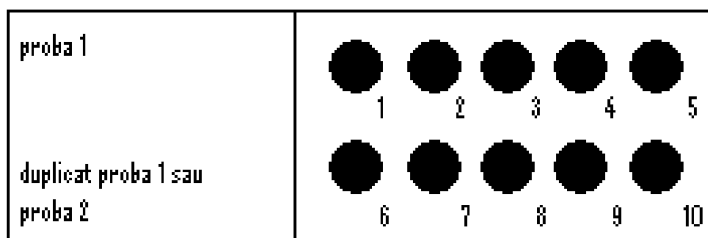


Figura 2: Pregătirea lamei-test în conformitate cu pct. 5.1 (ii) și 5.3 (ii)

#### Diluție de lucru a antiserului/anticorpilor

Diluție zecimală a sedimentului resuspendat  
 1/1 1/10 1/100 gol gol



5.3.1. Lamele se așază pe hârtie absorbantă umedă. Se acoperă complet fiecare godeu de test cu diluția sau diluțiile de anticorpi. Volumul de antiser pipetat în fiecare godeu trebuie să fie cel puțin echivalent cu volumul de extract pipetat pe lamă.

Următoarea procedură ar trebui aplicată în absența instrucțiunilor specifice ale furnizorilor de anticorpi:

5.3.2. Se incubează lamele pe hârtie umedă acoperite timp de 30 de minute la temperatura ambiantă (18–25°C).

5.3.3. Se îndepărtează antiserul de pe fiecare lamă și se spală lamele cu atenție cu tamponul IF. Se spală prin imersare în soluție tampon IF-Tween (apendice 4) timp de 5 minute și apoi în tampon IF. Se evită formarea de aerosoli sau transferul de picături care ar putea conduce la o contaminare încrucișată. Excesul de tampon IF se îndepărtează cu grijă cu o hârtie de filtru.

5.3.4. Lamele se așază pe hârtie umedă. Se acoperă godeurile lamelor-test cu diluții ale conjugatului FITC utilizat pentru determinarea titrului. Volumul de conjugat pipetat în godeuri trebuie să fie egal cu volumul de anticorpi pipetat.

5.3.5. Se incubează lamele pe hârtie umedă, acoperite, timp de 30 de minute la temperatura ambiantă (18–25°C).

5.3.6. Se îndepărtează conjugatul de pe lamă. Se spală în conformitate cu cele indicate anterior (pct. 5.3.3). Se îndepărtează cu grijă excesul de tampon IF.

5.3.7. Se pipetează 5–10 μl tampon glicerol fosfat 0,1 M (apendicele 4) sau o altă soluție antidecolorare de montare comercială în fiecare godeu și se acoperă cu o lamelă.

#### 5.4. Citirea testului de imunofluorescență

5.4.1. Se examinează lamele-test la un microscop cu sursă de lumină epifluorescentă și cu filtre adaptate pentru a lucra cu izotiocianat de fluoresceină, cu ulei de imersie sau în apă, la o mărire de 500–1.000. Se examinează godeurile pe două diametre în unghi drept și de-a lungul perimetrului. Pentru probele fără celule sau cu un număr redus de celule se examinează cel puțin 40 câmpuri microscopice.

Se verifică mai întâi lama de control pozitiv. Celulele trebuie să fie intens fluorescente și colorate complet la titrul de anticorpi sau la diluția de lucru determinată. Testul IF (pct. 5) trebuie repetat în cazul în care apare o colorație anormală.

5.4.2. Se caută prezența celulelor intens fluorescente cu morfologie caracteristică bacteriei *Ralstonia solanacearum* în godeurile lamelor-test (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a tulpinii de control pozitiv la aceeași diluție de anticorpi. Celulele cu colorație incompletă sau cu fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

În cazul în care se suspectează o contaminare, testul trebuie repetat. Acest lucru se poate întâmpla atunci când în toate lamele unei serii de analize se observă celule pozitive din cauza unei contaminări a tamponului sau atunci când celulele pozitive se observă în afara godeurilor.

5.4.3. Există un anumit număr de probleme care afectează specificitatea testului de imunofluorescență. La nivelul conurilor de țesut vascular și în bucățile de tulpini pot apărea populații de celule fluorescente atipice din punct de vedere morfologic, precum și bacterii saprofite care pot conduce la reacții încrucișate, având mărime și morfologie asemănătoare cu *Ralstonia solanacearum*.

5.4.4. Trebuie luate în considerare numai celulele fluorescente ale căror dimensiune și morfologie sunt caracteristice titrului sau diluției de lucru a anticorpilor menționați la pct. 5.3.

#### 5.4.5. Interpretarea testului IF:

(i) În cazul în care se observă celule intens fluorescente cu morfologie caracteristică, se determină numărul mediu de celule tipice pe câmp microscopic și se calculează numărul de celule tipice pe ml de sediment resuspendat (apendice 5).

Testul de imunofluorescență se consideră ca fiind pozitiv pentru probele care conțin cel puțin  $5 \times 10^3$  celule tipice pe ml de sediment resuspendat. Proba se consideră ca fiind potențial contaminată, fiind necesare mai multe testări.

(ii) Testul de imunofluorescență se consideră ca fiind negativ pentru probele care conțin mai puțin de  $5 \times 10^3$  celule pe ml de sediment resuspendat. Proba se consideră ca fiind negativă, efectuarea altor teste nefiind obligatorie.

## 6. Testele PCR

### Principii

În cazul în care testul PCR se folosește drept test principal de detecție, iar rezultatul acestuia este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare sau un test de imunofluorescență drept al doilea test de detecție obligatoriu. În cazul în care testul PCR se folosește ca test secundar, iar rezultatul este pozitiv, diagnoza trebuie completată cu teste suplimentare, după cum indică diagrama funcțională.

O exploatare completă a acestei metode ca test principal de detecție se recomandă numai atunci când se dobândește o expertiză specializată în domeniu.

NOTĂ: Testele preliminare realizate în conformitate cu această metodă trebuie să permită detecția reproductibilă a  $10^3$ – $10^4$  celule pe ml de *Ralstonia solanacearum* adăugate extractelor de probe care au dat anterior rezultate negative. Poate fi necesară efectuarea unor experimente de optimizare în toate laboratoarele pentru a obține niveluri maxime de sensibilitate și de specificitate.

Se folosesc reactivi și protocoale PCR validate (vezi apendice 6). Se alege, de preferință, o metodă care să conțină un control intern.

Se iau măsurile de precauție necesare pentru a se evita contaminarea probei cu ADN-țintă. Testul PCR ar trebui realizat de tehnicieni experimentați în laboratoare de biologie moleculară specializate, pentru a se reduce cât mai mult posibilitatea contaminării cu ADN-țintă.

Controalele negative (pentru procedurile de extracție de ADN și amplificarea PCR) ar trebui tratate întotdeauna ca probe finale în procedură, pentru a indica o eventuală apariție a unui transfer de ADN.

Următoarele controale negative ar trebui incluse în testul PCR:

- extractul probei care a produs anterior rezultate negative pentru depistarea *Ralstonia solanacearum*;
- tampoanele utilizate pentru extracția ADN din probă;
- amestecul de reactivi pentru PCR.

Următoarele controale pozitive ar trebui incluse:

- alicote de sedimente resuspendate la care s-a adăugat *Ralstonia solanacearum* (preparare: vezi apendice 3 B);
- suspensie de  $10^6$  celule pe ml dintr-un izolat virulent de *Ralstonia solanacearum* în apă (de exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vezi apendice 3 B);
- atunci când este posibil, se folosește, de asemenea, în testul PCR, ADN extras din probe pozitive în testul PCR.

**Pentru a se evita o eventuală contaminare, controalele pozitive se prepară într-un mediu diferit de cel al probelor de testat.**

Extractele probelor trebuie curățate, atât cât este posibil, de particulele de sol. În anumite cazuri, atunci când se prevede utilizarea protocoalelor PCR, ar putea fi recomandabil să se prepare extracte de tuberculi de cartofi spălați.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate, disponibile pentru utilizare în acest test, sunt prevăzute în apendicele 3.

#### 6.1. Metode de purificare a ADN-ului

Se folosesc controale pozitive și negative în conformitate cu metoda descrisă anterior (vezi apendicele 3).

Controalele se testează în același mod cu probele.

Există o serie de metode de purificare a ADN-țintă din substraturile de probe complexe, ce permit eliminarea inhibitorilor PCR și a altor reacții enzimatică și concentrează ADN-ul țintă din probă. Următoarea metodă a fost optimizată pentru utilizare în cadrul metodelor PCR validate indicate în apendicele 6.

##### a) Metoda Pastrok (2000)

(1) Se pipetează 220  $\mu$ l de tampon de liză [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] într-un tub Eppendorf de 1,5 ml.

(2) Se adaugă 100  $\mu$ l de extract de probă și se introduce într-un bloc de încălzire sau în baie de apă la 95°C timp de 10 minute.

(3) Se așază tubul pe gheață timp de 5 minute.

(4) Se adaugă 80  $\mu$ l de soluție concentrată de lizozim (50 mg de lizozim pe ml în 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) și se incubează la 37°C timp de 30 de minute.

(5) Se adaugă 220  $\mu$ l de soluție A de Easy DNA® (Invitrogen), se amestecă bine prin vortexare și se incubează la 65°C timp de 30 de minute.

(6) Se adaugă 100  $\mu$ l de soluție B de Easy DNA® (Invitrogen), se omogenizează bine prin vortexare până când precipitatul circulă liber în tub, iar proba are o consistență uniform-vâscoasă.

(7) Se adaugă 500  $\mu$ l de cloroform și se omogenizează prin vortexare până când vâscozitatea este redusă și amestecul este omogen.

(8) Se centrifughează la 15.000 g timp de 20 de minute la 4°C pentru a separa fazele și a forma interfaza.

(9) Faza superioară se transferă într-un nou tub Eppendorf.

(10) Se adaugă 1 ml de etanol 100 % (– 20°C), se omogenizează scurt prin vortexare și se incubează pe gheață timp de 10 minute.

(11) Se centrifughează la 15.000 g timp de 20 de minute la 4°C și se îndepărtează etanolul din extractul concentrat.

(12) Se adaugă 500  $\mu$ l de etanol 80 % (– 20°C) și se amestecă prin răsturnare.

(13) Se centrifughează la 15.000 g timp de 10 minute la 4°C, se păstrează sedimentul și se îndepărtează etanolul.

(14) Sedimentul se lasă să se usuce în aer liber sau într-un SpeedVac ADN.

(15) Sedimentul se repune în suspensie în 100  $\mu$ l de apă ultrapură sterilă și se lasă la temperatura ambiantă timp de cel puțin 20 de minute.

(16) Se depozitează la – 20°C până când extractul este necesar pentru PCR.

(17) Înainte de utilizare se centrifughează, pentru reacția de amplificarea prin PCR fiind necesari 5  $\mu$ l de supernatant conținând ADN.

#### b) Alte metode

Pot fi utilizate și alte metode de extracție a ADN, de exemplu Qiagen DNeasy Plant Kit, cu condiția ca acestea să aibă o eficacitate echivalentă de purificare a ADN-ului din controalele pozitive cu un conținut de  $10^3$ – $10^4$  celule patogene per ml.

#### 6.2. Amplificare PCR

6.2.1. Se pregătesc extractele de ADN de testat și controalele în conformitate cu protocoalele validate (pct. 6). Se prepară o diluție decimală din extractul de probă de ADN (1:10 în apă ultrapură).

6.2.2. Se prepară amestecul reactiv (mixul de amplificarea) corespunzător pentru PCR într-un mediu necontaminat în conformitate cu protocoalele publicate (apendice 6). În cazul în care este posibil, se recomandă utilizarea unui protocol PCR multiplex care include un control intern al reacției PCR.

6.2.3. Se adaugă 2–5  $\mu$ l de extract de ADN pe 25  $\mu$ l mix PCR în tuburi PCR sterile în conformitate cu protocoalele PCR (vezi apendicele 6).

6.2.4. Se include un control negativ conținând numai mix de amplificarea și se adaugă apă ultrapură, din aceeași sursă cu cea utilizată pentru mixul de amplificarea PCR, în locul probei.

6.2.5. Tuburile se introduc în același termociclor utilizat la testul preliminar și se lansează programul PCR optimizat în mod corespunzător (apendice 6).

#### 6.3. Analiza produsului reacției PCR (amplicon)

6.3.1. Fragmentele PCR sunt detectate prin electroforeză în gel de agaroză. Se pune sub tensiune la 5–8 V/cm o cantitate de cel puțin 12  $\mu$ l de ADN amplificat din fiecare probă la care se adaugă 3  $\mu$ l de tampon de încărcare (apendice 6) în gel de agaroză 2 % într-un tampon tris-acetat-EDTA (TAE) (vezi apendicele 6). Se folosește un marker de ADN corespunzător mărimii așteptate a ampliconului, precum cel de 100 bp.

6.3.2. Pentru vizualizarea fragmentelor de ADN, se recurge la colorare cu bromură de etidiu (10,5 mg/l) timp de 30–60 de minute, luându-se măsurile de precauție necesare pentru manipularea acestui agent mutagen.

6.3.3. În cazul unor produse PCR având mărimea așteptată (vezi apendicele 6), gelul colorat se vizualizează prin iluminare ultravioletă cu unde scurte ( $\lambda = 302$  nm) și se notează rezultatele.

6.3.4. Pentru noile cazuri sau constatări, se verifică autenticitatea fragmentului amplificat PCR, efectuându-se o analiză de restricție enzimatică pe o probă de ADN amplificată rămasă. În acest scop, ADN-ul amplificat rămas se incubează la o temperatură optimă și pe o perioadă optimă cu o enzimă și un

tampon corespunzător (vezi apendicele 6). Fragmentele restrictate se detectează prin electroforeză în gel de agaroză și colorare cu bromură de etidiu în conformitate cu metoda descrisă anterior. Dispunerea tipică a fragmentelor după analiza de restricție enzimatică se vizualizează prin iluminare ultravioletă. Fragmentele de ADN se compară cu tulpinile de control pozitiv înainte și după restricție.

#### Interpretarea rezultatului testului PCR

Testul PCR este negativ atunci când produsul PCR specific pentru *Ralstonia solanacearum* cu dimensiunea așteptată nu este detectat pentru proba respectivă, iar pentru ansamblul de probe, în cazul unui multiplex PCR cu primeri de control intern specific plantei, un al doilea produs PCR cu dimensiunea așteptată trebuie să fie amplificat cu probele respective.

Testul PCR este pozitiv în cazul în care produsul PCR caracteristic de *Ralstonia solanacearum* de dimensiunea și tipul de restricție (atunci când este restrictat) așteptate este detectat, cu condiția să nu existe amplificare la probele de control negativ. Se poate obține o confirmare fiabilă a rezultatului pozitiv prin repetarea testului cu un al doilea set de primeri PCR (apendicele 6).

NOTĂ: Se poate suspecta o inhibiție a PCR în cazul în care fragmentul amplificat prevăzut este obținut în cazul controlului pozitiv de *Ralstonia solanacearum* în apă, dar se obțin rezultate negative în cazul controalelor pozitive conținând *R. solanacearum* în extractul de cartof. În protocoalele PCR compuse, cu control intern al PCR, se constată inhibiția reacției atunci când nu se obține niciunul dintre cele două fragmente amplificate.

Se poate suspecta o contaminare atunci când fragmentul amplificat prevăzut este obținut din unul sau mai multe controale negative.

## 7. Testul FISH

### Principiu

În cazul în care testul FISH se folosește drept test principal de detecție și rezultatul lui este pozitiv, trebuie efectuat un test de izolare sau un test IF drept al doilea test obligatoriu de detecție. În cazul în care testul IF se folosește ca test secundar și rezultatul lui este pozitiv, analiza trebuie completată cu teste suplimentare, după cum indică diagrama funcțională.

NOTĂ: Se folosesc oligosonde validate specifice pentru *Ralstonia solanacearum* (a se vedea apendicele 7). Testele preliminare efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită o detecție reproductibilă de  $10^3$ – $10^4$  celule pe ml de *Ralstonia solanacearum* adăugate la extractele de probe care au dat anterior rezultate negative.

Este de preferat să se aplice procedura descrisă în continuare extractelor de probe proaspăt preparate, dar se pot folosi și extracte de probe conservate la temperaturi cuprinse între  $-16^\circ\text{C}$  și  $-24^\circ\text{C}$  sau între  $-68^\circ\text{C}$  și  $-86^\circ\text{C}$ .

Drept control negativ, se folosesc alicote de extracte de probe care au dat anterior rezultate negative la testele de identificare a *Ralstonia solanacearum*.

Drept control pozitiv, se folosesc suspensii conținând  $10^5$ – $10^6$  celule pe ml de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 (de exemplu, tulpina NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; a se vedea apendicele 3) preparate în tampon fosfat 0,01 M (PB), dintr-o cultură de 3–5 zile. Separat, se prepară lame de control pozitiv din tulpina omologă sau din orice altă tulpină de referință de *Ralstonia solanacearum*, în suspensie în extract de cartof, în conformitate cu apendicele 3 B.

Controlul procesului de hibridizare se realizează prin utilizarea unei oligosonde eubacteriene marcate cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) care colorează toate eubacteriile prezente în probă.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate disponibile pentru acest test sunt prevăzute în apendicele 3 A.

Materialul de control se testează în același mod ca și probele.

#### 7.1. Fixarea extractului de cartof

Protocolul descris în continuare se bazează pe Wullings *et al.* (1998):

7.1.1. Se prepară soluția de fixare (a se vedea apendicele 7).

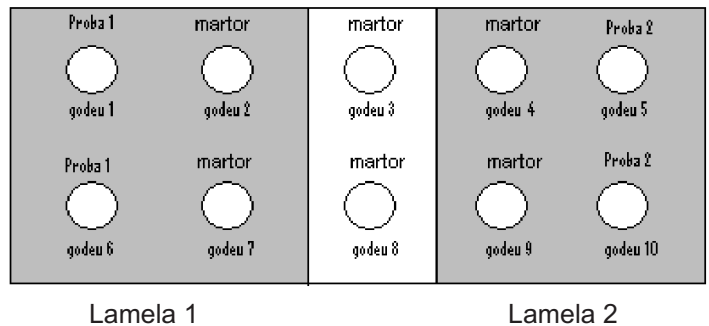
7.1.2. Se pipetează 100  $\mu\text{l}$  din fiecare extract de probă într-un tub Eppendorf și se centrifughează timp de 7 minute la 7.000 g.

7.1.3. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul se resuspendă în 200  $\mu\text{l}$  de soluție de fixare preparată cu mai puțin de 24 de ore înainte. Se omogenizează prin vortexare și se incubează timp de o oră în frigider.

7.1.4. Se centrifughează timp de 7 minute la 7.000 g, se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul se resuspendă în 75  $\mu\text{l}$  de PB 0,01 M (a se vedea apendicele 7).

7.1.5. Se pipetează 16  $\mu\text{l}$  din suspensiile fixate pe o lamă multiteș curată, în conformitate cu figura 7.1. Pe fiecare lamă se pipetează două probe diferite, nediluate, și 10  $\mu\text{l}$  diluție de 1:100 ale acestora (într-un tampon fosfat 0,01 M). Restul suspensiei (49  $\mu\text{l}$ ) poate fi conservată la  $-20^\circ\text{C}$  după ce i s-a adăugat un volum de etanol de 96 %. În cazul în care testul FISH trebuie repetat, se elimină etanolul prin centrifugare și se adaugă un volum echivalent de tampon fosfat 0,01 M (omogenizați prin vortexare).

Figura 7.1. Configurația unei lame pentru testul FISH



7.1.6. Se usucă lamele la temperatura ambiantă (sau într-un uscător, la  $37^\circ\text{C}$ ), apoi se fixează prin flambare.

Procedura de hibridizare poate fi întreruptă în acest stadiu și continuată a doua zi. Lamele trebuie păstrate într-un loc uscat, la temperatura ambiantă, ferite de praf.

#### 7.2. Hibridizare

7.2.1. Se deshidratează celulele prin băi succesive de etanol de 50 %, 80 % și 96 %, cu o durată de un minut fiecare. Se aranjează lamele pe un suport și se lasă la uscat la temperatura ambiantă.

7.2.2. Se realizează o cameră de incubare umedă căptușind fundul unei cutii ermetice cu hârtie absorbantă sau cu hârtie de filtru impregnată cu hibmix 1X (a se vedea apendicele 7). Cutia se preincubează timp de cel puțin 10 minute în incubatorul de hibridizare la o temperatură de  $45^\circ\text{C}$ .

7.2.3. Se pipetează 10  $\mu\text{l}$  de soluție de hibridizare (apendicele 7) în 8 godeuri (godeuri 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 și 10; vezi figura 7.1) ale fiecărei lame, lăsând goale cele două godeuri din mijloc (3 și 8).

7.2.4. Se acoperă cu lamele (24 x 24 mm) primul și ultimele 4 godeuri, având grijă să nu prindă aer sub ele. Lamele se introduc în camera umedă încălzită în prealabil și se lasă timp de 5 ore în incubator la  $45^\circ\text{C}$  la întuneric, pentru hibridizare.

7.2.5. Se pregătesc 3 recipiente conținând 1 l de apă Milli Q (biologie moleculară), 1 l de hibmix 1X în 334 ml de hibmix 3X și 666 ml de apă Milli Q (biologie moleculară) și 1 l de hibmix 1/8X în 42 ml de hibmix 3X și 958 ml de apă Milli Q (biologie

moleculară). Se preincubează fiecare recipient în baie de apă la 45°C.

7.2.6. Se îndepărtează lamelele de pe lame și se așază pe un suport de lame.

7.2.7. Se elimină excesul de probă prin incubare timp de 15 minute la 45°C în recipientul cu hibmix 1X.

7.2.8. Se transferă suportul cu lame într-o soluție de spălare cu hibmix 1/8X și se lasă la incubat timp de încă 15 minute.

7.2.9. Lamele se introduc scurt într-o baie de apă Milli Q și se așază pe o hârtie de filtru. Se îndepărtează umiditatea în exces tamponând ușor suprafața umedă cu hârtie de filtru. Se pipetează în fiecare godeu 5–10 μl de soluție antidecolorare (de exemplu, Vectashield produs de Vecta Laboratories CA, USA, sau altă soluție echivalentă) și se acoperă întreaga suprafață a lamei cu o lamelă (24 x 60 mm).

### 7.3. Citirea testului FISH

7.3.1. Lamele se examinează imediat cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență, cu obiectivul de imersie, în ulei de imersie la o mărire de 630 x 1.000. Cu un filtru sensibil la izotiocianat de fluoresceină (FITC), celulele eubacteriene prezente în probe (inclusiv majoritatea celulelor Gram-negative) apar colorate în verde fluorescent. Cu un filtru adaptat la tetrametil-rodamin-5-izotiocianat, celulele de *Ralstonia solanacearum* marcate cu Cy3 apar colorate în roșu fluorescent. Se compară morfologia celulelor din probe cu cea a celulelor din controlul pozitiv. Celulele trebuie să fie colorate complet și intens fluorescente. Testul FISH (pct. 7) trebuie repetat în cazul în care apare o colorație anormală. Godeurile se examinează de-a lungul a două diametre perpendiculare și în jurul perimetrului. Pentru probele care nu conțin celule sau conțin un număr mic de celule, se examinează cel puțin 40 de câmpuri microscopice.

7.3.2. Se observă prezența celulelor intens fluorescente, cu o morfologie tipică de *Ralstonia solanacearum* în ferestrele de test ale lamelor (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensitatea fluorescenței trebuie să fie echivalentă cu cea a tulpinii de control pozitiv sau mai bună. Celulele cu colorație incompletă sau cu fluorescență slabă nu trebuie luate în considerare.

7.3.3. La cea mai mică suspiciune de contaminare, testul trebuie repetat. Aceasta se poate întâmpla atunci când în toate lamele unei serii de analize se observă celule pozitive din cauza contaminării tamponului sau atunci când celulele pozitive se observă în afara godeurilor.

7.3.4. Există un anumit număr de probleme inerente care afectează specificitatea testului FISH. La nivelul conurilor de țesut vascular și tulpinii pot apare populații de celule fluorescente cu morfologie atipică și populații de bacterii saprofite care dau reacții încrucișate, având dimensiuni și morfologii asemănătoare cu celulele de *Ralstonia solanacearum*, însă într-o proporție mult mai mică decât în cazul testului IF.

7.3.5. Se iau în considerare numai celulele fluorescente cu dimensiune și morfologie tipice.

### 7.3.6. Interpretarea rezultatului testului FISH:

- (i) Testul FISH este valid atunci când celulele intens fluorescente de culoare verde, cu dimensiuni și morfologie tipice pentru *Ralstonia solanacearum*, sunt vizibile cu ajutorul filtrului FITC și celulele intens fluorescente de culoare roșie sunt vizibile folosindu-se filtrul cu rodamină în toate controalele pozitive, iar în controlul negativ nu se observă nicio celulă. În cazul în care proba conține celule intens fluorescente, cu o morfologie tipică, se estimează numărul mediu de celule tipice pe câmp microscopic și se calculează numărul de celule tipice pe ml de sediment resuspendat (apendice 4).

Probele ce conțin cel puțin  $5 \times 10^3$  celule tipice pe ml de sediment resuspendat se consideră ca fiind potențial infectate și se recomandă continuarea testelor. Probele ce conțin mai puțin de  $5 \times 10^3$  celule tipice pe ml de sediment resuspendat sunt considerate ca fiind negative.

- (ii) Testul FISH este negativ în cazul în care celulele intens fluorescente de culoare roșie, având dimensiuni și morfologie caracteristice pentru *Ralstonia solanacearum*, nu se observă cu ajutorul filtrului cu rodamină, cu condiția ca celulele intens fluorescente de culoare roșie să fie vizibile în lamele de control pozitiv folosindu-se filtrul cu rodamină.

## 8. Testele ELISA

### Principiu

Testul ELISA nu poate fi utilizat ca test secundar pe lângă testele IF, PCR sau FISH din cauza sensibilității sale relativ slabe. În cazul aplicării metodei DAS-ELISA, îmbogățirea probelor și utilizarea anticorpilor monoclonali sunt obligatorii (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Îmbogățirea probelor înainte de efectuarea testului ELISA poate fi utilă pentru creșterea sensibilității acestuia, dar poate să inhibe testul din cauza competiției cu alte organisme prezente în probă.

NOTĂ: Se folosește o sursă validată de anticorpi de *Ralstonia solanacearum* (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Se recomandă să se determine titrul pentru fiecare lot nou de anticorpi. Titrul se definește ca fiind cea mai mare diluție la care se obține o reacție optimă atunci când se testează o suspensie de  $10^5$ – $10^6$  celule pe ml din tulpina omologă de *Ralstonia solanacearum* folosindu-se conjugate corespunzătoare de anticorpi secundari, în conformitate cu recomandările producătorului. La efectuarea testului, diluția de lucru a anticorpilor trebuie să fie aproximativ egală sau egală cu cea a titrului formulei comerciale.

Se determină titrul anticorpilor pentru o suspensie de  $10^5$ – $10^6$  celule/ml dintr-o tulpină omologă de *Ralstonia solanacearum*.

Drept controale negative se utilizează un extract de probă care a dat anterior rezultate negative pentru *Ralstonia solanacearum* și o suspensie bacteriană preparată în tampon fosfat care nu provoacă reacții încrucișate

Drept control pozitiv se folosesc extracte de probe care au dat anterior rezultate negative, la care s-a adăugat  $10^3$ – $10^4$  celule/ml de biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* (de exemplu, tulpina NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vezi apendicii 2 A și B). Pentru a compara rezultatele din fiecare placă se folosește o suspensie standard de  $10^5$ – $10^6$  celule/ml în PBS de *Ralstonia solanacearum*. Controalele pozitive trebuie să fie pipetate cu grijă pe placa de microtitrare, separat de proba sau probele care fac obiectul testului.

Materialele de control pozitiv și negativ standardizate, disponibile pentru utilizare în acest test, sunt enumerate în apendicele 3 A.

Materialul de control se testează în același mod cu probele.

Au fost validate două protocele ELISA:

a) ELISA indirect (Robinson-Smith *et al.*, 1995)

(1) Se folosesc alicote de 100–200 μl de sediment resuspendat. (Pentru a reduce rezultatele nespecifice se încălzesc timp de 4 minute la 100°C pe baie de apă sau într-un bloc de încălzire.)

(2) Se adaugă un volum egal de tampon 2X (apendicele 4) și se omogenizează prin vortexare.

(3) Se pipetează alicote de 100 μl de extract în cel puțin două godeuri ale plăcii de microtitrare (de exemplu, Nunc-Polysorp

sau echivalent) și se incubează o oră la 37°C sau peste noapte la 4°C.

(4) Se îndepărtează extractele din godeuri. Se spală godeurile de 3 ori cu PBS-Tween (apendicele 4), lăsând ultima soluție de spălare în godeuri cel puțin 5 minute.

(5) Se prepară diluția corespunzătoare a antiserului anti-*Ralstonia solanacearum* în tampon de saturație (apendicele 4). Pentru anticorpii comerciali validați, se folosesc diluțiile recomandate (de obicei, de două ori mai concentrate decât titrul).

(6) Se pipetează 100 μl în fiecare godeu și se incubează o oră la 37°C.

(7) Se îndepărtează soluția de anticorpi din godeuri și se spală în conformitate cu cele indicate anterior [pct. (4)].

(8) Se prepară diluția corespunzătoare de conjugat secundar de anticorpi și de fosfatază alcalină în tampon de saturație. Se pipetează 100 μl în fiecare godeu și se incubează o oră la 37°C.

(9) Se îndepărtează conjugatul de anticorpi din godeuri și se spală în conformitate cu cele indicate anterior [pct. (4)].

(10) Se pipetează 100 μl de soluție de substrat de fosfatază alcalină (apendicele 4) în fiecare godeu. Se incubează în întineric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanta la 405 nm la intervale regulate în termen de 90 de minute.

#### b) DAS-ELISA

(1) Se prepară diluția corespunzătoare de imunoglobuline policlonale anti-*Ralstonia solanacearum* în tampon concentrat cu pH 9,6 (apendicele 4). Se adaugă 200 μl în fiecare godeu. Se incubează timp de 4–5 ore la 37°C sau timp de 16 ore la 4°C.

(2) Se spală godeurile de 3 ori cu PBS-Tween (apendicele 4). Se adaugă 190 μl de extract de probă în cel puțin două godeuri. De asemenea, se adaugă controlul pozitiv și negativ în câte două godeuri pe fiecare placă. Se incubează timp de 16 ore la 4°C.

(3) Se spală godeurile de 3 ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(4) Se prepară o diluție corespunzătoare de anticorpi monoclonali specifici *Ralstonia solanacearum* în PBS (apendicele 4) conținând, de asemenea, 0,5 % seralbumină bovină (BSA) și se pipetează 190 μl în fiecare godeu. Se incubează două ore la 37°C.

(5) Se spală godeurile de 3 ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(6) Se prepară o diluție corespunzătoare de imunoglobuline antișoarece conjugate cu fosfatază alcalină în PBS. Se adaugă 190 μl în fiecare godeu. Se incubează două ore la 37°C.

(7) Se spală godeurile de 3 ori cu PBS-Tween (apendicele 4).

(8) Se prepară o soluție de substrat de fosfatază alcalină conținând 1 mg de p-nitrofenil fosfat pe ml de soluție tampon (apendicele 4). Se adaugă 200 μl în fiecare godeu. Se incubează la întineric la temperatura ambiantă și se măsoară absorbanta la 40 nm la intervale regulate în termen de 90 de minute.

#### Interpretarea rezultatelor testelor ELISA

Testul ELISA este negativ atunci când densitatea optică (DO) medie a godeurilor probei duplicate este mai mică decât de două ori densitatea optică a godeurilor controlului negativ, cu condiția ca densitatea optică a controlului pozitiv să fie întotdeauna mai mare de 1,0 (după 90 de minute de incubare cu substratul) și de două ori mai mare decât densitatea optică obținută pentru controlul negativ.

Testul ELISA este pozitiv atunci când densitatea optică (DO) medie a godeurilor probei duplicate este mai mare decât de două ori densitatea optică a godeurilor controlului negativ, cu condiția ca DO pentru toate godeurile de control negativ să fie mai mică decât de două ori DO obținută pentru godeurile de control pozitiv.

O citire negativă a testului ELISA în godeurile de control pozitiv indică faptul că testul nu a fost efectuat corect sau că a fost inhibat. O citire pozitivă a testului ELISA în godeurile de

control negativ indică o contaminare încrucișată sau o reacție nespecifică.

#### 9. Testul biologic

NOTĂ: Testele preliminare efectuate în conformitate cu această metodă trebuie să permită o detecție reproductibilă a  $10^3$ – $10^4$  celule formatoare de colonii (UFC) per ml de *Ralstonia solanacearum* adăugate la extractele de probe care au dat anterior rezultate negative (preparare: vezi apendice 3).

Sensibilitatea cea mai mare de detecție poate fi atinsă atunci când se folosesc extracte de probe proaspăt preparate și în condiții optime de creștere. Cu toate acestea, metoda se poate aplica cu succes extractelor păstrate în glicerol la o temperatură cuprinsă între – 68 și – 86°C.

Următorul protocol se bazează pe protocolul Janse (1988):

9.1. Pentru fiecare probă se utilizează 10 plante-test ale unui soi (cultivar) de tomate sensibil (de exemplu, Moneymaker sau un cultivar cu o sensibilitate echivalentă stabilită în laboratorul de testare) în stadiul celei de-a treia frunze adevărate. Pentru detalii privind cultura, vezi apendicele 8. De asemenea, se pot utiliza vinete (de exemplu, Black Beauty sau cultivări cu o sensibilitate echivalentă), folosindu-se numai plante în stadiul celei de-a doua sau a treia frunze până la dezvoltarea completă a celei de-a treia frunze adevărate. Cu toate acestea, s-a constatat că la plantele de vinete simptomele sunt mai puțin severe și se dezvoltă mai încet. Prin urmare, atunci când este posibil, se recomandă utilizarea plantulelor de tomate.

9.2. Se inoculează 100 μl de extract în fiecare plantă-test.

9.2.1. Inoculare prin injectare

Plantele-test se inoculează în tulpină chiar deasupra cotiledoanelor cu ajutorul unei seringi cu ac hipodermic (minimum 23G).

9.2.2. Inoculare prin incizie

Se ține planta între două degete și se pipetează pe tulpină, între cotiledoane și prima frunză, o picătură (circa 5–10 μl) de extract de probă.

Cu ajutorul unui bisturiu steril, plecând de la picătura de extract, se face o incizie diagonală pe o lungime de 1 cm și cu o adâncime egală cu aproximativ două treimi din grosimea tulpinii.

Se închide incizia aplicând vaselină sterilă cu ajutorul unei seringi.

9.3. Prin aceeași tehnică se inoculează 5 plantule cu o suspensie apoasă de  $10^5$ – $10^6$  celule per ml dintr-o cultură virulentă de 48 de ore de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 drept control pozitiv și 5 plantule cu tampon fosfat (apendice 4) drept control negativ. Se separă plantele control pozitiv și negativ de celelalte plante pentru a se evita contaminările încrucișate.

9.4. Plantele test se cresc în încăperi de carantină până la 4 săptămâni la temperatura de 25–30°C și umiditate relativ mare, stropindu-le în mod corespunzător pentru a preveni o suprasaturare hidrică sau ofilirea din lipsă de apă. Pentru a se evita contaminarea, plantele control pozitiv și negativ se incubează separat în standuri separate în mod corespunzător într-o seră ori cameră de cultivare sau, în cazul în care spațiul este limitat, se asigură o separare strictă între metodele de tratare. Atunci când plantele aparținând unor probe diferite trebuie incubate în apropiere unele de celelalte, trebuie prevăzute între ele ecrane de separare corespunzătoare. În timpul fertilizării, stropirii, controlului sau oricărei alte manipulări, trebuie luate toate măsurile de precauție pentru a se evita o contaminare încrucișată. Este esențial ca în serele și camerele de cultivare să nu fie insecte, dat fiind faptul că acestea ar putea transmite bacteria de la o probă la alta.

Se observă apariția simptomelor de ofilire: epinastie, cloroză și/sau pipernicire.

9.5. Se izolează plantele infectate și se identifică culturile purificate prezumtive (suspecte) de *Ralstonia solanacearum* (lit. B).

9.6. În cazul în care nu se observă niciun simptom după 3 săptămâni, se efectuează un test IF/PCR/de izolare pe o probă formată din bucăți de tulpină de 1 cm prelevate de la fiecare plantă-test chiar deasupra punctului de inoculare. În cazul în care testul este pozitiv, se efectuează însămânțarea pe mediu de cultură (pct. 4.1).

9.7. Se identifică toate culturile purificate prezumtive de *Ralstonia solanacearum* (lit. B).

Interpretarea rezultatelor testului biologic:

Rezultatele testului biologic sunt valide atunci când plantele control pozitiv prezintă simptome tipice, bacteriile pot fi reizolate din aceste plante și nu se observă niciun simptom la plantele control negativ.

Testul biologic este negativ în cazul în care plantele-test inoculate cu extract de probă nu sunt infectate cu *Ralstonia solanacearum* și cu condiția ca *Ralstonia solanacearum* să fie detectată în plantele control pozitiv.

Testul biologic este pozitiv dacă plantele-test sunt infectate cu *Ralstonia solanacearum*.

#### B. TESTE DE IDENTIFICARE

Culturile pure prezumtive de *Ralstonia solanacearum* se identifică prin cel puțin unul dintre următoarele teste bazate pe principii biologice diferite.

Se includ, după caz, tulpini de referință cunoscute, pentru fiecare test efectuat (vezi apendicele 3).

#### 1. Teste de identificare enzimatică și de nutriție

Se stabilesc următoarele caracteristici fenotipice prezente sau absente sistematic la *Ralstonia solanacearum*, în conformitate cu metodele descrise de Lelliott și Stead (1987), Klement *et al.* (1990) și Schaad (2001).

Test	Rezultat preconizat
Producția de pigmenți fluorescenți	-
Incluziuni de poli-β-hidroxibutirat	+
Test de oxidare/fermentare (O/F)	O+/F-
Activitatea catalazei	+
Testul oxidazei de Kovac	+
Reducerea nitratului	+
Utilizarea citratului	+
Creștere la 40°C	-
Creștere în 1 % NaCl	+
Creștere în 2 % NaCl	-
Activitatea arginin dihidrolazei	-
Lichefierea gelatinei	-
Hidroliza amidonului	-
Hidroliza esculinei	-
Producție de levan	-

#### 2. Testul IF

2.1. Se prepară o suspensie de circa  $10^6$  celule/ml în tampon IF (apendice 4).

2.2. Se prepară o serie de diluții de 1/2 dintr-un antiser corespunzător (vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.3. Se aplică procedura testului IF (lit. A pct. 5).

2.4. Pentru ca un test IF să fie pozitiv, titrul obținut pentru cultură trebuie să fie echivalent cu cel al controlului pozitiv.

#### 3. Testul ELISA

NOTĂ: În cazul în care se efectuează numai două teste de identificare, nu se efectuează alte teste serologice pe lângă această metodă.

3.1. Se prepară o suspensie de circa  $10^8$  celule/ml în PBS 1X (vezi apendicele 4).

3.2. Se aplică procedura ELISA corespunzătoare cu un anticorp monoclonal specific de *Ralstonia solanacearum*.

3.3. Un test ELISA este pozitiv atunci când densitatea optică a culturii este egală cel puțin cu 1/2 din densitatea optică obținută pentru controlul pozitiv.

#### 4. Testul reacției de polimerizare în lanț (PCR)

4.1. Se prepară o suspensie de circa  $10^6$  celule/ml în apă sterilă ultrapură.

4.2. Se pipetează 100 μl din suspensie în tuburi închise și se pun într-un bloc de încălzire sau pe baie de apă la 100°C timp de 4 minute. Apoi probele pot fi păstrate la o temperatură situată între -16 și -24°C până în momentul în care sunt utilizate în următoarele etape ale testului PCR.

4.3. Se aplică protocoalele PCR corespunzătoare pentru amplificarea fragmentelor tipice de *Ralstonia solanacearum* vezi, de exemplu, Seal *et al.* (1993), Pstrik & Maiss (2000), Pstrik *et al.* (2002), Boudazin *et al.* (1999), Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999).

4.4. O identificare pozitivă a bacteriei *Ralstonia solanacearum* se obține atunci când fragmentele amplificate prin PCR au aceeași dimensiune și aceleași polimorfisme ale dimensiunii fragmentelor de restricție cu cele ale tulpinii de control pozitiv.

#### 5. Testul de hibridizare fluorescentă *in situ* (FISH)

5.1. Se prepară o suspensie de circa  $10^6$  celule/ml în apă ultrapură.

5.2. Se aplică procedura FISH (lit. A pct. 7) folosindu-se cel puțin două oligosonde specifice pentru *Ralstonia solanacearum* (apendice 7).

5.3. Pentru ca un test FISH să fie pozitiv, cultura trebuie să prezinte aceleași reacții ca și controlul pozitiv.

#### 6. Profilul acizilor grași (FAP)

6.1. Se realizează o cultură de 48 de ore (28°C) pe mediu tripticaz-soia-agar (Oxoid).

6.2. Se aplică procedura FAP corespunzătoare (Janse, 1991; Stead, 1992).

6.3. Pentru ca un test FAP să fie pozitiv, profilul culturii prezumtive trebuie să fie identic cu cel al controlului pozitiv. Prezența acizilor grași caracteristici 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH și 18:1 2OH și absența 16:0 3OH indică prezența *Ralstonia* sp.

#### 7. Metode de caracterizare a tulpinii

Se recomandă o caracterizare a tulpinii prin una dintre următoarele metode pentru fiecare caz nou de izolare a bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

Se includ, după caz, tulpini de referință cunoscute pentru fiecare test efectuat (vezi apendicele 3).

#### 7.1. Determinarea biovarului

Există diferite biovaruri de *Ralstonia solanacearum* în funcție de capacitatea lor de a utiliza și/sau oxida 3 zaharuri și 3 hexoze alcoolice (Hayward, 1964 și Hayward *et al.*, 1990). Mediile de creștere pentru testul biovarului sunt descrise în apendicele 2. Testul poate fi realizat inoculând prin injectare profundă a mediilor cu culturi pure de izolat de *Ralstonia solanacearum* și incubare la 28°C. În cazul în care mediile sunt repartizate pe plăci de cultură cu 96 de godeuri sterile (200 μl/godeu), se poate observa o modificare a culorii, în 72 de ore, din verde-oliv în galben, ceea ce indică un rezultat pozitiv al testului.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
<b>Utilizarea:</b>					
Maltozei	–	+	+	–	+
Lactozei	–	+	+	–	+
D (+) Celobiozei	–	+	+	–	+
Manitolului	–	–	+	+	+
Sorbitolului	–	–	+	+	–
Dulcitolului	–	–	+	+	–

Teste suplimentare diferențiază biovarul 2 în subfenotipuri:

	Biovar 2A (răspândit în lume)	Biovar 2A (găsit în Chile și în Columbia)	Biovar 2T (găsit în zona tropicală)
Utilizarea trehalozei	–	+	+
Utilizarea mezo-inozitei	+	–	+
Utilizarea D-ribozei	–	–	+
Activitate pectolitică <sup>1)</sup>	scăzută	scăzută	ridicată

<sup>1)</sup> Vezi Lelliott & Stead (1987)

### 7.2. Amprentare genomică

Diferențierea moleculară a tulpinilor din complexul *Ralstonia solanacearum* se poate face prin:

7.2.1. analiza polimorfismului dimensiunii fragmentelor de restricție (RFLP) (Cook *et al.*, 1989);

7.2.2. PCR realizat pe secvențe repetitive folosindu-se primeri REP, BOX și ERIC (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995);

7.2.3. analiza polimorfismului dimensiunii fragmentelor de restricție amplificate (Van der Wolf *et al.*, 1998).

### 7.3. metodele PCR.

Se pot folosi primeri specifici PCR (Patrik *et al.*, 2002; vezi apendice 6) pentru a diferenția tulpinile aparținând diviziunii 1 (biovari 3, 4 și 5) și diviziunii 2 (biovari 1, 2A și 2T) ale *Ralstonia solanacearum*, definite inițial de analiza RFLP (Cook *et al.*, 1989) și analiza secvenței 16S a ADNr (Taghavi *et al.*, 1996).

### C. TEST DE CONFIRMARE

Testul de patogenitate trebuie efectuat pentru confirmarea finală a diagnosticului și pentru evaluarea virulenței culturilor identificate ca fiind *Ralstonia solanacearum*.

(1) Se prepară un inoculum de circa 10<sup>6</sup> celule/ml dintr-o cultură de 24–48 de ore dintr-o tulpină corespunzătoare de control pozitiv de *Ralstonia solanacearum* (de exemplu, NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; vezi apendicele 3).

(2) Se inoculează 5–10 plantule de tomate sau vinete sensibile, în stadiul celei de a treia frunze adevărate (vezi lit. A pct. 9).

(3) Se incubează până la două săptămâni la 25–28°C și umiditate relativă crescută, asigurând o stropire corespunzătoare pentru a preveni suprasaturarea hidrică sau stresul de deshidratare. În cazul culturilor pure, în 15 zile ar trebui să intervină ofilirea. În absența simptomelor la sfârșitul acestei perioade, cultura nu poate fi confirmată ca fiind o formă patogenă de *Ralstonia solanacearum*.

(4) Se observă apariția simptomelor de ofilire și/sau epinastie, cloroză și de pipernicire.

(5) Se izolează plantele simptomatice îndepărtând o secțiune de țesut din tulpină la 2 cm deasupra punctului de inoculare. Se mărunțește și se suspendă într-un volum mic de apă distilată sterilă sau tampon fosfat de 50 mM (apendice 4). Se însămânțează suspensia pe un mediu adecvat, de preferință mediu selectiv (apendice 2), se incubează timp de 48–72 de ore la 28°C și se observă formarea coloniilor tipice de *Ralstonia solanacearum*.

### Apendicele 1

#### Laboratoarele care efectuează optimizarea și validarea protocoalelor

Laborator <sup>1)</sup>	Oraș	Țara
Agentur fur Gesundheit und Ernährungssicherheit	Viena și Linz	Austria
Departament Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Danemarca
Central Science Laboratory	York	Anglia
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Scoția
Laboratoire national de la protection des vegetaux,	Angers	Franța
Unite de Bacteriologie		
Laboratoire national de la protection des vegetaux,	Le Rheu	Franța
Station de quarantaine de la pomme de terre		
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Germania
Pflanzenschutzamt Hannover	Hanovra	Germania
State Laboratory	Dublin	Irlanda
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italia
Regione Veneto Unita Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italia



Laborator <sup>1)</sup>	Oraș	Țara
Nederlandse Algemene Keuringdienst	Emmeloord	Țările de Jos
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Țările de Jos
Direccao-Geral de Proteccao das Culturas	Lisabona	Portugalia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spania
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spania
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Suedia

<sup>1)</sup> Experți de contact: vezi <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

#### Apendicele 2

#### Medii pentru izolarea și cultivarea bacteriei *Ralstonia solanacearum*

##### a) Medii de creștere în general

*Agar nutritiv (AN)*

Agar nutritiv (Difco)

23,0 g

Apă distilată

1,0 l

Se dizolvă ingredientele. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

*Drojdie – peptonă – glucoză-agar (YPGA)*

Extract de levură (Difco)

5,0 g

Bacto-peptonă (Difco)

5,0 g

D (+) glucoză (monohidrat)

10,0 g

Bacto-agar (Difco)

15,0 g

Apă distilată

1,0 l

Se dizolvă ingredientele. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

*Zaharoză – peptonă – agar (SPA)*

Zaharoză

20,0 g

Bacto-peptonă (Difco)

5,0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,5 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

0,25 g

Bacto-geloză (Difco)

15,0 g

Apă distilată

1,0 l

pH 7,2–7,4

Se dizolvă ingredientele. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

*Mediul tetrazoliu Kelman*

Acizi casiminci (Difco)

1,0 g

Bacto-peptonă (Difco)

10,0 g

Dextroză

5,0 g

Bacto-agar (Difco)

15,0 g

Apă distilată

1,0 l

Se dizolvă ingredientele. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

Se răcește la 50°C și se adaugă o soluție apoasă sterilizată prin filtrare de clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (Sigma) pentru obținerea unei concentrații finale de 50 mg la litru.

##### b) Medii de creștere selective validate

*Mediu SMSA (Englebrecht, 1994, modificat de Elphinstone et al., 1996)*

Mediu de bază

Acizi casiminci (Difco)

1,0 g

Bacto-peptonă (Difco)

10,0 g

Glicerol

5,0 ml

Bacto-agar (Difco) (vezi nota 2)

15,0 g

Apă distilată

1,0 l

Se dizolvă ingredientele. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

Se răcește la 50°C și se adaugă soluții apoase concentrate, sterilizate prin filtrare, conținând următoarele ingrediente pentru obținerea concentrațiilor finale specificate:

Cristal violet (Sigma)

5 mg la litru

Sulfat de polimixină B (Sigma P-1004)

600.000 unități (circa 100 mg) la litru

Bacitracină (Sigma B-0125)	1.250 unități (circa 25 mg) la litru
Cloramfenicol (Sigma C-3175)	5 mg la litru
Penicilină-G (Sigma P-3032)	825 unități (circa 0,5 mg) la litru
Clorură de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (Sigma)	50 mg la litru

**Observații:**

1. Utilizarea altor reactivi decât cei menționați anterior poate afecta creșterea bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

2. Agarul de tip oxoid nr. 1 poate fi înlocuit de Bacto-agar (Difco). În acest caz, creșterea bacteriei *Ralstonia solanacearum* va fi mai lentă, dar și creșterea bacteriilor saprofite concurente ar putea fi, de asemenea, redusă. Dezvoltarea coloniilor tipice de *Ralstonia solanacearum* poate dura o zi sau două în plus, iar colorația roșie poate fi mai puțin pronunțată decât pe mediu de Bacto-agar.

3. O creștere a concentrației de bacitracină la 2.500 de unități la litru poate reduce populațiile de bacterii concurente fără a perturba creșterea bacteriei *Ralstonia solanacearum*.

Mediile și soluțiile concentrate de antibiotice se păstrează la 4°C la întuneric și timp de maximum o lună.

Trebuie asigurată absența condensului pe suprafața plăcilor înainte de utilizare.

A se evita uscarea excesivă a plăcilor.

După prepararea fiecărui lot nou de mediu de cultură trebuie efectuat un control de calitate prin însămânțarea unei suspensii

dintr-o cultură de referință de *Ralstonia solanacearum* (vezi apendicele 3) și se observă formarea de colonii tipice după incubarea la 28°C timp de 2–5 zile.

**c) Medii de îmbogățire validate**

*Mediu nutritiv SMSA* (Elphinstone et al., 1996)

Se prepară ca și pentru mediul selectiv SMSA, dar se elimină Bacto-agar și clorura de 2–3–5-tetrazoliu.

*Mediu nutritiv modificat Wilbrink* (Caruso et al., 2002)

Zaharoză 10 g

Proteoză peptonă 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g

MgSO<sub>4</sub> 0,25 g

NaNO<sub>3</sub> 0,25 g

Apă distilată 1 l

Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute și se răcește la 50°C.

Se adaugă soluții concentrate de antibiotice ca și pentru mediul nutritiv SMSA.

**Apendicele 3****A. Material de control standardizat disponibil în comerț****a) Tulpini bacteriene**

Următoarele tulpini bacteriene se recomandă spre utilizare în calitate de material standard de referință sau control pozitiv (tabelul 1) sau pe parcursul optimizării testelor pentru a evita reacțiile încrucișate (tabelul 2). Toate tulpinile sunt disponibile în comerț la următoarele adrese:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, UK;

2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Țările de Jos;

3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA – Station de phyto-bactériologie, Angers, Franța.

Tabelul 1. Tulpini de referință SMT de *Ralstonia solanacearum*

Cod NCPBP	SMT #	Alte coduri	Țara de origine	Biovar
NCPPB 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS 11	Egipt	2
NCPPB 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS 21	Turcia	2
NCPPB 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS 26	Anglia	2
NCPPB1584	23	CFBP 4598, EURS 49	Cipru	2
NCPPB 2505	24	CFBP 4599, EURS 50	Suedia	2
NCPPB 4155	26	CFBP 4601,502, EURS 55	Belgia	2
NCPPB 4156(*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Țările de Jos	2
NCPPB 4157	66	LNPV 15,59	Franța	2
NCPPB 4158	39	CFBP 4608, Port448, EURS 80, NCPPB 4066	Portugalia	2
NCPPB 4160	69	IVIA-1632–2	Spania	2
NCPPB 4161	76	B3B	Germania	2
NCPPB 325	41	CFBP 2047, KEL 60–1, R 842	Statele Unite	1
NCPPB 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPPB 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP 310, SEQ 205	Columbia	2
NCPPB 3985	44	CFBP 4612, R 578, CIP 312	Peru	2T
NCPPB 3989	45	CFBP 4613, R 568, CIP 226	Brazilia	2T
NCPPB 3996	46	CFBP 3928, R 276/355, CIP 72, SEQ 225	Peru	3
NCPPB 3997	47	CFBP 4614, R 280/363, CIP 49, HAY 0131a	Australia	3
NCPPB 4029	48	CFBP 4615, R 297/ 349, CIP 121, CMIb 2861	Sri Lanka	4
NCPPB 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipine	4
NCPPB 4011	50	CFBP 4617, R288, Hemps 2	China	5

(\*) A se utiliza ca tulpină de referință standard biovarul 2 rasa 3 de *Ralstonia solanacearum*.

NOTĂ: Autenticitatea tulpinilor menționate anterior poate fi garantată numai în cazul în care acestea sunt obținute dintr-o colecție de culturi autentice.

Tabelul 2. Tulpini de referință SMT corelate serologic sau genetic în vederea utilizării pentru optimizarea testelor de detecție

Cod NCPPB	SMT #	Alt cod	Identificare
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>Marginalis</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 4164	-	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>2)</sup>
NCPPB 4165	-	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>2)</sup>
NCPPB 4166	58	CFBP 3567	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>1)</sup>
		CSL Pr 1150	
NCPPB 4167	60	CFBP 4618	<i>Ralstonia</i> sp <sup>1)</sup>
		PD 2778	
NCPPB 1127	53	CFBP3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> <sup>1)</sup>
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> <sup>1), 2), 3)</sup>
NCPPB 4168	61	CFBP 4619	<i>Enterobacter</i> sp <sup>1)</sup>
		IPO S339	
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp <sup>1)</sup>
NCPPB4170	63	CFBP 4621	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <sup>1), 2)</sup>
		IPO S306	
NCPPB 4171	64	CFBP 4622	<i>Curtobacterium</i> sp <sup>1), 2)</sup>
		IPO 1693	
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp <sup>1)</sup>
NCPPB 4173		PD 2318	<i>Aureobacteriu</i> sp <sup>2)</sup>
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp <sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup> Tulpină care poate determina în testele serologice (IF și/sau ELISA) o reacție încrucișată cu antiserurile policlonale.

<sup>2)</sup> Tulpină din care poate fi amplificat produsul PCR în anumite laboratoare, având dimensiuni asemănătoare celor preconizate la utilizarea primerilor specifici OLI-1 și Y-2 (vezi apendicele 6).

<sup>3)</sup> Poate determina o reacție încrucișată în majoritatea testelor, dar cunoscut ca fiind prezent numai pe banan în Indonezia.

#### b) Material de control standardizat disponibil în comerț

Următorul material de control standardizat este disponibil în colecția de culturi NCPPB:

- granule liofilizate de extract din 200 tuberculi de cartof sănătoși în calitate de control negativ pentru ansamblul testelor;
- granule liofilizate de extract din 200 tuberculi de cartofi sănătoși conținând  $10^3$ – $10^4$  și  $10^4$ – $10^6$  celule de biovar 2 de *Ralstonia solanacearum* (de exemplu, tulpina NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) în calitate de control pozitiv pentru testele serologice și testul PCR. Întrucât liofilizarea afectează viabilitatea celulelor, acestea nu pot fi folosite drept control standard pentru testele de izolare sau testele biologice;
- suspensii fixate cu formalină de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 (tulpina NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) de concentrație  $10^6$  celule/ml în calitate de control pozitiv pentru testele serologice.

#### B. Pregătirea controalelor pozitive și negative pentru testele rapide de detecție PCR/ F și FISH efectuate pe conuri de cartof

Se realizează o cultură de 48 de ore dintr-o tulpină virulentă de *Ralstonia solanacearum* biovar 2 rasa 3 (de exemplu, tulpina NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) pe mediu general SMSA și se face o suspensie în tampon fosfat 10 mM pentru a obține o densitate celulară de circa  $2 \times 10^8$  ufc/ml. În general, aceasta se obține printr-o suspensie ușor tulbure echivalentă cu o densitate optică de 0,15–600 nm.

Se extrag conurile de la 200 de tuberculi de cartof, varietate cu coaja albă cunoscută ca fiind neinfectată cu *Ralstonia solanacearum*.

Conurile se tratează după metoda obișnuită și se resuspendă sedimentul în 10 ml.

Se pregătesc 10 microfirole sterile de 1,5 ml cu 900  $\mu$ l de sediment resuspendat.

Se transferă 100  $\mu$ l din suspensia de *Ralstonia solanacearum* în prima microfiolă și se omogenizează prin vortexare.

Se realizează diluții zecimale în următoarele 5 microfirole.

Cele 6 microfirole contaminate vor fi utilizate drept control pozitiv. Cele 4 microfirole necontaminate se vor folosi în calitate de control negativ. Se etichetează microfirolele în mod corespunzător.

Se prepară alicote de 100  $\mu$ l în microfirole sterile de 1,5 ml pentru a obține 9 replici din fiecare control. Se conservă la – 16 și – 24°C până la utilizare.

Prezența și concentrația de celule de *Ralstonia solanacearum* în control trebuie confirmate în primul rând prin IF.

Pentru testul PCR, se efectuează o extracție de ADN din controale pozitive și negative pentru fiecare serie de probe de testare.

Pentru testele IF și FISH, se efectuează teste asupra controalelor pozitive și negative pentru fiecare serie de probe de testare.

Pentru testele IF și FISH, nivelul de detecție al celulelor de *Ralstonia solanacearum* trebuie să fie de cel puțin  $10^6$  și  $10^4$  celule/ml în controlul pozitiv, iar în controlul negativ să nu fie detectate.

## Apendicele 4

**Tampoane pentru procedura de testare**

Generalități: tampoanele sterilizate nedeschise pot fi păstrate până la un an.

**1. Soluții-tampon pentru procedura de extracție****1.1. Tampon de extracție (50 mM tampon fosfat, pH 7,0)**

Acest tampon este utilizat pentru extracția bacteriei din țesuturile plantei prin omogenizare sau agitare.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

Utilizarea următorilor compuși suplimentari poate fi utilă:

	Utilizare	Cantitate (la l)
Fulgi de Lubrol	Peptizant (*)	0,5 g
Silicon antispumant DC	Agent antispumant (*)	1,0 ml
Pirofosfat tetrasodic	Antioxidant	1,0 g
Polivinilpirolidonă-40000 (PVP-40)	Legarea inhibitorilor PCR	50 g

(\*) A se utiliza cu metoda de extracție prin omogenizare.

**1.2. Tampon de extract concentrat (10 mM tampon fosfat, pH 7,2)**

Acest tampon este utilizat pentru resuspenderea și diluția extractelor de conuri de tuberculi de cartof ca urmare a concentrării prin centrifugare.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se verifică pH-ul. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

**2. Soluții-tampon pentru testul de imunofluorescență****2.1. Tampon IF: 10 mM PBS, pH 7,2**

Acest tampon este utilizat pentru diluția anticorpilor.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Apă distilată	1,0 l

Se dizolvă ingredientele și se verifică pH-ul. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

**2.2. Tampon IF-Tween**

Acest tampon este utilizat pentru spălarea lamelor.

Se adaugă 0,1 % Tween 20 la tamponul IF.

**2.3. Tampon glicerol fosfat, pH 7,6**

Acest tampon este utilizat pentru montarea lamei IF pentru mărirea fluorescenței.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Apă distilată	100 ml

În comerț sunt disponibile soluții-suport antidecolorare, de exemplu, Vectashield® (Vector Laboratories) sau Citifluor® (Leica).

**3. Soluții tampon pentru testul ELISA indirect****3.1. Tampon de acoperire dublu concentrat, pH 9,6**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele și se verifică pH-ul. Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

Poate fi adăugat sulfat de sodiu (0,2 %) ca antioxidant pentru a împiedica constituirea de compuși aromatici oxidați.

**3.2. 10 × tampon de fosfat salin (PBS), pH 7,4**

NaCl	80,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29,0 g
KCl	2,0 g
Apă distilată	1,0 l

**3.3. PBS-Tween**

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Apă distilată	895 ml

**3.4. Tampon de blocare (anticorpi) (trebuie preparat proaspăt)**

10 × PBS	10,0 ml
----------	---------

Polivinilpirolidonă-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Lapte praf	0,5 g
Apă distilată	până la 100 ml

3.5. Soluție de substrat de fosfatază alcalină, pH 9,8	
Dietanolamină	97 ml
Apă distilată	800 ml

Se amestecă și se ajustează la pH 9,8 cu acid clorhidric (HCl) concentrat.  
Se adaugă apă distilată până la 1 litru.  
Se adaugă 0,2 g MgCl.  
Se dizolvă două tablete de 5 mg de substrat de fosfatază (Sigma) la 15 ml de soluție.

#### 4. Tampone pentru testul DASI ELISA

4.1. Tampon de acoperire dublu concentrat, pH 9,6	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
Apă distilată	1.000 ml

Se dizolvă ingredientele și se verifică pH-ul.

4.2. 10 × tampon de fosfat salin (PBS), pH 7,2–7,4	
NaCl	80,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	27,0 g
Apă distilată	1.000 ml

4.3. PBS-Tween	
10 × PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Apă distilată	950 ml

4.4. Tampon de substrat, pH 9,8	
Dietanolamină	100 ml
Apă distilată	900 ml

Se amestecă și se ajustează la pH 9,8 cu acid clorhidric (HCl) concentrat.

#### Apendicele 5

##### Stabilirea gradului de contaminare în testele IF și FISH

1. Se calculează numărul mediu de celule fluorescente tipice pe câmp (c).
2. Se calculează numărul de celule fluorescente tipice pe godeul lamei de microscop (C).

$C = c \times S/s$ , unde: S = suprafața (S) a godeului lamei cu multe godeuri, și  
s = suprafața (s) câmpului obiectivului

$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$ , unde: i = coeficientul de câmp (depinde de tipul ocularului și variază de la 8 la 24)  
K = coeficientul tubului (1 sau 1,25)  
G = grosimea (de 100 de ori, 40 de ori etc.) obiectiv.

3. Se calculează numărul de celule fluorescente tipice pe ml de sediment resuspendat (N).

$N = C \times 1.000/y \times F$ ,  
unde: y = volumul de extract concentrat resuspendat per godeu,  
și F = factorul de diluție al sedimentului resuspendat

#### Apendicele 6

##### Protocoale PCR și reactivi validați

NOTĂ: Testele preliminare trebuie să permită detecția reproductibilă a 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> celule de *Ralstonia solanacearum* pe ml de extract de probă

De asemenea, testele preliminare nu trebuie să indice rezultate fals pozitive cu o gamă de tulpini bacteriene selecționate (vezi apendicele 3).

**1. Protocolul PCR Seal et al. (1993)**

## 1.1. Secvența de oligonucleotide a primerilor

Primer sens OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'  
 Primer antisens Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Dimensiunea prevăzută a ampliconului de ADN-țintă de *Ralstonia solanacearum* = 288 bp

## 1.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	17,65 $\mu$ l	
Tampon PCR x 10 <sup>1</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 $\mu$ l	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Amestec dNTP (20 mM)	0,25 $\mu$ l	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Primer Y-2 (20 $\mu$ M)	1,25 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Polimerază Taq (5 U/ $\mu$ l) <sup>1</sup>	0,1 $\mu$ l	0,5 U
Volumul de ADN extras din probă	2,0 $\mu$ l	
Volum total	25 $\mu$ l	

<sup>1</sup> Metoda a fost validată cu Taq polimerază de PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

## 1.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

- 1 ciclu de: (i) 2 minute la 96°C: denaturarea matriței ADN  
 35 cicluri de: (ii) 20 secunde la 94°C: denaturarea matriței ADN  
 (iii) 20 secunde la 68°C: hibridizare cu primeri  
 (iv) 30 secunde la 72°C: extinderea ADN  
 1 ciclu de: (v) 10 minute la 72°C (extinderea finală)  
 (vi) Se menține la 4°C.

NOTĂ: Acest program a fost optimizat pentru termociclorul PerkinElmer 9600. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru o utilizare cu alte modele de termociclor.

## 1.4. Analiza restricției enzimatică a ampliconului

Fragmentele de ADN de *Ralstonia solanacearum* amplificate prin PCR produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 37°C cu enzima Ava II.

**2. Protocolul PCR Pastrik & Maiss (2000)**

## 2.1. Secvența de oligonucleotide a primerilor

Primer sens Ps-1 5'-AGT CGA ACG GCA GCG GGG G-3'  
 Primer antisens Ps-2 5'-GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA-3'

Dimensiunea prevăzută a ampliconului ADN-ului-țintă de *Ralstonia solanacearum* = 553 bp.

## 2.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	16,025 $\mu$ l	
Tampon PCR x 10 <sup>1</sup>	2,5 $\mu$ l	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fracțiune V) (10%)	0,25 $\mu$ l	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 $\mu$ l	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Primer Ps-2 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Polimerază Taq (5 U/ $\mu$ l) <sup>1</sup>	0,1 $\mu$ l	0,5 U
Volumul de ADN extras din probă	5,0 $\mu$ l	
Volum total	25,0 $\mu$ l	

<sup>1</sup> Metodele au fost validate cu Taq polimerază de PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

NOTĂ: Optimizată inițial pentru termociclorul MJ Research PTC 200 cu polimerază Taq Gibco.

AmpliTaq de PerkinElmer și tamponul pot fi utilizate, de asemenea, la aceleași concentrații.

## 2.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

- 1 ciclu de: (i) 5 minute la 95°C: denaturarea matriței ADN  
 35 cicluri de: (ii) 30 secunde la 95°C: denaturarea matriței ADN  
 (iii) 30 secunde la 68°C: hibridizare cu primeri  
 (iv) 45 secunde la 72°C: extinderea ADN  
 1 ciclu de: (v) 5 minute la 72°C (extinderea finală)  
 (vi) Se menține la 4°C.

NOTĂ: Acest program a fost optimizat pentru termociclorul MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru o utilizare cu alte modele de termociclor.

## 2.4. Analiza restricției enzimatică a ampliconului

Produsele de ADN de *Ralstonia solanacearum* amplificate prin PCR produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65°C cu enzima *Taq* I timp de 30 de minute. Fragmentele de restricție obținute din fragmentul specific de ADN de *Ralstonia solanacearum* au o lungime de 457 bp și de 96 bp.

## 3. Protocolul multiplex PCR și cu control intern al PCR (Pastrik et al., 2002)

## 3.1. Secvența de primer de oligonucleotide

Primer sens Rs-1-F	5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'
Primer antisens Rs-1-R	5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'
Primer sens Ns-5-F	5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'
Primer antisens Ns-6-R	5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

Dimensiunea prevăzută a ampliconului ADN-țintă de *Ralstonia solanacearum* = 718 bp (în prezența setului de primeri Rs)

Dimensiunea prevăzută a ampliconului controlului intern al PCR de 18S ARNr = 310 bp (în prezența setului de primeri Ns)

## 3.2. Amestecul reactiv pentru PCR

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	12,625 μl	
Tampon PCR x 10 <sup>1</sup> (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 μl	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 μl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 μl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 μM)	2,0 μl	0,8 μM
Primer Rs-1-R (10 μM)	2,0 μl	0,8 μM
Primer Ns-5-F (10 μM) <sup>2</sup>	0,15 μl	0,06 μM
Primer Ns-6-R (10 μM) <sup>2</sup>	0,15 μl	0,06 μM
Polimerază <i>Taq</i> (5 U/μl) <sup>1</sup>	0,2 μl	1,0 U
Volumul de ADN extras din probă	5,0 μl	
Volum total	25,0 μl	

<sup>1</sup> Metodele au fost validate cu polimerază *Taq* de PerkinElmer (Ampli $Taq$ ) și Gibco BRL.

<sup>2</sup> Concentrațiile primerilor Ns-5-F și Ns-6-R au fost optimizate pentru extracția conurilor de cartof, utilizându-se metoda de omogenizare și pentru metoda de izolare a ADN Pastrik (2000) (vezi secțiunea VI. A.6.1.a). Va fi nevoie de o nouă optimizare a concentrațiilor de reactivi în cazul în care se aplică extracția prin agitare și se folosesc alte metode de izolare de ADN.

## 3.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura:

1 ciclu de:	(i)	5 minute la 95°C: denaturarea matriței ADN
35 cicluri de:	(ii)	30 secunde la 95°C: denaturarea matriței ADN
	(iii)	30 secunde la 58°C: hibridizare cu primeri
	(iv)	45 secunde la 72°C: extinderea ADN
1 ciclu de:	(v)	5 minute la 72°C (extinderea finală)
	(vi)	Se menține la 4°C.

NOTĂ: Acest program a fost optimizat pentru termociclorul MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru utilizarea cu alte modele de termociclor.

## 3.4. Analiza restricției enzimatică a ampliconului

Produsele de ADN de *Ralstonia solanacearum* amplificate prin PCR produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65°C cu enzima *Bsm* I sau cu o enzimă izoschizomeră (de exemplu, *Mva* 1269 I) timp de 30 de minute.

4. Protocolul PCR biovar specific de *Ralstonia solanacearum* (Pastrik et al., 2001)

## 4.1. Secvența de oligonucleotide a primerilor

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

Dimensiunea prevăzută a ampliconului ADN-țintă de *Ralstonia solanacearum*:

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

cu Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp.

## 4.2. Amestecul reactiv pentru PCR

## a) PCR specific biovarului 1/2

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	12,925 μl	
Tampon PCR x 10 <sup>1</sup>	2,5 μl	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 μl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 μl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 μM)	2 μl	0,8 μM

Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) <sup>1</sup>	0,2 µl	1 U
Volumul de ADN extras din probă	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

<sup>1</sup> Metodele au fost validate cu polimerază Taq PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

#### b) PCR specific biovarului 3/4/5

Reactiv	Cantitate per reacție	Concentrație finală
Apă ultrapură sterilă	14,925 µl	
Tampon PCR x 10 <sup>1</sup>	2,5 µl	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fracțiune V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
Amestec dNTP (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Polimerază Taq (5 U/µl) <sup>1</sup>	0,2 µl	1 U
Volumul de ADN extras din probă	5,0 µl	
Volum total	25,0 µl	

<sup>1</sup> Metodele au fost validate cu polimerază Taq PerkinElmer (AmpliTaq) și Gibco BRL.

#### 4.3. Condițiile reacției PCR

Se urmează procedura descrisă în continuare pentru reacțiile specifice biovarului 1/2 și biovarului 3/4/5:

- 1 ciclu de: (i) 5 minute la 95°C: denaturarea matriței ADN  
 35 cicluri de: (ii) 30 secunde la 95°C: denaturarea matriței ADN  
 (iii) 30 secunde la 58°C: hibridizare cu primeri  
 (iv) 45 secunde la 72°C: extinderea ADN  
 1 ciclu de: (v) 5 minute la 72°C (extinderea finală)  
 (vi) Se menține la 4°C.

NOTĂ: Acest program a fost optimizat pentru termociclorul MJ Research PTC 200. Poate fi necesară o modificare a duratei ciclurilor (ii), (iii) și (iv) pentru utilizarea cu alte modele de termociclor.

#### 4.4. Analiza restricției enzimatică a amplimerului

Produsele de ADN de *Ralstonia solanacearum* amplificate prin PCR utilizând primerii Rs-1-F și Rs-1-R produc un polimorfism distinct al dimensiunii fragmentelor de restricție după incubare la 65°C cu enzima *Bsm* I sau cu o enzima izoschizomeră (de exemplu, *Mva* 1269 I) timp de 30 de minute. Produsele de ADN de *Ralstonia solanacearum* amplificate prin PCR utilizând primerii Rs-1-F și Rs-3-R nu au puncte de restricție.

#### 5. Prepararea tamponului de încărcare

##### 5.1. Albastru de bromfenol (soluție concentrată de 10%)

Albastru de bromfenol	5 g
Apă distilată (bidistilată)	50 ml

##### 5.2. Tampon de încărcare

Glicerol (86%)	3,5 ml
Albastru de bromfenol (5.1)	300 µl
Apă distilată (bidistilată)	6,2 ml

##### 6. Tampon tris-acetat EDTA (TAE) 10 x, pH 8,0

Tampon TRIS	48,40 g
Acid acetic glacial	11,42 ml
EDTA (sare disodică)	3,72 g
Apă distilată	1,00 l

Înainte de utilizare se diluează până la 1 x.

De asemenea, acest tampon este disponibil în comerț (de exemplu, Invitrogen sau echivalent).

#### Apendicele 7

#### Reactivi validați pentru testul FISH

##### 1. Oligosonde

Sondă OLI-1-CY3 specifică *Ralstonia solanacearum*:  
 5'-GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Sondă eubacteriană EUB-338-FITC nespecifică: 5'-GCT  
 GCC TCC CGT AGG AGT-3'

##### 2. Soluția de fixare

Atenție! Soluția de fixare conține paraformaldehidă, care este toxică, se manipulează cu mănuși și nu se inhalează. Se recomandă să se lucreze într-o hotă chimică.

- (i) Se încălzesc 9 ml de apă pentru biologie moleculară (de exemplu, apă ultrapură) la circa 60°C și se adaugă 0,4 g de paraformaldehidă. Paraformaldehida se dizolvă după adăugarea a 5 picături de NaOH 1N și amestecarea pe un agitator magnetic.

- (ii) Se ajustează pH-ul la 7,0 prin adăugarea a 1 ml de tampon fosfat 0,1 M (PB; pH 7,0) și 5 picături de HCl 1 N. Se verifică pH-ul cu benzi indicatoare și se ajustează, atunci când este necesar, cu HCl sau NaOH.

Atenție! Nu se folosește pH-metrul în soluții care conțin paraformaldehidă.

- (iii) Se filtrează soluția printr-un filtru cu membrană de 0,22 µm și se păstrează la 4°C până la utilizare ferită de praf.

##### 3. Hibmix 3 x

NaCl	2,7 M
Tris/HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (sterilizată prin filtrare și autoclavată)	15 mM

Se diluează până la 1 x, după cum este prevăzut.



**4. Soluție de hibridizare**

Hibmix 1 x	
Sodiu dodecilsulfat (SDS)	0,01%
Formamidă	30%
Sondă EUB 338	5 ng/μl
Sondă OLI-1 sau OLI-2	5 ng/μl

Se prepară cantitățile de soluție de hibridizare în conformitate cu rețeta din tabelul 1. Pentru fiecare lamă (conținând două probe diferite duplicate) este nevoie de 90 μl de soluție de hibridizare.

*Important: Formamida este foarte toxică. Prin urmare, se poartă mănuși și se iau măsurile de siguranță necesare!*

Tabelul 1. Cantități recomandate pentru prepararea amestecului de hibridizare

Numărul de lame	1	4	6	8	10
Apă ultrapură sterilă	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
Hibmix 3X	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
Sodiu dodecilsulfat (SDS) 1%	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamidă	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Sondă EUB 338 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Sondă OLI-1 sau OLI-2 (100 ng/μl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volum total (μl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NOTĂ: Toate soluțiile care conțin oligosonde sensibile la lumină se păstrează la întuneric, la – 20°C. Se protejează de lumina directă a soarelui sau de lumina electrică directă în timpul utilizării.

**5. Tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 g
Apă distilată	1,00 l

Se dizolvă ingredientele, se verifică pH-ul și se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

*Apendicele 8***Condiții de cultură pentru vinete și tomate**

Se însămânțează semințe de tomate (*Lycopersicon esculentum*) și de vinete (*Solanum melongena*) în pământ de seră pasteurizat. Se transplantează plantulele în pământ pentru flori pasteurizat atunci când cotiledoanele sunt dezvoltate în totalitate (10–14 zile).

Vinetele sau tomatele trebuie cultivate în seră, înainte de inoculare, în următoarele condiții de mediu:

Durata zilei: 14 ore sau durata naturală a zilei atunci când este mai mare

Temperatura: ziua: 21–24°C  
noaptea: 14–18°C

Varietatea sensibilă de tomată: «MoneyMaker»

Varietatea sensibilă de vânăță: «Black Beauty»

Furnizori: vezi website-ul <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## REFERINȚE

- Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762–770.
- Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1–39.
- Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. I. abarre and B. (ouan. 1999. Design of division specific primers of (*Ralstonia solanacearum*) and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373–380.
- Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, T.L., Collar, T. and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68. 3634–3638.
- Cook, D., Barlow, E. and Sequeira. L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive respon. *se. Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113–121.
- Elphinstone. J.G., Hcnnessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanaceamm* in potato tuber extracts. *FPPO Bulletin* 26: 663–678.
- Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ecl.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10. 3–5. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27: 265–277.
- Hayward, A.C., El-Nashaar. H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearm*. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 269–280.
- Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379–384.
- Janse, j.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18. 343–351.

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

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

14. Klemen Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, 568 pp.

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

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

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

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

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

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

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

22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas*

*solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7. 67–79.

23. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad FHrsrg. ș.-3. cd.: Si. Paul, Minnesota: 373 pp.

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

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

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

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

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

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

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

#### ANEXA Nr. III

1. Pentru fiecare apariție suspectată pentru care a fost identificat un rezultat pozitiv la testul sau testele de detecție, în conformitate cu metodele prevăzute în anexa nr. II pentru materialul de plantare și în toate celelalte cazuri, pentru care este așteptată confirmarea sau infirmarea, trebuie să se păstreze și să se conserve în mod corespunzător:

– toți tuberculii prelevați și, în măsura în care este posibil, toate plantele prelevate;

– orice extract rămas și material preparat suplimentar pentru testul sau testele de detecție, de exemplu, lamele de imunofluorescență; și

– toată documentația relevantă,

până la finalizarea metodei menționate.

Păstrarea tubercuilor permite testarea soiului, efectuată atunci când este cazul.

2. În cazul confirmării organismului, trebuie să se păstreze și să se conserve în condiții corespunzătoare:

– materialul specificat la pct. 1;

– o probă de tomate sau vinete infectate prin inoculare cu extract din tuberculi sau plante, după caz; și

– cultura izolată a organismului,

timp de cel puțin o lună după procedura de notificare prevăzută la art. 9 din ordin.

#### ANEXA Nr. IV

Elementele din investigația prevăzută la art. 8 alin. (2) lit. a) din ordin includ, acolo unde este cazul:

(i) locurile de producție:

– în care se cultivă sau au fost cultivați cartofi care sunt înrudiți prin clonare cu cartofii depistați ca fiind infectați cu acest organism;

– în care se cultivă sau au fost cultivate tomate care sunt din aceeași sursă cu tomatele depistate ca fiind infectate cu acest organism;

– în care se cultivă sau au fost cultivați cartofi ori tomate care au fost plasați sub control oficial datorită apariției suspectate a organismului;

– în care se cultivă sau au fost cultivați cartofi care sunt înrudiți prin clonare cu cartofii care au fost cultivați în locurile de producție depistate ca fiind infestate cu acest organism;

– în care se cultivă cartofi sau tomate și care sunt situate în vecinătatea unor locuri de producție infestate, incluzând acele locuri de producție care utilizează echipamente și utilaje de producție în mod direct sau printr-un contractor comun;

– care utilizează pentru irigare sau stropire apa de suprafață din orice sursă confirmată ori suspectată a fi contaminată cu acest organism;

1. Elementele care trebuie luate în considerare la determinarea extinderii contaminării probabile în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. e) și alin. (4) lit. c) din ordin includ:

– materialul de plantare cultivat într-un loc de producție desemnat ca fiind contaminat în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin;

– locurile de producție care au legătură cu materialul de plantare desemnat ca fiind contaminat în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin, inclusiv cele care utilizează echipamente și utilaje de producție în mod direct sau printr-un contractor comun;

– materialul de plantare produs în locul sau locurile de producție prevăzute la liniuța anterioară sau care se află în aceste locuri de producție în timpul perioadei în care materialul de plantare desemnat ca fiind contaminat în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin a fost prezent la locul de producție prevăzut la prima liniuță;

– spațiile în care se manipulează materialul de plantare provenit din locurile de producție menționate la liniuțele anterioare;

– orice utilaj, vehicul, container, depozit sau unități ale acestora și orice alt obiect, inclusiv ambalajul, care au venit în contact cu materialul de plantare desemnat ca fiind contaminat în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin;

– orice material de plantare depozitat în sau în contact cu oricare dintre structurile sau obiectele menționate la liniuța anterioară, înainte de curățarea și dezinfectarea acestora;

– ca rezultat al investigației și testării în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. a) din ordin, în cazul cartofilor, acei tuberculi sau plante cu o înrudire clonală colaterală ori parentală și, în cazul tomatelor, acele plante cu aceeași sursă ca materialul de plantare desemnat ca fiind contaminat în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin și pentru care apare probabilă contaminarea printr-o legătură clonală, deși rezultatele testării privind prezența organismului pot fi negative. Testarea soiului poate fi efectuată pentru a se verifica identitatea tuberculilor sau a plantelor contaminate și legătura clonală;

– locul sau locurile de producție a materialului de plantare menționat la liniuța anterioară;

– locul sau locurile de producție a materialului de plantare care utilizează pentru irigare ori stropire apă care a fost desemnată ca fiind contaminată în conformitate cu art. 8 alin. (4) lit. b) din ordin;

– materialul de plantare produs în câmpurile inundate cu apă de suprafață confirmată ca fiind contaminată.

2. Elementele care trebuie luate în considerare la determinarea unei posibile răspândiri în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. f) și alin. (4) lit. c) din ordin includ:

(i) în cazurile prevăzute la art. 8 alin. (2) lit. f) din ordin:

– vecinătatea altor locuri de producție care cultivă materialul de plantare;

– producția și utilizarea în comun a stocurilor de cartofi de sămânță;

– care utilizează pentru irigare sau stropire apa de suprafață dintr-o sursă folosită în comun cu locurile de producție confirmate sau suspectate a fi infestate cu acest organism;

– care sunt sau au fost inundate cu apa de suprafață confirmată ori suspectată a fi contaminată cu acest organism;

și

(ii) apă de suprafață utilizată la irigare sau stropire sau care a inundat unul sau mai multe câmpuri sau locuri de producție confirmate a fi infestate cu acest organism.

#### ANEXA Nr. V

– locurile de producție care utilizează apă de suprafață pentru irigarea sau stropirea materialului de plantare, în cazurile în care există sau a existat riscul de scurgere ori de inundare cu apă de suprafață din unul sau mai multe locuri de producție desemnate ca fiind contaminate în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin;

(ii) în cazurile în care apa de suprafață a fost desemnată ca fiind contaminată în conformitate cu art. 8 alin. (4) lit. b) din ordin:

– locul sau locurile de producție învecinate care produc materialul de plantare sau care sunt în pericol de a fi inundate cu apa de suprafață desemnată ca fiind contaminată;

– orice bazin de irigare îngropat, care are legătură cu apa de suprafață desemnată ca fiind contaminată;

– întinderile de apă în legătură cu apa de suprafață desemnată ca fiind contaminată, ținându-se seama de:

– direcția și nivelul debitului apei desemnate ca fiind contaminată;

– prezența plantelor-gazdă sălbatice solanacee.

3. Notificarea prevăzută la art. 9 din ordin include:

– imediat după confirmarea prezenței organismului prin teste de laborator, efectuate conform metodelor prevăzute în anexa nr. II, cel puțin:

– pentru cartofi:

a) denumirea soiului lotului;

b) tipul (consum, sămânță etc.) și, dacă este cazul, categoria de cartofi de sămânță;

– pentru plantele de tomate, denumirea soiului lotului și, dacă este cazul, categoria;

– fără a prejudicia cerințele de notificare a unei apariții suspectate conform art. 7 alin. (2) din ordin, statul membru în care a fost confirmată apariția, în cazul în care există riscul de contaminare a materialului de plantare provenit din unul sau mai multe state membre, comunică de îndată statului membru sau statelor membre în cauză informațiile necesare conform art. 10 din ordin, cum ar fi:

a) denumirea soiului lotului de cartofi sau tomate;

b) numele și adresa expeditorului și destinatarului;

c) data livrării lotului de cartofi sau tomate;

d) mărimea lotului de cartofi sau tomate livrat;

e) atunci când este cazul, o copie a pașaportului fitosanitar sau cel puțin numărul pașaportului fitosanitar sau numărul de înregistrare al producătorului sau al comerciantului și o copie a bonului de livrare.

Comisiei i se notifică imediat aceste informații.

4. Detaliile notificării suplimentare prevăzute la art. 9 alin. (2) din ordin includ, după finalizarea tuturor investigațiilor, pentru fiecare caz:

a) data la care s-a confirmat contaminarea;

b) o scurtă descriere a investigațiilor realizate pentru identificarea sursei și posibilei răspândiri a contaminării, precizându-se intensitatea prelevării;

c) informații privind sursa/sursele identificate sau presupuse ale contaminării;

d) detalii ale întinderii contaminării desemnate, inclusiv numărul de locuri de producție, și pentru cartofi, numărul de loturi, cu indicarea soiului și, în cazul cartofului de sămânță, a categoriei;

e) detalii ale zonei delimitate, inclusiv numărul de locuri de producție nedeseminate ca fiind contaminate, dar incluse în zonă;

f) detalii ale apei desemnate ca fiind contaminată, inclusiv numele și amplasarea apei și întinderea desemnării/interdicția de irigare;

g) pentru orice transport sau lot de plante de tomate desemnat ca fiind contaminat, certificatele fitosanitare prevăzute la art. 11 alin. (2) lit. d) și alin. (3), (4) și (5) din Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 și numărul pașaportului, în conformitate cu anexa nr. V partea A secțiunea 1 pct. 2.2 din Hotărârea Guvernului nr. 563/2007;

h) toate celelalte informații pe care Comisia le solicită, referitoare la focarul sau focarele confirmate.

ANEXA Nr. VI

1. Prevederile art. 11 din ordin se referă la:

– utilizarea în hrana animalelor după tratamentul termic, astfel încât să nu existe niciun risc de supraviețuire a organismului; sau

– eliminarea deșeurilor într-un loc autorizat de distrugere, în mod oficial, în care nu există niciun risc identificabil de propagare a organismului în mediul înconjurător, de exemplu, prin infiltrare în terenuri agricole sau prin contact cu surse de apă care pot fi utilizate pentru irigarea terenurilor agricole; sau

– incinerare; sau

– transformarea industrială prin livrare directă și imediată la o fabrică de procesare care dispune de instalații de eliminare a deșeurilor, autorizate oficial, despre care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului și că dispune de un sistem care permite curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc fabrica; sau

– alte măsuri, în situația în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului; aceste măsuri și justificarea lor trebuie să fie notificate Comisiei și celorlalte state membre.

Toate deșeurile asociate și care rezultă din operațiile menționate anterior sunt eliminate prin metode aprobate oficial în conformitate cu anexa nr. VII.

2. Utilizarea sau eliminarea corespunzătoare a materialului de plantare prevăzut la art. 12 din ordin, sub controlul organismelor oficiale responsabile ale statului membru sau ale statelor membre în cauză, prin comunicări corespunzătoare între organismele oficiale responsabile pentru a asigura controlul permanent și aprobarea de către organismele oficiale responsabile ale statului membru în care cartofii urmează să fie ambalați sau procesați, cu privire la instalațiile de eliminare a deșeurilor menționate la prima și a doua liniuță, include:

(i) pentru tuberculii de cartofi:

– utilizarea acestora drept cartofi destinați consumului gata ambalați pentru livrare și utilizarea directă, fără reambalare, într-un loc care dispune de instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor. Cartofii destinați plantării pot fi manipulați în același loc, numai dacă sunt manipulați separat sau după curățarea și dezinfectarea acestuia; sau

– utilizarea acestora drept cartofi de consum destinați procesării industriale după livrare directă și imediată la o fabrică de prelucrare care dispune de instalații corespunzătoare de eliminare a deșeurilor, precum și de un sistem care permite curățarea și dezinfectarea cel puțin a vehiculelor care părăsesc fabrica; sau

– un alt mod de utilizare sau eliminare, în măsura în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului și supus aprobării de către organismele oficiale responsabile;

(ii) pentru alte părți de plantă, inclusiv resturi de tulpini și frunze:

– distrugerea; sau

– un alt mod de utilizare sau eliminare, în măsura în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului și supus aprobării de către organismele oficiale responsabile.

3. Metodele corespunzătoare de decontaminare a obiectelor prevăzute la art. 13 din ordin sunt curățarea și, dacă este cazul, dezinfectarea, astfel încât să nu existe niciun risc identificabil de răspândire a organismului. Aceste metode sunt aplicate sub control oficial.

4. Măsurile care trebuie puse în aplicare în zona (zonele) demarcată(e), stabilită(e) conform art. 8 alin. (2) lit. f) și alin. (4) lit. c) din ordin și menționate la art. 14 din ordin includ:

4.1. atunci când locurile de producție au fost desemnate ca fiind contaminate conform art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin:

a) într-un câmp sau într-o unitate de producție de cultură protejată desemnată ca fiind contaminată conform cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin;

(i) în cursul a cel puțin 4 ani de cultură care urmează contaminării desemnate:

– sunt luate măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartof și tomate, precum și a altor plante-gazdă ale organismului, inclusiv a buruienilor solanacee; și

– nu se plantează următoarele:

– tuberculi, plante sau semințe de cartof;

– plante și semințe de tomate;

– ținându-se seama de biologia organismului;

– alte plante-gazdă;

– plante din specia *Brassica* pentru care există un risc identificat de supraviețuire a organismului;

– culturi pentru care există un risc identificat de răspândire a organismului;

– în primul sezon de cultură a cartofilor sau tomatelor care urmează după perioada specificată la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost găsit liber de plante spontane de cartof și tomate și de alte plante-gazdă, inclusiv buruieni solanacee, în timpul inspecțiilor oficiale pentru cel puțin 2 ani consecutivi de cultură înainte de plantare;

– în cazul cartofilor, se va autoriza numai producția de cartofi pentru consum;

– în cazul cartofilor și tomatelor, tuberculii de cartof sau plantele de tomate recoltate vor fi testate, după caz, în conformitate cu procedura descrisă în anexa nr. II;

– în sezonul de cultură a cartofilor sau tomatelor care urmează celui prevăzut la liniuța anterioară și după un ciclu adecvat de rotație, care trebuie să fie de minimum 2 ani, se autorizează plantarea cartofilor de sămânță și se efectuează inspecții oficiale conform art. 2; sau

(ii) pe parcursul a 5 ani de cultură care urmează anului contaminării desemnate:

– se iau măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartofi și tomate, precum și a altor plante-gazdă ale organismului prezente în mod spontan, inclusiv a buruienilor solanacee; și

– terenul trebuie menținut, în cursul primilor 3 ani, înțelenit sau cultivat cu cereale în conformitate cu riscul identificat sau ca pășune permanentă și în acest caz este frecvent cosit scurt sau pășunat intensiv sau cultivat cu iarbă pentru producția de semințe, urmată de plantarea în următorii 2 ani cu plante care nu sunt gazdă organismului pentru care nu există un risc identificat de supraviețuire sau răspândire a organismului;

– în primul sezon de cultivare a cartofilor sau tomatelor care urmează după perioadă specificată la liniuța anterioară și cu condiția ca terenul să fi fost găsit liber de plante spontane de cartof și tomate și de alte plante-gazdă, inclusiv buruieni solanacee, în timpul inspecțiilor oficiale timp de cel puțin 2 ani consecutivi înainte de plantare:

– în cazul cartofilor, se autorizează producția de cartofi de sămânță sau de consum;

– tuberculii de cartof sau plantele de tomate recoltate se testează, după caz, în conformitate cu procedura descrisă în anexa nr. II;

b) în toate celelalte terenuri din locul de producție contaminat și cu condiția ca organismele oficiale să aibă certitudinea că riscul reprezentat de plantele spontane de cartof și tomate și de alte plante-gazdă ale organismului, inclusiv buruienile solanacee prezente în mod spontan, a fost eliminat:

– în anul de cultivare care urmează anului contaminării desemnate:

– fie nu se plantează niciun tubercul, plantă, sămânță de cartof sau altă plantă-gazdă a organismului; sau

– în cazul tuberculilor de cartof, cartofii de sămânță certificați pot fi plantați numai pentru producția destinată consumului;

– în cazul plantelor de tomate, răsadul de tomate obținut din semințe care îndeplinesc cerințele prevăzute de Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 poate fi plantat numai pentru producția de fructe;

– în al doilea an de cultivare care urmează anului contaminării desemnate:

– în cazul cartofilor, se plantează numai cartofi de sămânță certificați sau cartofi de sămânță testați oficial pentru detecția prezenței veștejirii bacteriene și cultivați sub control oficial în locuri de producție, altele decât cele prevăzute la pct. 4.1 pentru producția de cartofi de sămânță sau consum;

– în cazul tomatelor, numai răsadul de tomate obținut din semințe care îndeplinesc cerințele prevăzute de Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 sau, în cazul înmulțirii vegetative din plante de tomate obținute din astfel de semințe și cultivate sub control oficial în locuri de producție, altele decât cele menționate la pct. 4.1, poate fi plantat fie pentru producția de material de înmulțire, fie pentru producția de fructe;

– în cel de-al treilea an de cultivare care urmează anului contaminării desemnate:

– în cazul cartofilor, se plantează numai cartofi de sămânță certificați sau cultivați sub control oficial proveniți din cartofi de sămânță certificați pentru producția de cartofi de sămânță sau de consum;

– în cazul tomatelor, se plantează numai răsad de tomate obținut din semințe care îndeplinesc cerințele prevăzute de Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 sau plante de tomate obținute sub control oficial din astfel de plante, fie pentru producția de material de înmulțire, fie pentru producția de fructe;

– în fiecare dintre anii de cultivare prevăzuți la liniuțele anterioare, se iau măsuri pentru eliminarea plantelor spontane de cartofi și a altor plante-gazdă ale organismului și se desfășoară inspecții oficiale ale culturii în perioade adecvate și, pe fiecare câmp de cartofi, cartofii recoltați sunt testați oficial în conformitate cu procedura descrisă în anexa nr. II;

c) imediat după desemnarea contaminării în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin și după primul an de cultivare care urmează:

– toate utilajele și instalațiile de depozitare de la locul de producție și implicate în producția cartofilor sau tomatelor sunt curățate și, după caz, dezinfectate, utilizându-se metodele corespunzătoare prevăzute la pct. 3;

– sunt introduse controale oficiale ale programelor de irigare și stropire, inclusiv o interdicere a acestora, pentru a preveni răspândirea organismului atunci când este cazul;

d) într-o unitate de producție de cultură protejată, desemnată ca fiind contaminată conform art. 8 alin. (2) lit. b), c) și d) din ordin, unde este posibilă înlocuirea completă a mediului de creștere:

– nu se plantează niciun tubercul, nicio plantă sau sămânță de cartof ori alte plante-gazdă ale organismului, inclusiv plante și semințe de tomate, cu excepția cazului în care unitatea de producție respectivă a fost supusă măsurilor oficiale de control pentru eliminarea organismului și pentru îndepărtarea întregului material vegetal gazdă, inclusiv o schimbare completă a mediului de cultură, curățarea și, după caz, dezinfectarea unității respective, a întregului echipament și în care a fost acordată ulterior aprobarea pentru producția de cartofi sau tomate din partea organismelor oficiale responsabile; și

– pentru producția de cartofi, această producție trebuie să provină din cartofi de sămânță certificați sau din minituberculi ori microplante provenite din surse testate;

– pentru producția de tomate, această producție trebuie să provină din semințe care îndeplinesc cerințele prevăzute de Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 sau, în cazul înmulțirii vegetative, din răsad de tomate provenit din astfel de semințe și cultivate sub control oficial;

– sunt introduse controale oficiale asupra programelor de irigare și stropire, inclusiv o interdicere a acestora, pentru prevenirea răspândirii organismului, atunci când este cazul.

4.2. Fără a prejudicia măsurile descrise la pct. 4.1, organismele oficiale responsabile în cadrul zonei demarcate:

a) imediat după contaminarea desemnată, se asigură că toate echipamentele și instalațiile de depozitare din astfel de locuri și implicate în producția de cartofi sau de tomate sunt curățate și dezinfectate corespunzător, în conformitate cu metodele descrise la pct. 3;

b) imediat după desemnarea contaminării și timp de cel puțin 3 ani de cultivare:

(ba) în cazurile în care zona demarcată a fost determinată conform art. 8 alin. (2) lit. f) din ordin:

– se asigură supravegherea de către organismele oficiale a locurilor de cultivare, depozitare sau de manipulare a tuberculilor de cartofi sau a tomatelor, împreună cu locurile în care funcționează utilajele pentru prelucrarea cartofilor sau a tomatelor;

– se solicită plantarea doar a semințelor certificate sau a semințelor cultivate sub control oficial pentru toate culturile de cartofi din zona respectivă și testarea după recoltare a cartofilor de sămânță cultivați în locurile de producție desemnate ca fiind probabil contaminate în conformitate cu art. 8 alin. (2) lit. e) din ordin;

– se solicită manipularea separată a stocurilor de cartofi de sămânță recoltați față de cele destinate consumului în toate locurile din zona respectivă sau punerea în aplicare a unui sistem de curățare și, după caz, de dezinfecție între procedurile de manipulare a stocurilor de cartofi de sămânță și a celor destinați consumului;

– se solicită plantarea numai a plantelor de tomate provenite din semințe care îndeplinesc cerințele prevăzute de Hotărârea Guvernului nr. 563/2007 sau, în cazul înmulțirii vegetative, din răsad provenit din astfel de semințe și cultivate sub control oficial, pentru toate culturile de tomate din zona respectivă;

– se desfășoară inspecții oficiale în conformitate cu art. 2 din ordin;

(bb) în cazurile în care apa de suprafață a fost declarată contaminată în conformitate cu art. 8 alin. (4) lit. b) din ordin sau inclusă printre elementele de răspândire posibilă a organismului în conformitate cu anexa nr. V pct. 2:

- se desfășoară inspecții anuale în perioade adecvate, inclusiv prelevarea de probe de apă de suprafață și, după caz, a plantelor-gazdă solanacee din sursele relevante de apă, precum și testarea în conformitate cu metodele stabilite în anexa nr. II pentru materialul de plantare și pentru celelalte cazuri;
- se introduc controale oficiale asupra programelor de irigare și stropire, inclusiv o interdicție a utilizării apei desemnate ca fiind contaminată pentru irigarea și stropirea materialului de plantare și, după caz, a altor plante-gazdă, pentru a preveni răspândirea organismului. Această interdicție poate fi revizuită în baza

rezultatelor obținute din inspecțiile anuale și desemnările de contaminare pot fi retrase atunci când organismele oficiale responsabile sunt sigure că apele de suprafață nu mai sunt contaminate. Utilizarea apei supuse interdicției poate fi autorizată sub control oficial, pentru irigarea și stropirea plantelor-gazdă în cazul în care tehnicile aplicate, autorizate oficial, elimină organismul și împiedică răspândirea acestuia;

– în cazurile în care deșeurile lichide deversate sunt contaminate, se introduc controale oficiale pentru eliminarea deșeurilor solide ori lichide din fabricile de procesare industrială sau din locurile de ambalare, manipulare a materialului de plantare;

c) se stabilește un program, după caz, de înlocuire a tuturor stocurilor de cartofi de sămânță într-o perioadă de timp corespunzătoare.

*ANEXA Nr. VII*

Metodele de eliminare a deșeurilor aprobate oficial, prevăzute la pct. (1) din anexa nr. VI, trebuie să fie în conformitate cu următoarele prevederi, astfel încât să se evite orice risc identificabil de răspândire a organismului:

(i) deșeurile de cartofi și tomate (inclusiv cartofii respinși, cojile și tomatele), precum și orice alt deșeu solid asociat cartofilor și tomatelor (inclusiv solul, pietrele și alte resturi) sunt eliminate, fie:

– într-un loc autorizat de eliminare a deșeurilor aprobat oficial în care nu există niciun risc identificabil de propagare a organismului în mediul înconjurător, de exemplu, prin infiltrare în terenurile agricole sau în contact cu surse de apă care pot fi utilizate pentru irigarea terenurilor agricole. Deșeurile sunt transportate direct în locurile respective în condiții de izolare, astfel încât să nu existe riscul răspândirii acestora; sau

– prin incinerare; sau

– prin alte măsuri, în situația în care s-a stabilit că nu există niciun risc identificabil de răspândire a organismului. Aceste măsuri trebuie notificate Comisiei și celorlalte state membre;

(ii) deșeurile lichide: înainte de eliminare, deșeurile lichide care conțin particule solide în suspensie trebuie să fie supuse unui procedeu de filtrare sau de sedimentare pentru a le îndepărta. Aceste particule solide vor fi eliminate conform pct. (i).

Apoi deșeurile lichide sunt ulterior:

– complet încălzite la o temperatură de 60°C timp de cel puțin 30 de minute înainte de a fi eliminate; sau

– eliminate într-un alt mod, aprobat oficial și sub control oficial, astfel încât să nu existe niciun risc identificabil ca deșeurile să intre în contact cu terenurile agricole sau cu surse de apă care ar putea fi folosite pentru irigarea terenurilor agricole. Detaliile cu privire la aceasta sunt notificate celorlalte state membre și Comisiei.

Procedurile descrise în prezenta anexă se aplică, de asemenea, și deșeurilor rezultate de la manipularea, eliminarea și prelucrarea loturilor contaminate.

MINISTERUL ECONOMIEI ȘI FINANTELOR

## O R D I N

### **privind modificarea Instrucțiunilor pentru stabilirea procedurii privind efectuarea operațiunilor necesare pentru finanțarea de la bugetul de stat în cazul indisponibilității temporare a contribuției financiare a Comunității Europene și în cazul compensărilor efectuate de Comisia Europeană, precum și pentru tratamentul dobânzii acumulate în conturile bancare ale Fondului Național în cadrul programelor ISPA, aprobate prin Ordinul ministrului finanțelor publice nr. 296/2007**

În temeiul art. 11 alin. (4) din Hotărârea Guvernului nr. 386/2007 privind organizarea și funcționarea Ministerului Economiei și Finanțelor,

având în vedere:

– prevederile art. 8 din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 63/1999 cu privire la gestionarea fondurilor nerambursabile alocate României de către Comunitatea Europeană, precum și a fondurilor de cofinanțare aferente acestora, aprobată prin Legea nr. 22/2000, cu modificările și completările ulterioare,

– prevederile Memorandumului de înțelegere dintre Guvernul României și Comunitatea Europeană privind utilizarea Fondului Național pentru ISPA, semnat la București la 20 octombrie 2000, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 1.328/2000,

– prevederile memorandumurilor de finanțare ISPA dintre Guvernul României și Comisia Europeană,

**ministrul economiei și finanțelor** emite următorul ordin:

**Art. I.** – Instrucțiunile pentru stabilirea procedurii privind efectuarea operațiunilor necesare pentru finanțarea de la bugetul de stat în cazul indisponibilității temporare a contribuției financiare a Comunității Europene și în cazul compensărilor

efectuate de Comisia Europeană, precum și pentru tratamentul dobânzii acumulate în conturile bancare ale Fondului Național în cadrul programelor ISPA, aprobate prin Ordinul ministrului finanțelor publice nr. 296/2007, publicat în Monitorul Oficial al

României, Partea I, nr. 199 din 22 martie 2007, se modifică după cum urmează:

**1. Punctul 2.5 se modifică și va avea următorul cuprins:**

„2.5. Fondul Național stabilește și transferă agențiilor de implementare ISPA, în baza unor solicitări exprese ale acestora, sume de la bugetul de stat din fondul de indisponibilități temporare și în următoarele situații:

a) în cazul în care cererile de fonduri/declarațiile de cheltuieli nu pot fi transmise Comisiei Europene din cauza neîndeplinirii condiționalităților prevăzute în art. 8 din memorandumul de finanțare;

b) în cazul în care cererile de fonduri pentru avans nu pot fi transmise Comisiei Europene deoarece valoarea contractelor semnate în cadrul unei măsuri nu atinge pragul de 20% din bugetul eligibil alocat respectivei măsuri;

c) în cazul în care cererile de fonduri/declarațiile de cheltuieli nu pot fi transmise Comisiei Europene deoarece au fost efectuate numai plăți parțiale ale avansului către contractori, valoarea avansului pe contracte fiind mai mare decât valoarea avansului pentru întreaga măsură.”

**2. Punctul 2.7 se abrogă.**

**Art. II.** – Autoritatea de Certificare și Plată, Oficiul de Plăți și Contractare PHARE, Direcția generală a contabilității publice și a sistemului de decontări în sectorul public și agențiile de implementare ISPA transporturi vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

**Art. III.** – Prezentul ordin va fi publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul economiei și finanțelor,  
**Varujan Vosganian**

București, 18 iulie 2007.  
Nr. 762.

MINISTERUL AGRICULTURII ȘI DEZVOLTĂRII RURALE  
Nr. 832 din 18 mai 2007

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE  
Nr. 1.215 din 6 iulie 2007

AUTORITATEA NAȚIONALĂ  
PENTRU PROTECȚIA CONSUMATORILOR  
Nr. 347 din 11 iulie 2007

AUTORITATEA NAȚIONALĂ SANITARĂ VETERINARĂ ȘI PENTRU SIGURANȚA ALIMENTELOR  
Nr. 146 din 27 iunie 2007

**ORDIN**

**privind modificarea anexei nr. 2 la Normele cu privire la natura, conținutul, fabricarea, calitatea, ambalarea, etichetarea, marcarea și păstrarea sucurilor de legume, aprobate prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor, al ministrului sănătății și familiei și al președintelui Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor nr. 359/671/137/2002**

Văzând Referatul de aprobare nr. 277.695 din 16 mai 2007 al Direcției generale implementare politici agricole, având în vedere prevederile art. 34 din Ordonanța de urgență a Guvernului nr. 97/2001 privind reglementarea producției, circulației și comercializării alimentelor, aprobată cu modificări și completări prin Legea nr. 57/2002,

în temeiul prevederilor Hotărârii Guvernului nr. 385/2007 privind organizarea și funcționarea Ministerului Agriculturii și Dezvoltării RURALE, ale Hotărârii Guvernului nr. 862/2006 privind organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății Publice, cu modificările ulterioare, ale Hotărârii Guvernului nr. 755/2003 privind organizarea și funcționarea Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor, cu modificările și completările ulterioare, și ale Hotărârii Guvernului nr. 130/2006 privind organizarea și funcționarea Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor și a unităților din subordinea acesteia, cu modificările și completările ulterioare,

**ministrul agriculturii și dezvoltării rurale, ministrul sănătății publice, președintele Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor și președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor** emit următorul ordin:

**Art. I.** — Anexa nr. 2 „Caracteristicile fizico-chimice ale sucurilor de legume” la Normele cu privire la natura, conținutul, fabricarea, calitatea, ambalarea, etichetarea, marcarea și păstrarea sucurilor de legume, aprobate prin Ordinul ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor, al ministrului sănătății și familiei și al președintelui Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor nr. 359/671/137/2002, publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 1 din 6 ianuarie 2003, cu modificările și completările ulterioare, se completează după cum urmează:

„Caracteristici	Condiții de admisibilitate	Metoda de analiză
Substanță uscată solubilă (exclusiv adaosul de sare și zahăr), % grade refractometrice, la 20°C min.		5956/71
— pentru suc de tomate, % minim”	5,0	

**Art. II.** — Prezentul ordin se publică în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul agriculturii și dezvoltării rurale,  
**Decebal Traian Remeș**

Ministrul sănătății publice,  
**Gheorghe Eugen Nicolăescu**

Președintele Autorității Naționale pentru  
Protecția Consumatorilor,  
**Dan Vlaicu**

p. Președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor,  
**Csutak-Nagy Laszlo**

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII PUBLICE

**ORDIN****privind stabilirea cuantumului sumei de participare la concursul organizat pentru ocuparea postului de manager general, persoană fizică, din serviciile de ambulanță județene și al municipiului București**

În conformitate cu prevederile Ordinului ministrului sănătății publice nr. 937/2007 privind aprobarea Normelor de organizare și desfășurare a concursului pentru ocuparea postului de manager general, persoană fizică, din serviciile de ambulanță județene și al municipiului București,

în temeiul dispozițiilor Hotărârii Guvernului nr. 862/2006 privind organizarea și funcționarea Ministerului Sănătății Publice, cu modificările și completările ulterioare,

având în vedere Referatul de aprobare al Direcției generale organizare, resurse umane, dezvoltare profesională și salarizare nr. E.N. 7.470/2007,

**ministrul sănătății publice** emite prezentul ordin.

Art. 1. — (1) Cuantumul sumei de participare la concursul organizat pentru ocuparea postului de manager general, persoană fizică, din serviciile de ambulanță județene și al municipiului București se stabilește la valoarea de 800 lei/participant.

(2) Candidații depun suma prevăzută la alin. (1) în contul Centrului Național de Perfecționare în Domeniul Sanitar București, cod fiscal (CUI) 16142125, str. Bodești nr. 1, sectorul 2, cod poștal 022434, cont nr. RO72TREZ7025025XXX000266 deschis la Trezoreria Sectorului 2, cod cont 5025.

Art. 2. — Sumele încasate de Centrul Național de Perfecționare în Domeniul Sanitar București se vor utiliza pentru acoperirea cheltuielilor de organizare și desfășurare a concursului de ocupare a funcției de manager general din serviciile de ambulanță județene și al municipiului București, în condițiile legii.

Art. 3. — Direcția generală organizare, resurse umane, dezvoltare profesională și salarizare și Centrul Național de Perfecționare în Domeniul Sanitar București vor duce la îndeplinire prevederile prezentului ordin.

Art. 4. — Prezentul ordin se va publica în Monitorul Oficial al României, Partea I.

Ministrul sănătății publice,  
**Gheorghe Eugen Nicolăescu**

București, 13 iulie 2007.

Nr. 1.252.

---

**EDITOR: PARLAMENTUL ROMÂNIEI — CAMERA DEPUTAȚILOR**

---



„Monitorul Oficial” R.A., Str. Parcului nr. 65, sectorul 1, București; C.I.F. RO427282,  
IBAN: RO55RNCB0082006711100001 Banca Comercială Română — S.A. — Sucursala „Unirea” București  
și IBAN: RO12TREZ7005069XXX000531 Direcția de Trezorerie și Contabilitate Publică a Municipiului București  
(alocat numai persoanelor juridice bugetare)

Tel. 318.51.29/150, fax 318.51.15, e-mail: marketing@ramo.ro, internet: www.monitoruloficial.ro  
Adresa pentru publicitate: Centrul pentru vânzări și relații cu publicul, București, șos. Panduri nr. 1,  
bloc P33, parter, sectorul 5, tel. 411.58.33 și 410.47.30, fax 410.77.36 și 410.47.23

Tiparul: „Monitorul Oficial” R.A.

