

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2006/63/EF

af 14. juli 2006

om ændring af bilag II-VII til Rådets direktiv 98/57/EF om bekæmpelse af *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 98/57/EF af 20. juli 1998 om bekæmpelse af *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* ⁽¹⁾, særlig artikel 11, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) En af de vigtigste skadegørere for kartofler og tomater er *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, som er det patogen, der forårsager kartoffelbrunbakteriose og bakterievissnesyge hos kartofler og tomater (i det følgende benævnt »skadegøreren«).
- (2) Skadegøreren forekommer fortsat i visse dele af Fællesskabet.
- (3) Ved direktiv 98/57/EF er der fastsat detaljerede foranstaltninger, der skal træffes i medlemsstaterne over for skadegøreren med henblik på at lokalisere denne og bestemme dens udbredelse, forhindre dens forekomst og spredning og, hvis den konstateres, forhindre dens spredning og bekæmpe den med henblik på at udrydde den.
- (4) Siden da er vores viden om skadegøreren biologisk samt om procedurer til påvisning og identifikation heraf blevet betydeligt større; endvidere viser praktiske erfaringer fra bekæmpelsen af skadegøreren, at der er behov for at revidere en række tekniske bestemmelser vedrørende bekæmpelsesforanstaltningerne.
- (5) På grundlag af denne udvikling er det nødvendigt at revidere og opdatere foranstaltningerne i visse af bilagene til direktiv 98/57/EF.
- (6) Med hensyn til procedurerne til påvisning og identifikation medtages fluorescerende *in situ*-hybridisering (FISH), som er en ny påvisningsmetode. Forbedringer af teknikken polymerase-kædereaktion (PCR) samt af en række

tekniske elementer i den eksisterende procedure til påvisning og identifikation samt metoder til påvisning og identifikation af skadegøreren i andre værtsplanter end kartofler og i vand og jord er ligeledes indarbejdet.

- (7) Med hensyn til de tekniske elementer i bekæmpelsesforanstaltningerne indføres der forbedrede bestemmelser om metoden til opbevaring af analyserede prøver for at sikre, at skadegøreren kan tilbagespores, om de elementer, der er nødvendige for at bestemme omfanget af den sandsynlige kontaminering, om indholdet af meddelelsen om bekræftet forekomst af skadegøreren og det pågældende kontaminerede område samt om foranstaltninger, der skal gennemføres på produktionssteder, der er erklæret kontamineret, og i de afgrænsede zoner. Der er desuden indarbejdet visse bestemmelser for tomater for i højere grad at tage hensyn til denne plantes betydning som vært for skadegøreren.
- (8) Foranstaltningerne i dette direktiv er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Planter sundhed —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Bilag II-VII til direktiv 98/57/EF erstattes af teksten i bilaget til nærværende direktiv.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne vedtager og offentliggør senest den 31. marts 2007 de love og administrative bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. De sender straks Kommissionen disse bestemmelser med en sammenligningstabel, som viser sammenhængen mellem de pågældende bestemmelser og dette direktiv.

De anvender disse bestemmelser fra den 1. april 2007.

Bestemmelserne skal ved vedtagelsen indeholde en henvisning til dette direktiv eller skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for henvisningen fastsættes af medlemsstaterne.

⁽¹⁾ EFT L 235 af 21.8.1998, s. 1.

2. Medlemsstaterne tilsender straks Kommissionen de vigtigste nationale bestemmelser, som de udsteder på det område, der er omfattet af dette direktiv.

Artikel 3

Dette direktiv træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Artikel 4

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 14. juli 2006.

På Kommissionens vegne
Markos KYPRIANOU
Medlem af Kommissionen

BILAG

»BILAG II

**PROTOKOL TIL DIAGNOSTICERING, PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF RALSTONIA SOLANACEARUM
(SMITH) YABUUCHI ET AL.**

OMRÅDE

Denne protokol beskriver de forskellige procedurer, der indgår i:

- i) diagnosticering af brunbakteriose i kartoffelknolde og af bakterievisnesyge hos kartoffel- og tomatplanter samt visse andre værtsplanter
- ii) påvisning af *Ralstonia solanacearum* i prøver af kartoffelknolde og -planter, tomatplanter og andre værtsplanter samt vand og jord
- iii) identifikation af *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

INDHOLD

	Side
Generelle principper	40
AFSNIT I: Anvendelse af protokollen	40
1. Protokol til påvisning og diagnosticering af brunbakteriose og bakterievisnesyge (<i>R. solanacearum</i>) i kartoffelknolde og -planter, tomatplanter eller andre værtsplanter med symptomer på brunbakteriose eller bakterievisnesyge	40
2. Protokol til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i prøver af symptomfrie kartoffelknolde	43
3. Protokol til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i prøver af symptomfrie kartoffel- eller tomatplanter eller andre værtsplanter	46
AFSNIT II: Detaljerede metoder til påvisning af <i>R. solanacearum</i> i kartoffelknolde og -planter, tomatplanter eller andre værtsplanter med symptomer på brunbakteriose eller bakterievisnesyge	48
1. Symptomer	48
2. Hurtigscreeningstest	48
3. Isolering	49
4. Test til identifikation af <i>R. solanacearum</i>	49
AFSNIT III: 1. Detaljerede metoder til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i prøver af symptomfrie kartoffelknolde	49
1.1. Forberedelse af prøver	49
1.2. Analyse	51
2. Detaljerede metoder til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i prøver af symptomfrie kartoffel- eller tomatplanter eller andre planter	51
2.1. Forberedelse af prøver	51
2.2. Analyse	52
AFSNIT IV: 1. Protokol til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i vand	53
2. Metoder til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i vand	55
2.1. Forberedelse af prøver	55
2.2. Analyse	55
AFSNIT V: 1. Protokol til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i jord	56
2. Metoder til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i> i jord	58
2.1. Forberedelse af prøver	58
2.2. Analyse	58

	Side
AFSNIT VI: Optimerede protokoller til påvisning og identifikation af <i>R. solanacearum</i>	58
A. Diagnostiserings- og påvisningstest	58
1. Karstrømningstest	58
2. Påvisning af poly- β -hydroxybutyratkorn	58
3. Serologiske agglutinationstest	59
4. Selektiv isolering	60
4.1. Dyrkning på selektivt medie	60
4.2. Berigelsesprocedure	60
5. Immunofluorescens-test (IF-test)	61
6. Polymerase-kædereaktion (PCR-test)	64
6.1. Dna-oprensningmetoder	65
a) Metode efter Pastrik (2000)	65
b) Andre metoder	65
6.2. PCR	66
6.3. Analyse af PCR-produktet	66
7. Fluorescerende in situ-hybridisering (FISH-test)	67
8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-test)	69
a) Indirekte ELISA	69
b) DASi (Double-Antibody Sandwich Indirect) ELISA	70
9. Biotest	71
B. Identifikationstest	72
1. Biokemiske undersøgelser og enzymundersøgelser	72
2. IF-test	72
3. ELISA-test	73
4. PCR-test	73
5. FISH-test	73
6. Fedtsyreprofilering (FAP)	73
7. Metoder til bestemmelse af stammer	73
7.1. Biovarbestemmelse	73
7.2. »Fingeraftryk« af genomet	74
7.3. PCR-metoder	74
C. Konfirmativ test	74
Tillæg 1 Laboratorier, der har deltaget i optimering og validering af protokoller	76
Tillæg 2 Medier til isolering og dyrkning af <i>R. solanacearum</i>	77
Tillæg 3 A. Standardiseret kontrolmateriale, som fås i handelen	79
B. Forberedelse af kontroller	80
Tillæg 4 Buffere til testprocedurer	82
Tillæg 5 Bestemmelse af cellekoncentration i IF- og FISH-testene	85
Tillæg 6 Validerede PCR-protokoller og -reagenser	86
Tillæg 7 Validerede reagenser til FISH-test	91
Tillæg 8 Dyrkning af tomat- og ægplanter	93
Litteraturhenvisninger	94

GENERELLE PRINCIPPER

I tillæggene findes optimerede protokoller for de forskellige metoder, validerede reagenser og nærmere oplysninger om forberedelse af prøve- og kontrolmateriale. I tillæg 1 findes en liste over de laboratorier, der har deltaget i optimering og validering af protokoller.

Eftersom protokollerne omfatter påvisning af en skadegører, der er omfattet af reglerne om karantæne, og indebærer anvendelse af levedygtige kulturer af *R. solanacearum* som kontrolmateriale, er det nødvendigt at gennemføre procedurene under karantæne på passende betingelser med hensigtsmæssige faciliteter til bortskaffelse af affald og i henhold til betingelserne i relevante tilladelser, der er udstedt af de officielle plantekarantænemyndigheder.

Testparametrene skal sikre konsekvent og reproducerbar påvisning af mængden af *R. solanacearum* på de tærskelværdier, der er fastsat for de valgte metoder.

Det er af afgørende betydning, at positive kontroller forberedes præcist.

Test i henhold til de fastsatte tærskelværdier forudsætter endvidere, at udstyr er korrekt indstillet, vedligeholdt og kalibreret, at reagenser håndteres og opbevares omhyggeligt, og at alle foranstaltninger træffes for at undgå, at prøver kontamineres hinanden, f.eks. ved at positive kontroller holdes adskilt fra forberedte prøver. Der skal anvendes kvalitetskontrolstandarder for at undgå administrative eller andre fejl, navnlig med hensyn til mærkning og dokumentation.

Formodet forekomst, jf. artikel 4, stk. 2, i direktiv 98/57/EF, forudsætter et positivt resultat ved diagnose- eller screeningtest af en prøve som nærmere angivet i flowdiagrammer. Hvis en første screeningtest (IF-test, PCR/FISH eller selektiv isolering) giver et positivt resultat, skal der gennemføres endnu en screeningtest baseret på et andet biologisk princip.

Hvis den første screeningtest er positiv, er der mistanke om kontaminering med *R. solanacearum*, og der skal gennemføres endnu en screeningtest. Hvis den anden screeningtest er positiv, er mistanken bekræftet (formodet forekomst), og testen i henhold til protokollen skal fortsættes. Hvis den anden screeningtest er negativ, anses prøven for ikke at være kontamineret med *R. solanacearum*.

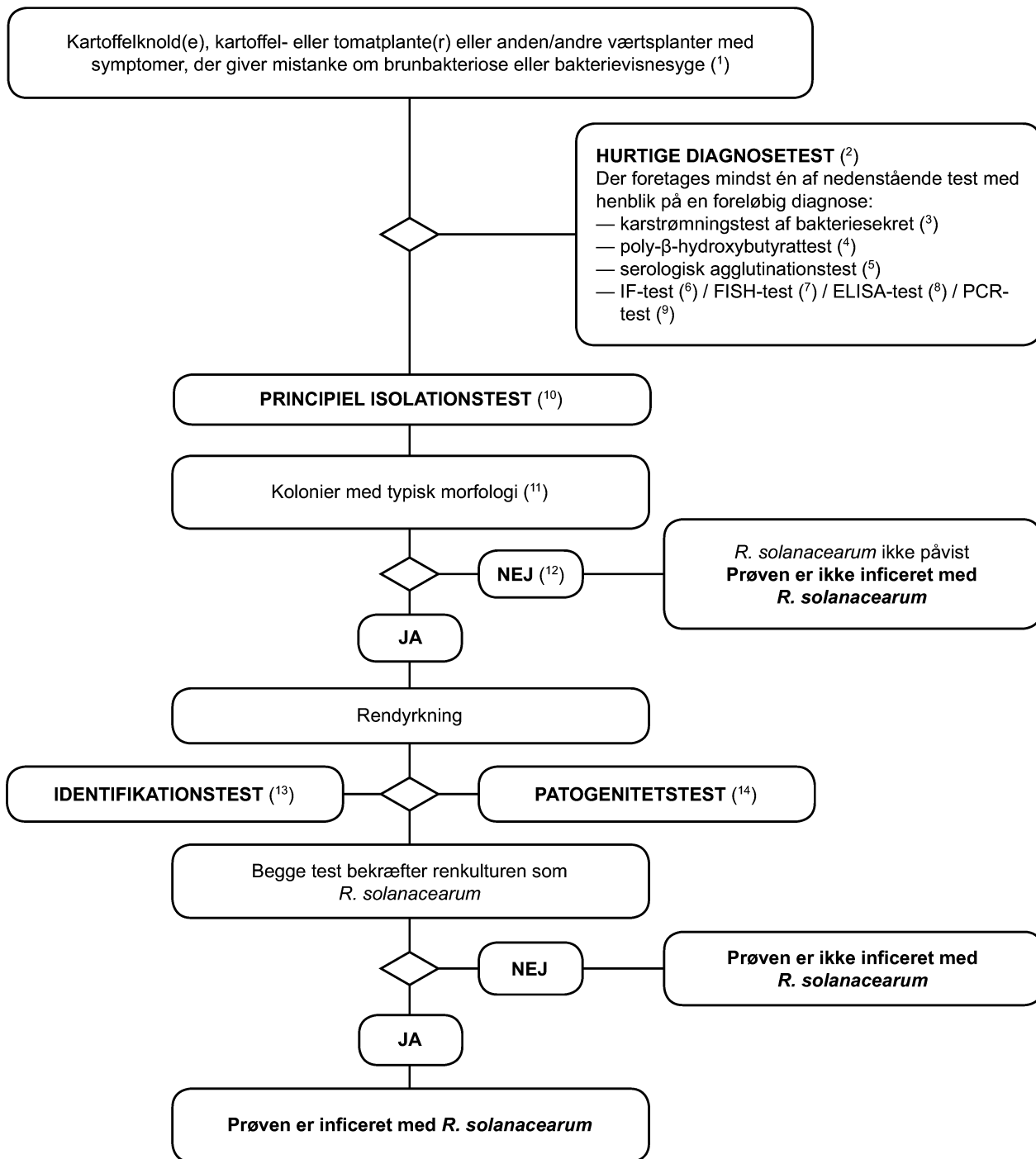
Bekræftet forekomst, jf. artikel 5, stk. 1, i direktiv 98/57/EF, forudsætter isolering og identifikation af en renkultur af *R. solanacearum* med bekræftelse af patogenitet.

AFSNIT I

ANVENDELSE AF PROTOKOLLEN

1. Protokol til påvisning og diagnosticering af brunbakteriose og bakterievisnesyge (*Ralstonia solanacearum*) i kartoffelknolde og -planter, tomatplanter eller andre værtsplanter med symptomer på brunbakteriose eller bakterievisnesyge

Testproceduren er beregnet til kartoffelknolde og -planter med symptomer, der er typiske for eller giver mistanke om brunbakteriose eller bakterievisnesyge. Den omfatter en hurtigscreeningstest, isolering af patogenet fra inficeret karvæv på et (selektivt) medie og i tilfælde af positivt resultat identifikation af kulturen som *Ralstonia solanacearum*.



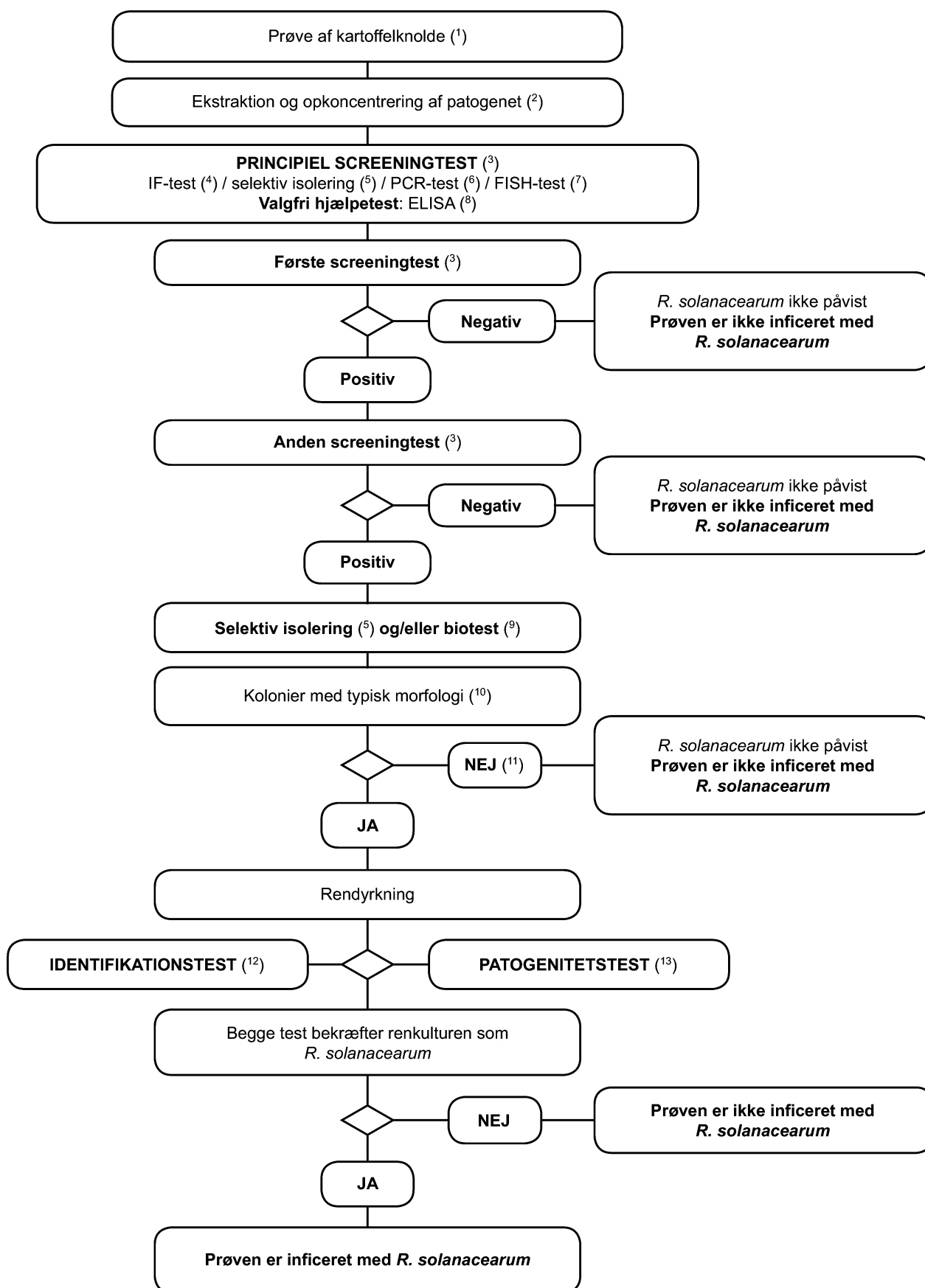
- (¹) Symptomerne er beskrevet i afsnit II, punkt 1.
- (²) Hurtige diagnostest letter en foreløbig diagnose, men er ikke af afgørende betydning. Et negativt resultat er ikke altid en garanti for, at patogenet ikke er til stede.
- (³) Karstrømningstest for bakteriesekret fra karvæv fra stængler er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 1.
- (⁴) Test for poly- β -hydroxybutyratkorn i bakterieceller er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 2.
- (⁵) Serologiske agglutinationstest af bakteriesekret eller ekstrakter fra væv, der udviser symptomer, er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 3.
- (⁶) IF-test af bakteriesekret opslæmmet i vand eller væv, der udviser symptomer, er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 5.
- (⁷) FISH-test af bakteriesekret opslæmmet i vand eller væv, der udviser symptomer, er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 7.
- (⁸) ELISA-test af bakteriesekret opslæmmet i vand eller væv, der udviser symptomer, er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 8.
- (⁹) PCR-test af bakteriesekret opslæmmet i vand eller væv, der udviser symptomer, er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 6.
- (¹⁰) Det er normalt ligetil at isolere patogenet fra plantemateriale, der udviser symptomer, ved pladespredning af forskellige fortyndinger (afsnit II, punkt 3).
- (¹¹) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit II, punkt 3, litra d).
- (¹²) Dyrkningen kan slå fejl på fremskredne infektionsstadier som følge af konkurrence fra eller stærkt øget vækst blandt blødrådsakterier. Hvis sygdomssymptomerne er typiske, men isolationstesten negativ, skal isoleringen gentages, helst ved dyrkning på et selektivt medie.
- (¹³) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum*-isolater opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit VI, del B. Bestemmelse af underart er ikke et krav, men anbefales i hvert nyt tilfælde.
- (¹⁴) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit VI, del C.

2. **Protokol til påvisning og identifikation af *Ralstonia solanacearum* i prøver af symptomfrie kartoffelknolde**

Princip

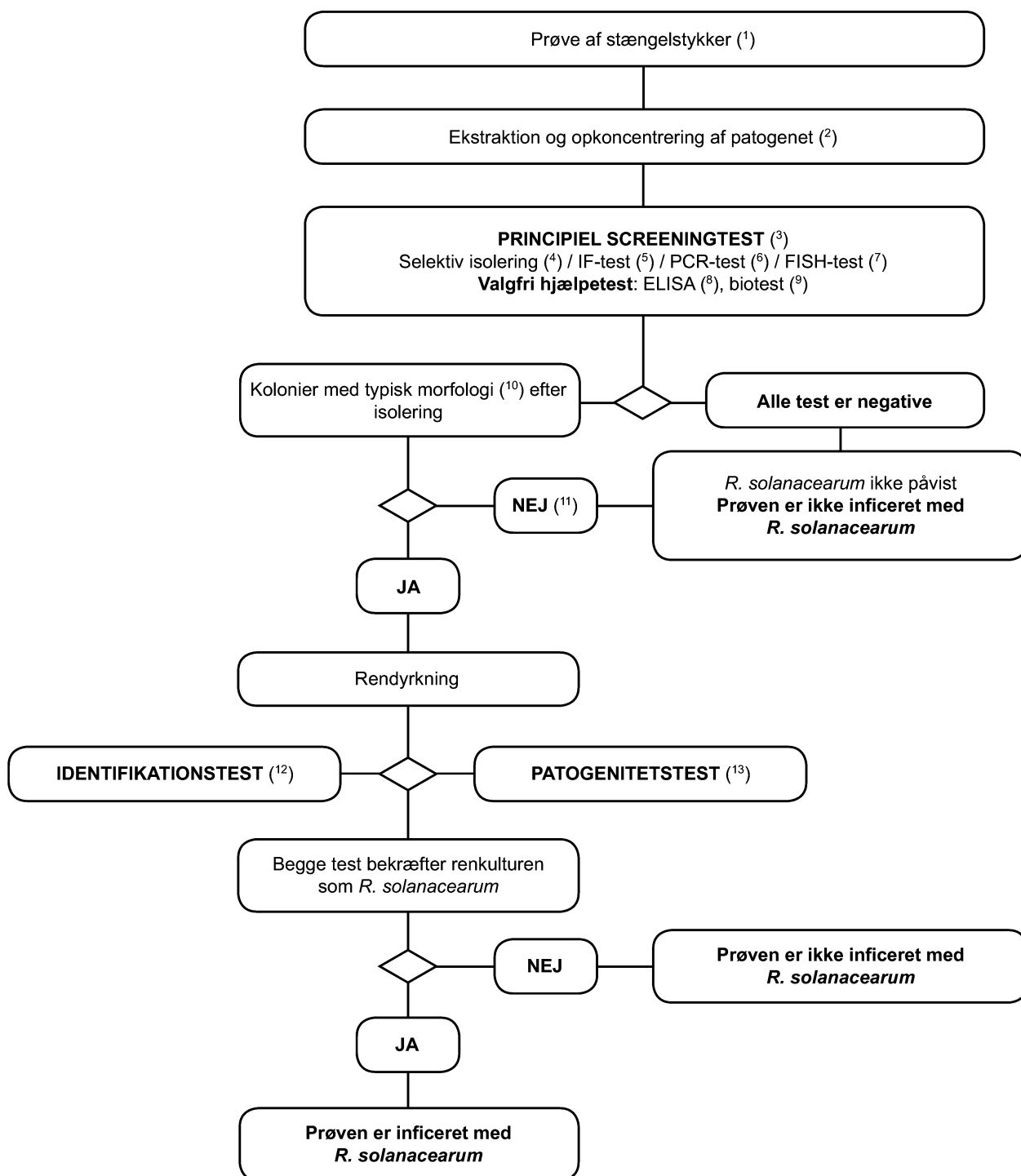
Testproceduren er beregnet til påvisning af latente infektioner i kartoffelknolde. Et positivt resultat fra mindst to screeningtest ⁽³⁾ baseret på forskellige biologiske principper skal suppleres med isolering af patogenet med efterfølgende bekræftelse af en renkultur som *R. solanacearum*, hvis der er tale om isolering af typiske kolonier. Et positivt resultat fra kun én af screeningtestene er ikke tilstrækkeligt til, at prøven kan anses for at være under mistanke.

Screeningtest og isolationstest skal muliggøre påvisning af 10^3 - 10^4 celler/ml resuspenderet pellet, der er medtaget som positive kontroller i hver testserie.



- (¹) Standardprøvestørrelse er 200 knolde; dog kan proceduren også anvendes med mindre prøver, hvis der ikke er 200 knolde til rådighed.
- (²) Metoder til patogenekstraktion og -opkoncentrering er beskrevet i afsnit III, punkt 1.1.
- (³) Hvis mindst to test baseret på forskellige biologiske principper er positive, skal der foretages isolering og bekræftelse. Der udføres mindst én screeningtest. Hvis denne test er negativ, anses prøven for at være negativ. Hvis testen er positiv, gennemføres der endnu en screeningtest, eller flere, baseret på forskellige biologiske principper for at verificere det første positive resultat. Hvis den anden eller de øvrige test er negative, anses prøven for negativ. Det er ikke nødvendigt med yderligere test.
- (⁴) IF-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 5.
- (⁵) Den selektive isolationstest er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.
- (⁶) PCR-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 6.
- (⁷) FISH-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 7.
- (⁸) ELISA-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 8.
- (⁹) Biotesten er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 9.
- (¹⁰) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit II, punkt 3, litra d).
- (¹¹) Dyrkning eller biotest kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsbakterier. Hvis screeningtest giver utvetydige positive resultater, men isolationstestene er negative, gentages isolationstestene fra samme pellet eller ved at tage ekstra karvæv nær navleenden fra overskårne knolde fra samme prøve, og om nødvendigt testes supplerende prøver.
- (¹²) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum*-isolater opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit VI, del B.
- (¹³) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit VI, del C.

3. Protokol til påvisning og identifikation af *Ralstonia solanacearum* i prøver af symptomfrie kartoffel- eller tomatplanter eller andre værtsplanter



- (¹) Anbefalede prøvestørrelser er angivet i afsnit III, punkt 2.1.
- (²) Metoder til patogenekstraktion og -opkoncentrering er beskrevet i afsnit III, punkt 2.1.
- (³) Hvis mindst to test baseret på forskellige biologiske principper er positive, skal der foretages isolering og bekræftelse. Der udføres mindst én screeningtest. Hvis denne test er negativ, anses prøven for at være negativ. Hvis testen er positiv, gennemføres der endnu en screeningtest, eller flere, baseret på forskellige biologiske principper for at verificere det første positive resultat. Hvis den anden eller de øvrige test er negative, anses prøven for negativ. Det er ikke nødvendigt med yderligere test.
- (⁴) Den selektive isolationstest er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.
- (⁵) IF-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 5.
- (⁶) PCR-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 6.
- (⁷) FISH-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 7.
- (⁸) ELISA-testen er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 8.
- (⁹) Biotesten er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 9.
- (¹⁰) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit II, punkt 3, litra d).
- (¹¹) Dyrkning eller biotest kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsakterier. Hvis screeningtest giver positive resultater, men isolationstestene er negative, gentages isolationstestene.
- (¹²) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum* opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit VI, del B.
- (¹³) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit VI, del C.

AFSNIT II

DETALJEREDE METODER TIL PÅVISNING AF RALSTONIA SOLANACEARUM I KARTOFFELKNOLDE OG -PLANTER, TOMATPLANTER ELLER ANDRE VÆRTSPLANTER MED SYMPTOMER PÅ BRUNBAKTERIOSE ELLER BAKTERIEVISNESYGE

1. **Symptomer** (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

- 1.1. Symptomer hos kartofler

Kartoffelplanten. De tidlige infektionssymptomer i marken er, når bladene visner i plantens top ved høje temperaturer om dagen for derefter at komme sig om natten. I de tidlige visningsstadier forbliver bladene grønne, men senere indtræder gulnen og brun nekrose. Epinasti forekommer også. Visnen af enkelte skud eller hele planter bliver hurtigt irreversibel og medfører, at planten falder sammen og dør. Ledningsvævet i stængler fra visne planter, der er skåret tværs over, er normalt brunt, og et mælkeagtigt bakteriesekret siver ud fra sårfladen eller kan trykkes ud, ved at man klemmer stænglen. Hvis en overskåret stængel anbringes vertikalt i vand, vil slimtråde strømme fra ledningsvævet.

Kartoffelknolden. Kartoffelknolde skal enten skæres tværs over nær ved navleenden (stolon) eller på langs over navleenden. Det tidlige infektionsstadium genkendes ved en glasagtig, gullig til lysebrun misfarvning af karringen, hvorfra der spontant kommer et blegt bakteriesekret efter et par minutter. Senere bliver misfarvningen af ledningsvævet mere tydeligt brun, og vævsdøden kan brede sig til parenkymvævet. På mere fremskredne stadier bryder infektionen ud fra navleenden og øjnene, hvorfra bakterieslim kan sive ud og få jordpartikler til at hænge ved. Der kan fremkomme rødbrune, let indsunkne læsioner på huden som følge af sammenfald af karvæv inden i knolden. I fremskredne stadier af sygdommen er sekundær udvikling af svampe- og bakteriefremkaldt forrådnelse et almindeligt fænomen.

- 1.2. Symptomer hos tomater

Tomatplanten. Det første synlige symptom er de yngste blades slatne udseende. Under gunstige forhold for patogenet (jordtemperaturer på ca. 25 °C; mættet fugtighed) følger epinasti og visnen af den ene side eller af hele planten inden for nogle få dage, hvorefter hele planten falder sammen. Under mindre gunstige forhold (jordtemperatur på under 21 °C) er visnen mindre udtalt, men der kan udvikle sig talrige birødder på stænglen. Der kan ses våde streger, der starter nederst på stænglen, hvilket er tegn på ledningsvævs død. Når stænglen skæres over på tværs, siver der hvidt eller gulligt bakteriesekret ud fra misfarvede brune ledningsvæv.

- 1.3. Symptomer hos andre værtsplanter

Planter af Solanum dulcamara og S. nigrum. Under naturlige betingelser udviser disse ukrudtsværtsplanter sjældent visnesymptomer, undtagen ved jordtemperaturer på over 25 °C eller ekstremt høje inokulumniveauer (som f.eks. for *S. nigrum*, der vokser op ad sygdomsramte kartoffel- eller tomatplanter). I de tilfælde, hvor visnen forekommer, er symptomerne som de for tomater beskrevne. Hos ikke-visnende planter af *S. dulcamara*, som vokser med stængel og rødder i vand, vil der i nogle tilfælde ved tværsnit kunne observeres lysebrun misfarvning af ledningsvæv i stænglens fod eller de dele af stænglen, som er under vand. Bakterier kan sive fra overskåret ledningsvæv eller danne slimtråde, hvis den overskårne stængel anbringes vertikalt i vand, selv når der ikke er visnesymptomer.

2. **Hurtigscreeningstest**

Hurtigscreeningstest kan lette en foreløbig diagnose, men er ikke af afgørende betydning. Brug en eller flere af følgende validerede test:

- 2.1. Karstrømningstest

(Jf. afsnit VI, del A, punkt 1)

- 2.2. Påvisning af poly- β -hydroxybutyrat (PHB)

Karakteristiske PHB-korn i *R. solanacearum*-cellerne gøres synlige ved at farve varmfikserede udstrykningspræparater af bakteriesekret fra inficeret væv på et objektglas med Nile Blue A eller Sudan Black (jf. afsnit VI, del A, punkt 2).

2.3. Serologiske agglutinationstest

(Jf. afsnit VI, del A, punkt 3)

2.4. Andre test

Andre anbefalelsesværdige hurtigscreeningstest er IF-testen (jf. afsnit VI, del A, punkt 5), FISH-testen (jf. afsnit VI, del A, punkt 7), ELISA-testen (jf. afsnit VI, del A, punkt 8) og PCR-testen (jf. afsnit VI, del A, punkt 6).

3. Isolering

- a) Bakteriesekret eller partier af misfarvet væv fra karringen i kartoffelknolden eller fra karstrengene i stænglen fra kartoffel- eller tomatplanter eller andre visnende værtsplanter opslæmmes i en lille mængde sterilt, destilleret vand eller 50 mM fosfatbuffer (tillæg 4), og prøven henstår i 5-10 minutter.
- b) Der laves en række tifoldsfortyndinger af suspensionen.
- c) 50-100 µl af suspensionen overføres til et standardnæringsmedie (NA, YPGA eller SPA; jf. tillæg 2) og/eller til Kelmans selektive tetrazolium-medie (tillæg 2) og/eller et valideret selektivt medie (f.eks. SMSA; jf. tillæg 2). Spred eller udstryg med en formålstjenlig fortyndingsteknik. Hvis der er behov for det, tilberedes et sæt særskilte plader med en fortyndet cellesuspension af *R. solanacearum*, biovar 2, som positiv kontrol.
- d) Pladerne inkuberes i 2-6 dage ved 28 °C.
 - På standardnæringsmediet udvikler virulente isolater af *R. solanacearum* perlemorsagtige, flødefarvede, flade, uregelmæssige og udflydende kolonier, der ofte har karakteristiske hvirvler i centrum. Avirulente former af *R. solanacearum* udvikler små, runde, udflydende og smørlignende kolonier, som er fuldstændig flødefarvede.
 - På Kelmans tetrazolium-medie og på SMSA-medier er hvirvlerne blodrøde. Avirulente former af *Ralstonia solanacearum* udvikler små, runde, udflydende og smørlignende kolonier, som er fuldstændig dybrøde.

4. Test til identifikation af *R. solanacearum*

Test til bekræftelse af identiteten af formodede isolater af *R. solanacearum* er vist i afsnit VI, del B.

AFSNIT III

1. Detaljerede metoder til påvisning og identifikation af *Ralstonia solanacearum* i prøver af symptomfrie kartoffelknolde

1.1. Forberedelse af prøver

NB:

- Standardprøvestørrelsen er 200 knolde pr. test. Mere intensiv prøveudtagning kræver flere test af prøver på denne størrelse. Et større antal knolde i prøven vil medføre, at resultater ikke eller kun vanskeligt kan fortolkes. Proceduren kan dog også anvendes med prøver på under 200 knolde, hvis der kun er færre knolde til rådighed.
- Validering af alle nedenfor beskrevne metoder er baseret på test af prøver bestående af 200 knolde.
- Det nedenfor beskrevne kartoffelekstrakt kan desuden anvendes til påvisning af *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, der forårsager kartoffelringbakteriose.

Valgfri forbehandling forud for prøveforberedelse:

- a) Prøverne inkuberes ved 25-30 °C i op til to uger før testen for at fremme formeringen af eventuelle populationer af *R. solanacearum*.
- b) Knoldene vaskes. Der anvendes passende desinfektionsmidler (chlorforbindelser, når der skal udføres PCR-test, for at fjerne dna fra patogenet) og rengøringsmidler mellem hver prøve. Knoldene lufttørres. Denne vaskning er især nyttig (men ikke obligatorisk) for prøver med for meget jord, og hvis der skal gennemføres en PCR-test eller direkte isolering.

- 1.1.1. Med en ren, desinficeret skalpel eller grøntsagskniv fjernes huden fra de enkelte knoldes navleende (stolon), således at ledningsvævet bliver synligt. Et lille stykke ledningsvæv (kartoffelprop) fra navleenden udskæres omhyggeligt, idet mængden af andet plantevæv begrænses til et minimum (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NB: Eventuelle knolde (med råd) med mistænkelige symptomer på brunbakteriose anbringes og undersøges for sig.

Hvis der under fjernelsen af kartoffelproppen observeres mistænkelige symptomer på brunbakteriose, undersøges knolden visuelt, og den overskæres tæt ved navleenden. Overskårne knolde med mistænkelige symptomer bør opbevares i mindst 2 dage ved stuetemperatur, så der kan ske en forkorkning, og opbevares på køl (ved 4-10 °C) under korrekte karantænebetingelser. Alle knolde, herunder knolde med mistænkelige symptomer, bør opbevares i overensstemmelse med bilag III.

- 1.1.2. Navleenderne samles i ubrugte engangsbeholdere, som kan lukkes og/eller forsegles (hvis beholderne genbruges, bør de rengøres og desinficeres grundigt ved hjælp af chlorforbindelser). Kernerne fra navleenderne skal helst tages i arbejde med det samme. Hvis dette ikke er muligt, opbevares de i beholderen uden tilsætning af buffer i højst 72 timer på køl eller højst 24 timer ved stuetemperatur.

Navleenderne behandles på en af nedenstående måder:

- a) Navleenderne dækkes med en tilstrækkelig mængde (ca. 40 ml) ekstraktionsbuffer (tillæg 4) og rystes horisontalt (50-100 rpm) i 4 timer ved under 24 °C eller 16-24 timer nedkølet.
- b) Navleenderne homogeniseres med en tilstrækkelig mængde (ca. 40 ml) ekstraktionsbuffer (tillæg 4) enten i en blender (f.eks. Waring eller Ultra Thurax) eller ved knusning i en forseglede engangspose til udblødning (f.eks. Stomacher- eller Bioreba-pose af polyethylen med stor trækstyrke, 150 mm × 250 mm; steriliseret ved bestråling) ved hjælp af en gummihammer eller egnet formalingsudstyr (f.eks. Homex).

NB: Der er stor risiko for krydskontaminering af prøver, når prøverne homogeniseres ved hjælp af en blender. Der skal tages forholdsregler for at undgå aerosoldannelse eller udflydning under ekstraktionsprocessen. Det skal sikres, at der for hver enkelt prøve anvendes nystiliserede blenderknive og -glas. Hvis PCR-testen skal anvendes, skal man undgå dna-rester på beholdere og formalingsudstyr. Når der anvendes PCR, anbefales det, at knusning foregår i engangsposer, og at der anvendes engangsrør.

- 1.1.3. Supernatanten dekanteres fra. Hvis den er for uklar, klares den enten ved langsom centrifugering (højst 180 g i 10 min. ved en temperatur på 4-10 °C) eller ved vakuumfiltrering (40-100 µm), idet filteret vaskes med ekstra (ca. 10 ml) ekstraktionsbuffer.

- 1.1.4. Bakteriefractionen opkoncentreres ved centrifugering ved 7 000 g i 15 min. (eller 10 000 g i 10 min.) ved en temperatur på 4-10 °C, og supernatanten fjernes, idet det undgås at forstyrre pelleten.

- 1.1.5. Pelleten resuspenderes i 1,5 ml pelletbuffer (tillæg 4). Der anvendes 500 µl til test for *R. solanacearum*, 500 µl til *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* og 500 µl til referenceformål. Der tilsættes steril glycerol, til der opnås en slutkoncentration på 10-25 % (v/v), til 500 µl af referencedelprøven og til den resterende testdelprøve, der vortexes, og prøverne opbevares ved -16 til -24 °C (uger) eller ved -68 til -86 °C (måneder). Testdelprøverne opbevares ved 4-10 °C under testen.

Gentagen nedfrysning og optøning frarådes.

Hvis det er nødvendigt at transportere ekstraktet, skal levering foregå i en køleboks inden for 24-48 timer.

- 1.1.6. Det er nødvendigt, at alle positive *R. solanacearum*-kontroller og prøver behandles for sig for at undgå kontaminering. Dette gælder IF-glas og alle test.

1.2. Analyse

Testene og de optimerede protokoller er beskrevet og illustreret med flowdiagrammer i de relevante tillæg:

Selektiv isolering (jf. afsnit VI, del A, punkt 4)

IF-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 5)

PCR-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 6)

FISH-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 7)

ELISA-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 8)

Biotest (jf. afsnit VI, del A, punkt 9)

2. Detaljerede metoder til påvisning og identifikation af *Ralstonia solanacearum* i prøver af symptomfrie kartoffel- eller tomatplanter eller andre værtsplanter

2.1. Forberedelse af prøver

NB: Med henblik på påvisning af latente populationer af *R. solanacearum* anbefales det at teste sammensatte prøver. Proceduren kan anvendes til sammensatte prøver af op til 200 stængeldele. Undersøgelser af en given plantepopulation bør baseres på en statistisk repræsentativ prøve af plantepopulationen.

2.1.1. Stængelstykker med en længde på 1-2 cm samles i en lukket steril beholder i overensstemmelse med følgende procedurer:

Tomatstiklinger fra planteskole: Med en ren, desinficeret kniv fjernes et stykke på 1 cm fornedet på hver stængel lige over jorden.

Tomatplanter dyrket på mark eller i drivhus: Med en ren, desinficeret kniv fjernes på hver plante det nederste sideskud; dette skæres af lige over det sted, hvor skuddet er forbundet med hovedstænglen. Der fjernes et stykke på 1 cm nederst på hvert sideskud.

Andre værtsplanter: Med en ren, desinficeret kniv eller beskæresaks fjernes et stykke på 1 cm fornedet på hver stængel lige over jorden. Når der er tale om *S. dulcamara* eller andre værtsplanter, som vokser i vand, fjernes stykker på 1-2 cm fra stængler, der er under vand, eller udløbere med rødder under vandet.

Ved udtagning af prøver i et givet område anbefales det, at der testes en statistisk repræsentativ prøve på mindst 10 planter pr. prøvetagningssted af hver enkelt potentiel ukrudtsværtsplante. De mest pålidelige resultater i forbindelse med påvisning af patogener opnås i slutningen af foråret samt om sommeren og om efteråret, om end der kan påvises naturlig infektion hele året hos den flerårige *Solanum dulcamara*, som vokser i vandløb. Kendte værtsplanter er blandt andre gengroninger af kartofler, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* og andre arter af *Solanaceae*-familien. Andre værtsplanter er *Pelargonium* spp. og *Portulaca oleracea*. Europæiske ukrudtsplanter, som er potentielle værter for populationer af biovar 2/race 3-stammen af *R. solanacearum* i rødder og/eller rhizosfærer under visse miljøforhold, omfatter *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* og *Urtica dioica*.

NB: På dette stadium kan der foretages visuel undersøgelse for indre symptomer (misfarvning af væv eller bakteriesekret). Stængelstykker med symptomer anbringes for sig og underkastes særskilt test (jf. afsnit II).

2.1.2. Stængelstykkerne desinficeres kortvarigt med 70 % ethanol og tørres straks på filterpapir. Stængelstykkerne behandles derefter på en af nedenstående måder:

a) Stykkerne dækkes med en tilstrækkelig mængde (ca. 40 ml) ekstraktionsbuffer (tillæg 4) og rystes horisontalt (50-100 rpm) i 4 timer ved under 24 °C eller 16-24 timer nedkølet.

b) Stykkerne behandles straks ved knusning i en kraftig pose til macerering (f.eks. Stomacher- eller Bioreba-pose) med en passende mængde ekstraktionsbuffer (tillæg 4) ved hjælp af en gummihammer eller egnet formalingsudstyr (f.eks. Homex). Hvis dette ikke er muligt, opbevares stængelstykkerne i højst 72 timer på køl eller højst 24 timer ved stuetemperatur.

2.1.3. Supernatanten dekanteres fra, efter at prøven har fået lov at bundfælde i 15 min.

2.1.4. Yderligere klaring af ekstraktet eller opkoncentrering af bakteriefractionen er normalt ikke nødvendig, men kan foretages ved filtrering og/eller centrifugering som beskrevet i afsnit III, punkt 1.1.3-1.1.5.

2.1.5. Det rene eller koncentrerede prøveekstrakt deles i 2 lige store dele. Den ene halvdel opbevares ved 4-10 °C under testen, mens den anden halvdel opbevares i 10-25 % (v/v) steril glycerol ved – 16 til – 24 °C (uger) eller ved – 68 til – 86 °C (måneder) med henblik på et evt. behov for yderligere testning.

2.2. Analyse

Testene og de optimerede protokoller er beskrevet og illustreret med flowdiagrammer i de relevante tillæg.

Selektiv isolering (jf. afsnit VI, del A, punkt 4)

IF-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 5)

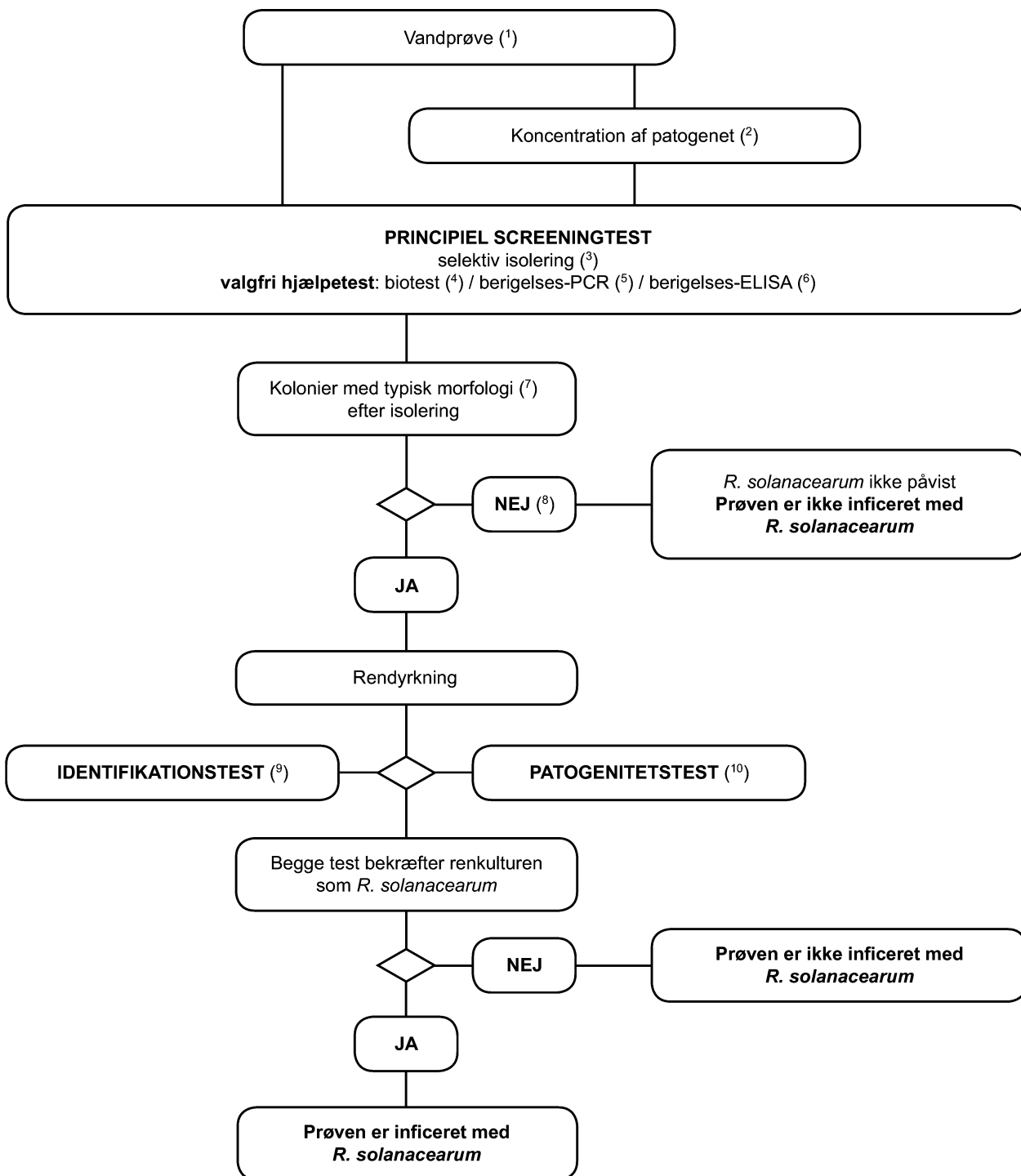
PCR-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 6)

FISH-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 7)

ELISA-test (jf. afsnit VI, del A, punkt 8)

Biotest (jf. afsnit VI, del A, punkt 9)

AFSNIT IV

1. Protokol til påvisning og identifikation af *R. solanacearum* i vand

- (¹) Anbefalede prøveudtagningsmetoder er angivet i afsnit IV, punkt 2.1.
- (²) Metoder til patogenopkoncentrering er beskrevet i afsnit IV, punkt 2.1. Ved opkoncentrering øges populationerne af såvel patogener som konkurrerende blødrådsbakterier, og metoden kan kun anbefales, hvis den ikke medfører hæmning af isolationstesten.
- (³) Den selektive isolationstest er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.
- (⁴) Biotesten er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 9.
- (⁵) PCR-berigelsesmetoder er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.2, og afsnit VI, del A, punkt 6.
- (⁶) ELISA-berigelsesmetoder er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.2, og afsnit VI, del A, punkt 8.
- (⁷) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit II, punkt 3, litra d).
- (⁸) Dyrkning kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsbakterier. Hvis store populationer af blødrådsbakterier formodes at påvirke pålideligheden af isoleringen, gentages isolationstesten efter fortynding af prøven i sterilt vand.
- (⁹) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum* opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit VI, del B.
- (¹⁰) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit VI, del C.

2. Metoder til påvisning og identifikation af *R. solanacearum* i vand

Princip

Den validerede påvisningsprotokol, som er beskrevet under dette punkt, kan anvendes til påvisning af patogener i prøver af overfladevand samt til analyse af prøver af spildevand fra kartoffelforarbejdning eller kloakker. Det er dog vigtigt at holde sig for øje, at den forventede påvisningsfølsomhed varierer, alt efter hvilket medie der anvendes. Isolationstestens følsomhed påvirkes af populationer af konkurrerende blødrådsakterier, som der normalt er langt flere af i spildevand fra kartoffelforarbejdning og kloakvand end i overfladevand. Med nedenfor beskrevne protokol skulle det være muligt at påvise helt ned til 10^3 celler pr. liter i overfladevand, mens følsomheden af påvisning i spildevand fra kartoffelforarbejdning eller kloakker kan forventes at ville være betydeligt lavere. Af samme grund anbefales det, at spildevand analyseres efter en eventuel rensningsproces (såsom bundfældning eller filtrering), der medfører en reduktion af populationerne af blødrådsakterier. Begrænsningerne for så vidt angår protokolens følsomhed bør indgå i vurderingen af, hvor pålidelige eventuelle negative resultater skal anses for at være. Denne protokol har vist sig at være et nyttigt redskab i undersøgelser for forekomst af patogenet i overfladevand, men der bør tages hensyn til protokolens begrænsninger, når det anvendes til lignende undersøgelser af spildevand fra kartoffelforarbejdning eller kloakker.

2.1. Forberedelse af prøver

NB:

- De mest pålidelige resultater i forbindelse med påvisning af *R. solanacearum* i overfladevand opnås i slutningen af foråret samt om sommeren og om efteråret, når vandets temperatur kommer op på over 15 °C.
- Pålideligheden af protokollen øges med gentagne prøveudtagninger på forskellige tidspunkter i ovennævnte periode på udvalgte prøvetagningssteder, idet virkningerne af klimatiske ændringer derved begrænses.
- Der skal tages hensyn til betydningen af eventuel kraftig nedbør samt de pågældende vandløbs forløb for at undgå, at en omfattende udvandingseffekt tilslører patogenets eventuelle forekomst.
- Der udtages prøver af overfladevand nær værtsplanterne, hvor sådanne er til stede.

2.1.1. Der udtages vandprøver på udvalgte prøvetagningssteder ved at fylde sterile engangsglas eller -flasker, om muligt i en dybde af over 30 cm og højst 2 m fra bredden. Prøver af spildevand fra forarbejdning og kloakker udtages på det sted, hvor spildevandet udledes. Der anbefales en prøvestørrelse på 500 ml pr. prøvetagningssted. Foretrakkes mindre prøver, anbefales det at udtage prøver mindst tre gange pr. prøvetagningssted, idet hver prøve skal bestå af to kontraprøver på mindst 30 ml. Til intensive undersøgelser udvælges mindst 3 prøvetagningssteder for hver 3 km vandløb, idet det skal sikres, at der også udtages prøver af alle tilløb til vandløbet.

2.1.2. Prøverne transporteres køligt (4-10 °C) og mørkt og analyseres inden for 24 timer.

2.1.3. Om nødvendigt opkoncentreres bakteriefractionen ved hjælp af en af følgende metoder:

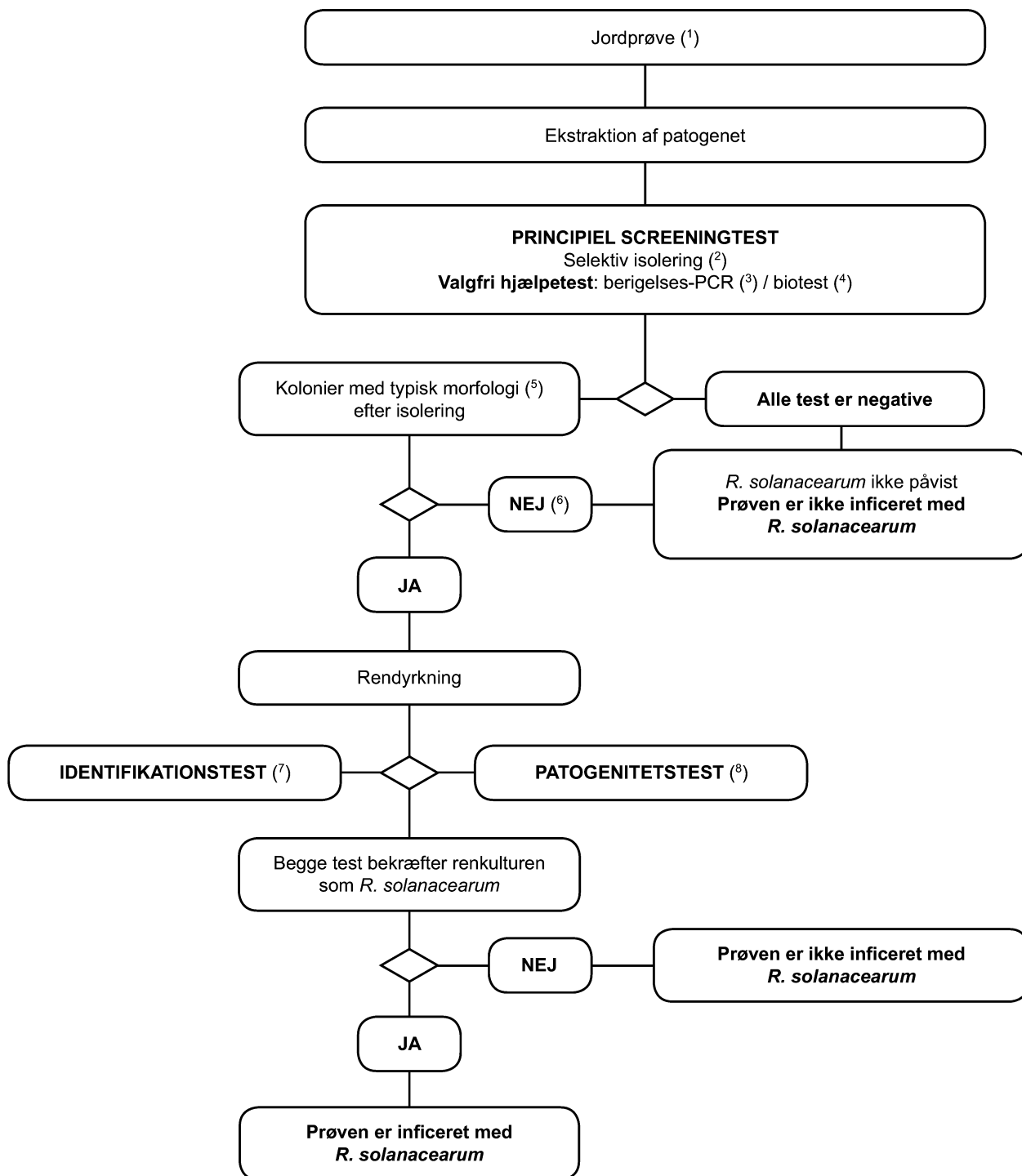
- a) Delprøver på 30-50 ml centrifugeres ved 10 000 g i 10 min. (eller 7 000 g i 15 min.), helst ved en temperatur på 4-10 °C, supernatanten fjernes, og pellet resuspenderes i 1 ml pelletbuffer (tillæg 4).
- b) Der foretages membranfiltrering (mindste porestørrelse: 0,45 µm), hvorefter filteret skylles i 5-10 ml pelletbuffer, og skyllevandet retineres. Denne metode egner sig til større mængder vand med et lavt indhold af blødrådsakterier.

Opkoncentrering kan normalt ikke anbefales til prøver af spildevand fra kartoffelforarbejdning eller kloakker, idet øgede populationer af konkurrerende blødrådsakterier vil hæmme påvisningen af *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Analyse

Testene er beskrevet og illustreret med flowdiagrammer i de relevante tillæg.

AFSNIT V

1. Protokol til påvisning og identifikation af *R. solanacearum* i jord

- (¹) Anbefalede prøveudtagningsmetoder er angivet i afsnit V, punkt 2.1.
- (²) Den selektive isolationstest er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.
- (³) PCR-berigelsesmetoder er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 4.2, og afsnit VI, del A, punkt 6.
- (⁴) Biotesten er beskrevet i afsnit VI, del A, punkt 9.
- (⁵) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit II, punkt 3, litra d).
- (⁶) Dyrkning kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsakterier. Hvis store populationer af blødrådsakterier formodes at påvirke pålideligheden af isoleringen, gentages isolationstesten efter yderligere fortynding af prøven.
- (⁷) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum* opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit VI, del B.
- (⁸) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit VI, del C.

2. Metoder til påvisning og identifikation af *R. Solanacearum* i jord

Principper

Den validerede påvisningsprotokol, som er beskrevet under dette punkt, kan anvendes til påvisning af patogener i jordprøver, men også til analyse af prøver af fast affald fra kartoffelforarbejdning eller kloakslam. Det skal dog bemærkes, at disse metoder ikke er tilstrækkeligt følsomme til at garantere påvisning af små og/eller spredte populationer af *Ralstonia solanacearum*, der kan forekomme i naturligt inficerede prøver af disse substrater.

Begrænsningerne for så vidt angår protokolens følsomhed bør indgå i vurderingen af, hvor pålidelige eventuelle negative resultater skal anses for at være, og bør ligeledes tages i betragtning, når protokollen anvendes i undersøgelser, der har til formål at påvise patogenets eventuelle forekomst i jord eller slam. Den mest pålidelige metode til undersøgelse for forekomst af patogenet i markjord er at plante en modtagelig vært og kontrollere, om denne inficeres, men selv med denne metode vil lave infektionsniveauer ikke blive opdaget.

2.1. Forberedelse af prøver

2.1.1. Prøver af markjord bør udtages efter standardprincipperne for nematodeprøveudtagning. Der indsamles 0,5-1 kg jord pr. prøve på 60 steder pr. 0,3 ha i en dybde af 10-20 cm (eller i et kvadratnet på 7 × 7 m). Hvis der er mistanke om, at patogenet er til stede, øges antallet af indsamlingssteder til 120 pr. 0,3 ha. Prøverne opbevares ved 12-15 °C, indtil de skal analyseres. Til prøver af affald fra kartoffelforarbejdning og kloakslam indsamles i alt 1 kg materiale fra forskellige steder, som repræsenterer den samlede mængde slam, der skal analyseres. Hver prøve blandes grundigt inden testen.

2.1.2. Delprøver på 10-25 g jord eller slam dispergeres med orbitalryster (250 rpm) i 60-150 ml ekstraktionsbuffer (tillæg 4) i op til 2 timer. Om nødvendigt kan der tilsættes 0,02 % sterilt Tween 20 og 10-20 g sterilt grus for at fremme dispersionen.

2.1.3. Suspensionen holdes på 4 °C under testen.

2.2. Analyse

Testene er beskrevet og illustreret med flowdiagrammer i de relevante tillæg.

AFSNIT VI

OPTIMEREDE PROTOKOLLER TIL PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF *R. SOLANACEARUM*

A. DIAGNOSTICERINGS- OG PÅVISNINGSTEST

1. Karstrømningstest

Tilstedeværelsen af *R. solanacearum* i stængler af visnende kartoffel- eller tomatplanter eller andre værtsplanter kan påvises ved følgende enkle test: Stænglen overskæres lige over jorden. Den overskårne stængel anbringes i et glas med rent vand. Det observeres, om de karakteristiske tråde af bakterieslim spontant strømmer ud af de overskårne karstrengene efter et par minutter.

2. Påvisning af poly- β -hydroxybutyratkorn

1. Der tilberedes et udstrygningspræparat af bakteriesekret fra inficeret væv eller af en 48-timers kultur på YPGA- eller SPA-medie (tillæg 2) på et objektglas.
2. Som kontrol tilberedes positive udstrygningspræparater af en biovar 2-stamme af *R. solanacearum* og om nødvendigt et negativt udstrygningspræparat af en kendt PHB-negativ stamme.
3. Prøven lufttørres, og undersiden af hvert objektglas føres hurtigt hen over en flamme, indtil præparaterne er fikseret.
4. Prøven farves med enten Nile Blue eller Sudan Black og undersøges i mikroskop som beskrevet nedenfor.

Nile Blue-test

- a) Hvert objektglas overhældes med en vandig 1 % Nile Blue A-opløsning og inkuberes i 10 min. ved 55 °C.
- b) Farvningsopløsningen afdrænes. Prøven vaskes kort i langsomt rindende ledningsvand. Overskydende vand fjernes med filterpapir.
- c) Udstrygningspræparatet overhældes med en vandig 8 % eddikesyreopløsning og inkuberes i 1 min. ved stuetemperatur.
- d) Prøven vaskes kort i langsomt rindende ledningsvand. Overskydende vand fjernes med filterpapir.
- e) Prøven genfugtes med en dråbe vand, og der sættes dækglas på.
- f) Det farvede udstrygningspræparat undersøges under et epifluorescensmikroskop ved 450 nm i immersionsolie ved 600-1 000 ganges forstørrelse (der anvendes et olie- eller vandimmersionsobjektiv).
- g) Der observeres for klart orange fluorescens fra PHB-korn. Desuden foretages observation i gennemfaldende normalt lys for at sikre, at kornene er intracellulære, og at cellemorfologien er typisk for *R. solanacearum*.

Sudan Black-test

- a) Hvert objektglas overhældes med 0,3 % Sudan Black B-opløsning i 70 % ethanol og inkuberes i 10 min. ved stuetemperatur.
- b) Farvningsopløsningen afdrænes og vaskes hurtigt i ledningsvand, idet overskydende vand fjernes med filterpapir.
- c) Glassene neddyppes kort i xylen og tørres på filterpapir. NB: Xylen er et sundhedsskadeligt produkt. Træf alle nødvendige sikkerhedsforanstaltninger og arbejd i stinkskab!
- d) Objektglassene overhældes med 0,5 % (w/v) vandig safranin og henstår 10 sek. ved stuetemperatur. NB: Safranin er et sundhedsskadeligt produkt. Træf alle nødvendige sikkerhedsforanstaltninger og arbejd i stinkskab!
- e) Prøven vaskes i langsomt rindende vand og tørres på filterpapir, og der sættes dækglas på.
- f) De farvede udstrygningspræparater undersøges under et lysmikroskop med gennemfaldende lys i immersionsolie ved 1 000 ganges forstørrelse (der anvendes et olieimmersionsobjektiv).
- g) Der observeres for blåsort farvning af PHB-korn i celler af *R. solanacearum* med lyserøde cellevægge.

3. Serologiske agglutinationstest

Agglutination af *R. solanacearum*-celler i bakteriesekret eller ekstrakter fra væv, der udviser symptomer, observeres bedst, hvis der anvendes validerede antistoffer (jf. tillæg 3) mærket med de rigtige farvede markører, såsom røde *Staphylococcus aureus*-celler eller farvede latex-partikler. Hvis der anvendes udstyr, som fås i handelen (jf. tillæg 3), følges fabrikantens anvisninger. Ellers anvendes følgende procedure:

- a) Dråber af en suspension af mærkede antistoffer og bakteriesekret (ca. 5 µl af hver) blandes i vinduerne på objektglas med flere brønde.
- b) Positive og negative kontroller tilberedes med suspensioner af biovar 2-stamme af *R. solanacearum* og en heterolog stamme.
- c) Der observeres for agglutination i positive prøver efter forsigtig blanding heraf i 15 sekunder.

4. Selektiv isolering

4.1. Dyrkning på selektivt medie

NB: Inden denne metode anvendes første gang, gennemføres indledende test for at sikre reproducerbar påvisning af 10^3 - 10^4 kolonidannende celler af *R. solanacearum* pr. ml tilsat til prøveekstrakter, som tidligere er testet negative.

Der anvendes korrekt valideret selektivt medie såsom SMSA (som ændret ved Elphinstone *et al.*, 1996; jf. tillæg 2).

Der kræves omhu for at differentiere *R. solanacearum* fra andre bakterier, som er i stand til at danne kolonier på mediet. Kolonier af *R. solanacearum* kan desuden udvise atypisk morfologi, hvis pladerne er overfyldte, eller hvis også antagonistiske bakterier er til stede. Hvis der er formodning om konkurrence eller antagonisme, bør prøven analyseres igen med en anden test.

Der kan forventes den højeste påvisningsfølsomhed med denne metode, når der anvendes frisklavede prøveekstrakter. Metoden kan dog også anvendes til ekstrakter, der er blevet opbevaret i glycerol ved -68 til -86 °C.

Til anvendelse som positive kontroller forberedes tifoldsfortyndinger af en suspension af 10^6 cfu pr. ml af en virulent biovar 2-stamme af *R. solanacearum* (f.eks. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). For at være sikker på at undgå kontaminering forberedes positive kontroller helt adskilt fra de prøver, der skal testes.

For hver frisklavet batch af selektivt medie bør dets egnethed med hensyn til dyrkning af patogenet testes, inden det anvendes til at teste rutineprøver.

Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

4.1.1. Der anvendes en passende fortyndings- og udstrygningsmetode for at sikre, at eventuelle kolonidannende baggrundspopulationer af blødrådsbakterier fortyndes væk. Spred 50-100 µl pr. plade med prøveekstrakt og hver fortynding.

4.1.2. Pladerne inkuberes ved 28 °C. Pladerne aflæses efter 48 timer og derefter dagligt i op til 6 dage. Kolonier af *R. solanacearum* på SMSA-medie er typisk mælkehvide, flade, uregelmæssige og udflydende og udvikler efter 3 dages inkubation lyserøde til blodrøde centre med indre striber eller hvirvler (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NB: Det kan ske, at der dannes kolonier af *R. solanacearum* på dette medie. Disse kan være små, runde, dybrøde og ikke eller kun delvist udflydende og er derfor vanskelige at skelne fra kolonidannende blødrådsbakterier.

4.1.3. Formodede kolonier af *R. solanacearum* oprensnes efter udstrygning eller fortynding på et generelt næringsmedie for at opnå isolerede kolonier (jf. tillæg 2).

4.1.4. Kulturer opbevares i sterilt vand (pH 6-8, uden chlorin) ved stuetemperatur og mørkt, når der er tale om kortere opbevaringstid, og i en passende kuldebeskyttende beholder ved -68 til -86 °C eller lyofiliseret ved længere opbevaringstid.

4.1.5. Formodede kulturer identificeres (jf. afsnit VI, del B), og der gennemføres en patogenitetstest (jf. afsnit VI, del C).

Fortolkning af resultaterne af selektiv udstrygning

Selektiv udstrygning er negativ, hvis der ikke er observeret nogen kolonier efter 6 døgn, eller hvis der ikke er fundet nogen formodede kolonier af *R. solanacearum*, forudsat at der ikke foreligger mistanke om hæmning som følge af konkurrence eller antagonisme fra andre bakterier, og at karakteristiske kolonier af *R. solanacearum* er fundet i den positive kontrol.

Selektiv udstrygning er positiv, hvis der isoleres formodede kolonier af *R. solanacearum*.

4.2. Berigelsesprocedure

Der anvendes et valideret berigelsesmedie såsom modificeret Wilbrink-bouillon (jf. tillæg 2).

Denne procedure kan anvendes til selektiv forøgelse af populationer af *R. solanacearum* i prøveekstrakter og til at øge påvisningsfølsomheden. Proceduren er desuden et effektivt middel til at fortynde inhibitorer for PCR-reaktionen (1:100). Det skal dog bemærkes, at berigelsen af *R. solanacearum* kan mislykkes som følge af konkurrence eller antagonisme fra saprofytiske organismer, som ofte beriges i den samme proces. Af samme grund kan isolering af *R. solanacearum* fra berigede bouillonkulturer være en vanskelig proces. Dertil kommer, at det på grund af sandsynligheden for en forøgelse af populationer af serologisk beslægtede blødrådsbakterier anbefales at anvende specifikke monoklonale antistoffer frem for polyklonale antistoffer, når ELISA-testen benyttes.

- 4.2.1. Til berigelses-PCR overføres 100 µl prøveekstrakt til 10 ml berigelsesbouillon (tillæg 2), som forinden er blevet inddelt i delprøver i dna-frie glas eller beholdere. Til berigelses-ELISA kan der anvendes større mængder prøveekstrakt i forhold til bouillon (f.eks. 100 µl i 1,0 ml berigelsesbouillon).
- 4.2.2. Der inkuberes i 72 timer ved 27-30 °C i kultur under rystning eller i stillestående kultur med glassets prop sat løst på af hensyn til beluftning.
- 4.2.3. Blandes grundigt inden brug i ELISA- eller PCR-test.
- 4.2.4. Beriget bouillon behandles som beskrevet for prøvernes vedkommende i ovenfor omhandlede test.

NB: Hvis det forventes, at berigelsen af *R. solanacearum* vil blive hæmmet på grund af store populationer af bestemte konkurrerende blodrådsakterier, vil berigelse af prøveekstrakterne inden centrifugering eller anden form for opkoncentrering kunne give bedre resultater.

5. IF-test

Princip

Det anbefales, at IF-testen anvendes som den primære screeningtest på grund af dens dokumenterede robusthed i forbindelse med de fastsatte tærskelværdier.

Når IF-testen anvendes som den primære screeningtest, og IF-resultatet er positivt, skal isoleringen, PCR-testen eller FISH-testen gennemføres som anden screeningtest. Når IF-testen anvendes som anden screeningtest, og IF-resultatet er positivt, skal der gennemføres yderligere test i henhold til flowdiagrammet for at fuldende analysen.

NB: Der skal anvendes en valideret kilde til antistoffer mod *R. solanacearum* (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Det anbefales, at titeren bestemmes for enhver ny antistofbatch. Titeren defineres som den største fortynding, ved hvilken der opstår optimal reaktion ved test af en suspension af 10^5 - 10^6 celler/ml fra den homologe stamme af *R. solanacearum*, idet der benyttes et passende fluoresceinisothiocyanatkonjugat (FITC-konjugat) i overensstemmelse med producentens anbefalinger. De validerede polyklonale antisera havde alle en IF-titer på mindst 1: 2 000. Under testen bør antistofferne anvendes som en arbejdsfortynding (WD), der er den samme som eller tæt på titeren.

Testen bør gennemføres på frisklavede prøveekstrakter. Om nødvendigt kan testen udmærket gennemføres på ekstrakter, der er opbevaret ved - 68 til - 86 °C i glycerol. Glycerol kan fjernes fra prøven ved tilsætning af 1 ml pelletbuffer (tillæg 4), ny centrifugering i 15 min. ved 7 000 g og resuspension i en tilsvarende mængde pelletbuffer. Dette er ofte unødvendigt, særlig hvis prøverne er fikseret til objektglassene ved flambering.

Der forberedes særskilte, positive kontrolglas fra den homologe stamme eller en anden referencestamme af *R. solanacearum* suspenderet i kartoffel ekstrakt, som angivet i tillæg 3, del B, og evt. i buffer.

Naturligt inficeret væv (opbevaret evt. ved frysetørring eller ved frysning ved - 16 til - 24 °C) bør anvendes, når det er muligt, som en lignende kontrol på samme glas.

Som negative kontroller kan anvendes delprøver af prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt for *R. solanacearum*.

Standardiseret positivt og negativt kontrolmateriale, som kan anvendes til denne test, er angivet i tillæg 3.

Der benyttes objektglas med flere brønde og helst med ti vinduer med en diameter på mindst 6 mm.

Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

5.1. Testglassene tilberedes på en af nedenstående måder:

- i) For pellets med forholdsvis lidt bundfældet stivelse:

En afmålt standardmængde (15 µl er passende for 6 mm vinduesdiameter — mængden øges forholdsvis på større vinduer) af en fortynding på 1:100 af den resuspenderede kartoffel pellet afpipetteres på det første vindue. Derefter afpipetteres en lignende mængde ufortyndet pellet (1:1) på de øvrige vinduer i rækken. Den anden række kan anvendes som duplikat eller til en anden prøve som beskrevet i figur 1.

- ii) For andre pellets:

Der laves tifoldsfortyndinger (1:10, 1:100) af den resuspenderede pellet i pelletbuffer. En afmålt standardmængde (15 µl er passende for 6 mm vinduesdiameter — mængden øges forholdsmæssigt for større vinduer) af den resuspenderede pellet og hver fortynding afpipetteres på en række vinduer. Den anden række kan anvendes som duplikat eller til en anden prøve som beskrevet i figur 2.

- 5.2. Dråberne tørres ved stuetemperatur eller ved opvarmning til 40-45 °C. Bakteriecellerne fikseres på glasset ved opvarmning (15 min. ved 60 °C), ved flambering, med 95 % ethanol eller ifølge særlige anvisninger fra antistofleverandørerne.

Glas med fikseret materiale kan om nødvendigt derefter opbevares frosset i en udtørret beholder så kort tid som nødvendigt (højest 3 måneder) inden yderligere test.

5.3. IF-procedure

- i) Forberedelse af testglas som beskrevet ovenfor i punkt 5.1, nr. i):

Der laves en række tofoldsfortyndinger. Den første brønd bør have 1/2 af titeren (T/2), de øvrige 1/4 af titeren (T/4), 1/2 af titeren (T/2), titeren (T) og det dobbelte af titeren (2T).

- ii) Forberedelse af testglas som beskrevet ovenfor i punkt 5.1, nr. ii):

Der laves en arbejdsfortynding (WD) af antistoffet i IF-buffer. Arbejdsfortyndingen påvirker specificiteten.

Figur 1. Forberedelse af testglas som beskrevet i punkt 5.1, nr. i), og punkt 5.3, nr. i)

		Fortyndinger af resuspenderet pellet						
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Fortynding af resuspenderet pellet	
		(T = titer)	T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Tofoldsfortyndinger af antiserum/antistof
Prøve 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5		
Duplikat af prøve 1 eller prøve 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10		

Figur 2. Forberedelse af testglas som beskrevet i punkt 5.1, nr. ii), og punkt 5.3, nr. ii)

		Arbejdsfortynding af antiserum/antistof					
		1/1	1/10	1/100	tom	tom	<input type="checkbox"/> Tifoldsfortynding af resuspenderet pellet
Prøve 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat af prøve 1 eller prøve 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 5.3.1. Objektglassene placeres på fugtigt filtrerpapir. Testvinduerne dækkes hver især helt med antistoffortyndingen(-erne). Den mængde antistof, der anbringes på de enkelte vinduer, skal mindst svare til den tilsatte mængde ekstrakt.

Følgende procedure følges, hvis der ikke foreligger særlige anvisninger fra antistofleverandørerne.

- 5.3.2. Glassene inkuberes tildækket på fugtigt papir i 30 min. ved stuetemperatur (18-25 °C).
- 5.3.3. Dråberne rystes af de enkelte glas, og glassene skylles forsigtigt med IF-buffer. De vaskes ved nedsænkning i 5 min. i IF-buffer-Tween (tillæg 4) og efterfølgende i IF-buffer. Aerosoldannelse eller overførsel af dråber, der kan medføre krydskontaminering, skal undgås. Overskydende fugt fjernes omhyggeligt ved at duppe dem forsigtigt.
- 5.3.4. Objektglassene placeres på fugtigt filtrerpapir. Testvinduerne dækkes med den fortynding af FITC-konjugatet, der er brugt til at bestemme titeren. Den mængde konjugat, der anbringes på vinduerne, skal svare til den tilsatte mængde antistof.
- 5.3.5. Glassene inkuberes tildækket på fugtigt papir i 30 min. ved stuetemperatur (18-25 °C).
- 5.3.6. Konjugatdråberne rystes af glasset. Glassene skylles og vaskes som ovenfor (5.3.3).

Overskydende fugt fjernes forsigtigt.

- 5.3.7. 5-10 µl af 0,1 M fosfatbufferet glycerol (tillæg 4) eller et tilsvarende indlejningsmiddel, der modvirker falmning, og som kan fås i handelen, afpipetteres på hvert vindue, og der sættes dækglass på.

5.4. Aflæsning af IF-testen

- 5.4.1 Testglassene undersøges i et epifluorescensmikroskop og et filter, som er egnet til arbejdet med FITC, i immersionsolie eller -vand ved 500-1 000 ganges forstørrelse. Vinduerne gennemses langs to diametre vinkelret på hinanden og langs omkredsen. Ved prøver, hvor der ikke konstateres nogen eller kun få celler, undersøges mindst 40 mikroskopfelter.

Glasset med den positive kontrol undersøges først. Cellerne skal være stærkt fluorescerende og fuldstændigt farvede ved den antistoftiter eller arbejdsfortynding, der er bestemt. IF-testen (afsnit VI, del A, punkt 5) gentages, hvis farvningen er unormal.

- 5.4.2. Dernæst observeres, om der er stærkt fluorescerende celler med den for *R. solanacearum* karakteristiske morfologi i testvinduerne på glassene (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescensens intensitet skal svare til den positive kontrolstammes ved samme antistoffortynding. Celler med ufuldstændig farvning eller med svag fluorescens ses der bort fra.

Hvis der er mistanke om kontaminering, gentages testen. Dette kan være tilfældet, hvis alle objektglas i en batch har positive celler som følge af kontaminering af buffer, eller hvis der konstateres positive celler (uden for vinduerne på objektglasset) på glassets belægning.

- 5.4.3. Der er flere problemer forbundet med immunfluorescens-testens specificitet. Baggrundsflora af fluorescerende celler med atypisk morfologi og krydsreagerende blødrådsbakterier, som i størrelse og morfologi ligner *R. solanacearum*, vil sandsynligvis forekomme i pellets af navleende og stængelstykker fra kartofler.
- 5.4.4. Kun fluorescerende celler med typisk størrelse og morfologi ved den antistoftiter eller arbejdsfortynding, der er beskrevet i punkt 5.3, tages i betragtning.

5.4.5. Fortolkning af IF-resultatet

- i) Hvis der findes stærkt fluorescerende celler med karakteristisk morfologi, anslås det gennemsnitlige antal typiske celler pr. mikroskopfelt, og antal typiske celler pr. ml resuspenderet pellet beregnes (tillæg 5).

IF-resultatet er positivt for prøver med mindst 5×10^3 typiske celler pr. ml resuspenderet pellet. Prøven betragtes som potentielt kontamineret, og der skal gennemføres supplerende test.

- ii) IF-resultatet er negativt for prøver med under 5×10^3 celler pr. ml resuspenderet pellet, og prøven anses for negativ. Det er ikke nødvendigt med yderligere test.

6. **PCR-test***Principper*

Når PCR-testen anvendes som den primære screeningtest, og resultatet er positivt, skal isolering eller IF-testen gennemføres som anden obligatoriske screeningtest. Når PCR anvendes som anden screeningtest, og resultatet er positivt, skal der gennemføres yderligere test i henhold til flowdiagrammet for at fuldende diagnosen.

Fuld udnyttelse af denne metode som primær screeningtest kan kun anbefales, når der er opnået særlig ekspertise.

NB: Indledende test med denne metode skulle muliggøre reproducerbar påvisning af 10^3 - 10^4 celler af *R. solanacearum* pr. ml tilsat til prøveekstrakter, som tidligere er testet negative. Der kan evt. være behov for optimeringsforsøg for at opnå maksimal følsomhed og specificitet i alle laboratorier.

Der skal anvendes validerede PCR-reagenser og protokoller (jf. tillæg 6). Der skal helst vælges en metode med en intern kontrol.

Der skal træffes relevante forholdsregler for at undgå, at prøven kontamineres med target-dna. PCR-testen bør gennemføres af erfarne teknikere på særlige molekylærbiologiske laboratorier for at minimere muligheden for kontaminering med target-dna.

Negative kontroller (ved dna-ekstraktion og i PCR-testprocedurer) bør altid håndteres som den sidste prøve i proceduren, så det tydeligt ses, hvis der er sket overførsel af dna fra andre prøver.

PCR-testen bør indeholde følgende negative kontroller:

- prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt for *R. solanacearum*
- bufferkontroller, der anvendes til ekstrahering af bakterien og dna'et fra prøven
- PCR-mastermix.

Den bør indeholde følgende positive kontroller:

- Delprøver af resuspenderede pellets, til hvilke der er tilsat *R. solanacearum* (forberedelse: se tillæg 3, del B).
- En suspension i vand af 10^6 celler pr. ml af *R. solanacearum* fra et virulent isolat (f.eks. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; jf. tillæg 3, del B).
- Om muligt anvendes desuden dna ekstraheret fra positive kontrolprøver ved PCR-testen.

For at undgå potentiel kontaminering forberedes positive kontroller under betingelser, der er adskilt fra de prøver, der skal testes.

Prøveekstrakter bør i videst muligt omfang være fri for jord. Det kan derfor i visse tilfælde anbefales at forberede ekstrakter fra vaskede kartofler, hvis der skal anvendes PCR-protokoller.

Standardiseret positivt og negativt kontrolmateriale, som kan anvendes til denne test, er angivet i tillæg 3.

6.1. Dna-oprensningmetoder

Der anvendes positive og negative kontrolprøver som beskrevet ovenfor (jf. tillæg 3).

Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

Den findes en lang række metoder til oprensning af target-dna fra komplekse prøvesubstrater, hvorved PCR-inhibitorer og andre enzymatiske reaktioner fjernes og target-dna'et opkoncentreres i prøveekstraktet. Følgende metode er blevet optimeret med henblik på anvendelse med de validerede PCR-metoder, der er beskrevet i tillæg 6.

a) Metode efter Pastrik (2000)

- 1) Der afpipetteres 220 µl lysisbuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)) i et 1,5 ml eppendorfrør.
- 2) Der tilsættes 100 µl prøveekstrakt, og det placeres i en varmeblok eller et vandbad ved 95 °C i 10 min.
- 3) Røret anbringes i isbad i 5 min.
- 4) Der tilsættes 80 µl lysozymstamopløsning (50 mg lysozym pr. ml i 10 mM Tris HCl, pH 8,0), og der inkuberes ved 37 °C i 30 min.
- 5) Der tilsættes 220 µl Easy DNA[®]-opløsning A (Invitrogen), der vortexes grundigt, og der inkuberes ved 65 °C i 30 min.
- 6) Der tilsættes 100 µl Easy DNA[®]-opløsning B (Invitrogen), og der vortexes kraftigt, indtil præcipitatet løber frit i røret, og prøven er jævnt tyktflydende.
- 7) Der tilsættes 500 µl chloroform, og der vortexes, indtil prøven bliver mindre tyktflydende og blandingen er homogen.
- 8) Der centrifugeres ved 15 000 g i 20 min. ved 4 °C for at adskille faser og danne interfasen.
- 9) Den øverste fase overføres til et rent eppendorfrør.
- 10) Der tilsættes 1 ml 100 % ethanol (– 20 °C), der vortexes kort, og der inkuberes i isbad i 10 min.
- 11) Der centrifugeres ved 15 000 g i 20 min. ved 4 °C, og ethanolen fjernes fra pellet.
- 12) Der tilsættes 500 µl 80 % ethanol (– 20 °C), og der blandes ved at vende røret på hovedet.
- 13) Der centrifugeres ved 15 000 g i 10 min. ved 4 °C, pellet beholdes, og ethanolen fjernes.
- 14) Pellet lufttørres eller tørres i en DNA Speed Vac.
- 15) Pellet resuspenderes i 100 µl sterilt ultrarent vand og henstår ved stuetemperatur i mindst 20 min.
- 16) Opbevares ved – 20 °C, indtil den skal anvendes til PCR.
- 17) Evt. hvidt præcipitat spindes ned ved centrifugering, og 5 µl af den supernatant, der indeholder dna, anvendes til PCR.

b) Andre metoder

Der kan anvendes andre dna-ekstraktionsmetoder, f.eks. Qiagen DNeasy Plant Kit, forudsat at det er dokumenteret, at de er lige så effektive til at oprense dna fra kontrolprøver med 10^3 - 10^4 patogene celler pr. ml.

- 6.2. PCR
- 6.2.1. Test- og kontrolskabeloner til PCR forberedes i overensstemmelse med de validerede protokoller (afsnit VI, del A, punkt 6). Der forberedes en tifoldsfortynding af prøve-dna-ekstrakt (1:10 i ultrarent vand).
- 6.2.2. Det relevante PCR-mastermix forberedes i et kontamineringsfrit miljø i overensstemmelse med de publicerede protokoller (tillæg 6). Hvor det er muligt, anbefales det at anvende en multiplex-PCR-protokol, som også omfatter en intern PCR-kontrol.
- 6.2.3. Der tilsættes 2-5 µl dna-ekstrakt pr. 25 µl PCR-reaktion i sterile PCR-rør i overensstemmelse med PCR-protokollerne (jf. tillæg 6).
- 6.2.4. Der medtages en negativ kontrolprøve, der udelukkende indeholder PCR-mastermix, og der tilsættes ultrarent vand fra samme kilde som den, der anvendes til PCR-blandingen i prøvens sted.
- 6.2.5. Rørene anbringes i det samme PCR-apparat som det, der blev anvendt til den indledende test, og det korrekt optimerede PCR-protokol gennemføres (tillæg 6).
- 6.3. Analyse af PCR-produktet
- 6.3.1. PCR-amplikoner kan adskilles ved agarosegelelektroforese. Ved testen anvendes mindst 12 µl amplificeret dna-mastermix fra hver prøve blandet med 3 µl loadingbuffer (tillæg 6) i 2,0 % (w/v) agarosegel i tris-acetat-EDTA-buffer (TAE-buffer) (tillæg 6) ved 5-8 V pr. cm. Der anvendes en relevant dna-markør, f.eks. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Dna-båndene visualiseres ved farvning i ethidiumbromid (0,5 mg pr. l) i 30-60 min., idet der træffes de fornødne forholdsregler ved håndteringen af dette mutagen.
- 6.3.3. Den farvede gel undersøges ved UV-gennemlysning ($\lambda = 302 \text{ nm}$) for amplificerede PCR-produkter af den forventede størrelse (tillæg 6); resultatet skal dokumenteres.
- 6.3.4. Ved alle nye fund/tilfælde verificeres PCR-amplikonens ægthed ved restriktionsenzymanalyse af en prøve af det resterende amplificerede dna ved at inkubere ved optimal temperatur i et optimalt tidsrum med passende enzym og buffer (se tillæg 6). De nedbrudte fragmenter adskilles som før ved agarosegelelektroforese, og det karakteristiske restriktionsfragment-mønster undersøges ved UV-gennemlysning efter farvning med ethidiumbromid og sammenlignes med den nedbrudte og den ikke-nedbrudte positive kontrol.

Fortolkning af PCR-testresultatet

PCR-testen er negativ, hvis det *R. solanacearum*-specifikke PCR-amplikon af den forventede størrelse ikke påvises i den pågældende prøve, men påvises i alle positive kontrolprøver (ved multiplex-PCR med plantespecifikke interne kontrolprimere skal endnu et PCR-produkt af den forventede størrelse amplificeres med den pågældende prøve).

PCR-testen er positiv, hvis det *R. solanacearum*-specifikke PCR-amplikon af den forventede størrelse og med (evt.) det forventede restriktionsmønster påvises, forudsat at det ikke er blevet amplificeret fra nogen af de negative kontrolprøver. Pålidelig bekræftelse af et positivt resultat kan endvidere fås ved at gentage testen med et nyt sæt PCR-primere (tillæg 6).

NB: Der er mistanke om PCR-inhibition, hvis det forventede amplikon fremkommer fra den positive kontrolprøve, der indeholder *R. solanacearum* i vand, men der fås negative resultater fra positive kontrolprøver med *R. solanacearum* i kartoffelekstrakt. I multiplex-PCR-protokoller med interne PCR-kontroller er det tegn på inhibition af reaktionen, hvis ingen af de to amplikoner fremkommer.

Der er mistanke om kontaminering, hvis det forventede amplikon fremkommer fra en eller flere af de negative kontroller.

7. FISH-test

Princip

Når FISH-testen anvendes som den første screeningtest, og resultatet er positivt, skal isolering eller IF-testen gennemføres som anden obligatoriske screeningtest. Når FISH-testen anvendes som anden screeningtest, og resultatet er positivt, skal der gennemføres yderligere test i henhold til flowdiagrammet for at komplettere diagnosen.

NB: Der skal anvendes validerede *R. solanacearum*-specifikke oligo-prober (jf. tillæg 7). Indledende test med denne metode skulle muliggøre reproducerbar påvisning af mindst 10^3 - 10^4 celler af *R. solanacearum* pr. ml tilsat til prøveekstrakter, som tidligere er testet negative.

Følgende procedure bør gennemføres på frisklavet prøveekstrakt, men kan også udmærket gennemføres på prøveekstrakt, der er opbevaret i glycerol ved -16 til -24 °C eller -68 til -86 °C.

Som negative kontroller anvendes delprøver af prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt for *R. solanacearum*.

Til anvendelse som positive kontroller forberedes suspensioner med 10^5 - 10^6 celler pr. ml af *R. solanacearum*, biovar 2 (f.eks. stamme NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; jf. tillæg 3), i 0,01 M fosfatbuffer fra en 3-5 dage gammel dyrkning. Der forberedes særskilte glas med positive kontroller fra den homologe stamme eller en anden referencestamme af *R. solanacearum* suspenderet i kartoffelekstrakt, som angivet i tillæg 3, del B.

Ved at anvende den FITC-mærkede eubakterielle oligo-probe kan hybridiseringsprocessen kontrolleres, da den farver alle eubakterier, der forekommer i prøven.

Standardiseret positivt og negativt kontrolmateriale, som kan anvendes til denne test, er angivet i tillæg 3, punkt A.

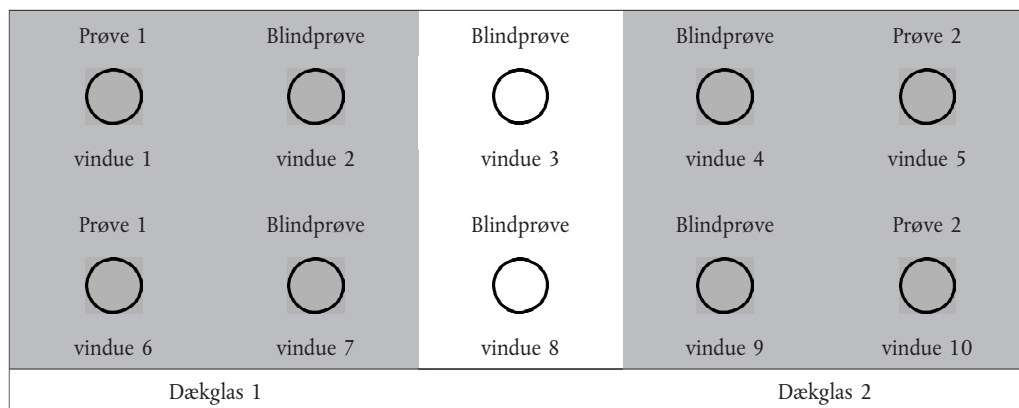
Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

7.1. Fiksering af kartoffelekstrakt

Følgende protokol er baseret på Wullings *et al.* (1998):

- 7.1.1. En fikseringsopløsning forberedes (se tillæg 7).
- 7.1.2. Der afpipetteres 100 µl af hvert prøveekstrakt i et eppendorfrør, og der centrifugeres i 7 min. ved 7 000 g.
- 7.1.3. Supernatanten fjernes, og pellet opløses i 200 µl fikseringsopløsning, der er forberedt mindre end 24 timer før. Der vortexes og inkuberes i 1 time i køleskab.
- 7.1.4. Der centrifugeres i 7 min. ved 7 000 g, supernatanten fjernes, og pellet resuspenderes i 75 µl 0,01 M fosfatbuffer (se tillæg 7).
- 7.1.5. Der uddryppes 16 µl af de fikserede suspensioner på et rent multitest-glas, jf. figur 7.1. Der uddryppes 2 forskellige ufortyndede prøver pr. glas, og der anvendes 10 µl til at lave en fortynding i forholdet 1:100 (i 0,01 M fosfatbuffer). Den resterende prøveopløsning (49 µl) kan opbevares ved -20 °C efter tilsætning af 1 del 96 % ethanol. Hvis der er behov for at gentage FISH-assayet, fjernes ethanolen ved centrifugering, og der tilsættes samme mængde 0,01 M fosfatbuffer (der vortexes).

Figur 7.1: Placering på FISH-glas



7.1.6. Glassene lufttørres (eller tørres i et tørreapparat ved 37 °C) og fikseres ved flambering.

På dette trin kan proceduren afbrydes, og hybridiseringen fortsættes næste dag. Glassene bør opbevares støvfrit og tørt ved stuetemperatur.

7.2. Hybridisering

7.2.1. Cellerne dehydreres i en række med stigende ethanolconcentration (50 %, 80 % og 96 %) i 1 min. for hver. Glassene lufttørres i en glasholder.

7.2.2. Et fugtkammer til inkubation forberedes ved at dække bunden i en lufttæt kasse med filterpapir, der er gennemvædet med 1x hybmix (tillæg 7). Kassen præinkuberes i hybridiseringsovnen ved 45 °C i mindst 10 min.

7.2.3. Der tilsættes 10 µl hybridiseringsopløsning (tillæg 7) til 8 vinduer (vindue 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 og 10; jf. fig. 7.1) på hvert glas, idet de to vinduer i midten (3 og 8) skal være tomme.

7.2.4. Der sættes dækglas (24 × 24 mm) på det første og de sidste fire vinduer uden luftlommer. Objektglassene anbringes i det foropvarmede fugtkammer og hybridiseres i 5 timer i ovnen ved 45 °C i mørke.

7.2.5. Der forberedes 3 bægerglas med 1 l Milli Q-vand (af molekylærbiologisk kvalitet), 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix og 666 ml Milli Q-vand) og 1 l 1/8x hybmix (42 ml 3x hybmix og 958 ml Milli Q-vand). De præinkuberes alle i vandbad ved 45 °C.

7.2.6. Dækglassene fjernes fra objektglassene, og objektglassene anbringes i en glasholder.

7.2.7. Overskydende probe bortvaskes ved inkubation i 15 min. i bægerglasset med 1x hybmix ved 45 °C.

7.2.8. Glasholderen overføres til 1/8 hybmix vaskeopløsning, og der inkuberes i yderligere 15 min.

7.2.9. Glassene neddyppes kort i Milli Q-vand og placeres på filterpapir. Overskydende fugt fjernes ved at dække overfladen forsigtigt med filterpapir. 5-10 µl indlejningsopløsning, der modvirker falmning (f.eks. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, eller tilsvarende) afpipetteres på hvert vindue, og der anbringes et stort dækglas (24 × 60 mm) over hele objektglasset.

7.3. Aflæsning af FISH-testen

7.3.1. Objektglassene undersøges straks under et epifluorescensmikroskop i immersionsolie ved 630 eller 1 000 ganges forstørrelse. Med et filter, der er egnet til fluoresceinisothiocyanat (FITC), farves eubakterielle celler (herunder de fleste gram-negative celler) i prøven fluorescerende grønne. Ved anvendelse af et filter for tetramethylrhodamin-5-isothiocyant fremtræder Cy3-farvede celler af *R. solanacearum* fluorescerende røde. Cellemorfologien sammenlignes med de positive kontroller. Cellerne skal være stærkt fluorescerende og fuldstændig farvede. FISH-testen (afsnit VI, del A, punkt 7) gentages, hvis farvningen er unormal. Vinduerne gennemses langs to diametre vinkelret på hinanden og langs omkredsen. Ved prøver, hvor der ikke konstateres nogen eller kun få celler, undersøges mindst 40 mikroskopfelter.

7.3.2. Dernæst observeres, om der er stærkt fluorescerende celler med den karakteristiske morfologi for *R. solanacearum* i testvinduerne på glassene (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescensens intensitet skal mindst svare til den positive kontrolstammes. Celler med ufuldstændig farvning eller med svag fluorescens ses der bort fra.

7.3.3. Hvis der er mistanke om kontaminering, gentages testen. Dette kan være tilfældet, hvis alle objektglas i en batch har positive celler som følge af kontaminering af buffer, eller hvis der konstateres positive celler (uden for vinduerne på objektglasset) på glassets belægning.

- 7.3.4. Der er flere problemer forbundet med FISH-testens specificitet. Baggrundsflora af fluorescerende celler med atypisk morfologi og krydsreagerende blødrådsakterier, som i størrelse og morfologi ligner *R. solanacearum*, kan forekomme — om end mindre hyppigt end i IF-testen — i pellets af navleende og stængelstykker fra kartofler.
- 7.3.5. Kun fluorescerende celler med typisk størrelse og morfologi tages i betragtning.
- 7.3.6. Fortolkning af FISH-testresultatet
- FISH-testresultaterne er gyldige, hvis der i alle positive kontroller og i ingen af de negative kontroller ses stærkt grønt-fluorescerende celler med størrelse og morfologi, der er typisk for *R. solanacearum*, ved anvendelse af FITC-filteret, og stærkt rødt-fluorescerende celler ved anvendelse af rhodaminfilteret. Hvis der findes stærkt fluorescerende celler med karakteristisk morfologi, anslås det gennemsnitlige antal typiske celler pr. mikroskopfelt, og antal typiske celler pr. ml resuspenderet pellet beregnes (tillæg 4). Prøver med mindst 5×10^3 typiske celler pr. ml resuspenderet pellet betragtes som potentielt kontamineret. Der skal gennemføres yderligere test. Prøver med mindre end 5×10^3 typiske celler pr. ml resuspenderet pellet betragtes som negative.
 - FISH-testen er negativ, hvis der ikke ses stærkt rødt-fluorescerende celler med størrelse og morfologi, der er typisk for *R. solanacearum*, ved anvendelse af rhodaminfilteret, forudsat at der ses typiske stærkt rødt-fluorescerende celler i de positive kontrolpræparater ved anvendelse af rhodaminfilteret.

8. ELISA-test

Princip

På grund af sin relativt lave følsomhed er ELISA-testen udelukkende en valgfri test, der kan anvendes som supplement til IF, PCR eller FISH. Når der anvendes DAS ELISA, er berigelse og brug af monoklonale antistoffer obligatorisk (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Berigelse af prøverne, inden ELISA-testen gennemføres, kan være et velegnet middel til at øge testens følsomhed, men der er en risiko for, at den mislykkes som følge af konkurrence fra andre organismer, der er til stede i prøven.

NB: Der skal anvendes en valideret kilde til antistoffer mod *R. solanacearum* (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Det anbefales, at titeren bestemmes for enhver ny antistofbatch. Titeren defineres som den største fortynding, ved hvilken der opstår optimal reaktion ved test af en suspension af 10^5 - 10^6 celler/ml fra den homologe stamme af *R. solanacearum*, idet der benyttes passende sekundære antistofkonjugater i overensstemmelse med producentens anbefalinger. Under testen bør antistofferne anvendes som en arbejdsfortynding, der er den samme som eller tæt på titeren for den markedsførte formulering.

Antistoffernes titer bestemmes på en suspension af 10^5 - 10^6 celler/ml fra den homologe stamme af *R. solanacearum*.

Medtag et prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt for *R. solanacearum*, og en suspension af en ikke-krydsreagerende bakterie i fosfatbufferet saltopløsning (PBS) som negative kontroller.

Som positiv kontrol anvendes delprøver af prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt, blandet med 10^3 - 10^4 celler pr. ml af *R. solanacearum*, biovar 2 (f.eks. stamme NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; jf. tillæg 2, del A og B). Til sammenligning af resultaterne på de enkelte plader anvendes en standardsuspension af 10^5 - 10^6 celler pr. ml i PBS fra *R. solanacearum*. Det skal sikres, at positive kontroller på mikrotiterpladen holdes fuldstændig adskilt fra prøver, der er ved at blive analyseret.

Standardiseret positivt og negativt kontrolmateriale, som kan anvendes til denne test, er angivet i tillæg 3, punkt A.

Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

Der er valideret to ELISA-protokoller.

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

- Prøveekstraktet anvendes i portioner à 100-200 µl. (Opvarmning ved 100 °C i 4 minutter i vandbad eller varmeblok kan i visse tilfælde begrænse de ikke-specifikke resultater.)
- Der tilsættes en lige så stor mængde coatingbuffer af dobbelt styrke (tillæg 4) og vortexes.
- 100 µl portioner af prøven anbringes på hver af mindst to brønde i mikrotiterpladen (f.eks. Nunc-Polysorp eller lignende), og der inkuberes i 1 time ved 37 °C eller natten over ved 4 °C.

- 4) Ekstrakterne hældes ud af brøndene. Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 4). Det sidste hold vaskeopløsning skal henstå i brøndene mindst 5 min.
- 5) Der laves en passende fortynding af antistoffer mod *R. solanacearum* i blokeringsbuffer (tillæg 4). Til validerede antistoffer, som fås i handelen, anvendes de anbefalede fortyndinger (normalt dobbelt så koncentreret som titeren).
- 6) Der overføres 100 µl til hver brønd og inkuberes i 1 time ved 37 °C.
- 7) Opløsningen af antistoffer hældes ud af brøndene, og der vaskes som beskrevet i punkt 4.
- 8) Der laves en passende fortynding af sekundært alkalisk antistof-fosfatasekonjugat i blokeringsbuffer. Der overføres 100 µl til hver brønd og inkuberes i 1 time ved 37 °C.
- 9) Opløsningen af konjugerede antistoffer hældes ud af brøndene, og der vaskes som beskrevet i punkt 4.
- 10) Der overføres 100 µl alkalisk fosfatasesubstratopløsning (tillæg 4) til hver brønd. Der inkuberes i mørke ved stuetemperatur, og absorbansen aflæses ved 405 nm med regelmæssige mellemrum over 90 min.

b) DASI ELISA

- 1) Der laves en passende fortynding af polyklonale anti-*R. solanacearum*-immunglobuliner i coatingbuffer, pH 9,6 (tillæg 4). Der overføres 200 µl til hver brønd. Der inkuberes ved 37 °C i 4-5 timer eller ved 4 °C i 16 timer.
- 2) Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 4).

Der overføres 190 µl prøveekstrakt til mindst 2 brønde. Desuden anbringes positive og negative kontroller i to brønde på hver plade. Der inkuberes i 16 timer ved 4 °C.
- 3) Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 4).
- 4) Der laves en passende fortynding af specifikke monoklonale antistoffer mod *R. solanacearum* i PBS (tillæg 4) indeholdende 0,5 % bovint serumalbumin (BSA), og 190 µl overføres til hver brønd. Der inkuberes ved 37 °C i 2 timer.
- 5) Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 4).
- 6) Der laves en passende fortynding af antimuse-immunglobuliner konjugeret med alkalisk fosfatase i PBS. Der overføres 190 µl til hver brønd. Der inkuberes ved 37 °C i 2 timer.
- 7) Brøndene vaskes tre gange med PBS-Tween (tillæg 4).
- 8) Der laves en alkalisk fosfatasesubstratopløsning indeholdende 1 mg p-nitrophenylfosfat pr. ml. substratbuffer (tillæg 4). Der overføres 200 µl til hver brønd. Der inkuberes i mørke ved stuetemperatur, og absorbansen aflæses ved 405 nm med regelmæssige mellemrum over 90 min.

Fortolkning af ELISA-testresultaterne

ELISA-testen er negativ, hvis den gennemsnitlige OD-værdi af aflæsningerne af duplikatprøvebrøndene er $< 2 \times$ OD af værdien af kontrolbrønden med negativt prøveekstrakt, forudsat at OD for alle de positive kontroller er på over 1,0 (efter 90 minutters inkubation med substratet) og er større end to gange den for de negative prøveekstrakter opnåede OD.

ELISA-testen er positiv, hvis den gennemsnitlige OD-værdi af aflæsningerne af duplikatprøvebrøndene er $> 2 \times$ OD af værdien af kontrolbrønde med negativt prøveekstrakt, forudsat at OD-aflæsningerne for alle de negative kontrolbrønde er mindre end to gange aflæsningerne af de positive kontrolbrønde.

Negative ELISA-aflæsninger af positive kontrolbrønde er tegn på, at testen ikke er blevet gennemført korrekt, eller at den er blevet hæmmet. Positive ELISA-aflæsninger af negative kontrolbrønde er tegn på, at krydskontaminering eller binding af ikke-specifikke antistoffer har fundet sted.

9. Biotest

NB: Indledende test med denne metode skal muliggøre reproducerbar påvisning af 10^3 - 10^4 kolonidannende celler af *R. solanacearum* pr. ml tilsat til prøveekstrakter, som tidligere er testet negative (forberedelse: se tillæg 3).

Testen er mest følsom, når der anvendes frisklavet prøveekstrakt, og der er optimale vækstbetingelser. Metoden kan dog udmærket anvendes på ekstrakter, der er blevet opbevaret i glycerol ved -68 til -86 °C.

Følgende protokol er baseret på Janse (1988):

- 9.1. Der benyttes ti testplanter af en modtagelig tomatkultivar (f.eks. Moneymaker eller en anden kultivar med tilsvarende modtagelighed, som prøvningslaboratoriet måtte vælge) i bladstadium 3 til hver prøve. Nærmere oplysninger vedrørende dyrkning findes i tillæg 8. Som alternativ kan der anvendes ægplanter (f.eks. kultivaren Black Beauty eller en anden kultivar med tilsvarende modtagelighed). Der anvendes udelukkende planter i bladstadium 2-3, hvor højst tre blade er foldet helt ud. Det har vist sig, at symptomer er mindre udtalte og udvikler sig langsommere i ægplanter. Det anbefales derfor at anvende tomatstiklinger.

- 9.2. 100 µl prøveekstrakt fordeles mellem testplanterne.

9.2.1. Sprøjteinokulering

På plantestænglerne podes lige over kimbladene med en sprøjte, der er forsynet med en subkutan nål (ikke mindre end 23 G). Prøven fordeles mellem testplanterne.

9.2.2. Snitinokulering

Idet planten holdes mellem to fingre, anbringes med pipette en dråbe (ca. 5-10 µl) af den suspenderede pellet på stænglen mellem kimbladene og det første blad.

Med en steril skalpel skæres et diagonalt snit, der er 1,0 cm langt og så dybt som ca. 2/3 af stænglens tykkelse, idet snittet begyndes fra pelletdråben.

Snittet lukkes med steril vaseline fra en sprøjte.

- 9.3. Efter samme metode indpodes 5 stiklinger med en vandig suspension af 10^5 - 10^6 celler/ml af en 48-timers kultur af en virulent biovar 2-stamme af *R. solanacearum* som positiv kontrol og med pelletbuffer (tillæg 4) som negativ kontrol. Positive og negative kontrolplanter holdes adskilt fra de øvrige planter for at undgå krydskontaminering.

- 9.4. Testplanterne dyrkes under karantæneforhold i op til 4 uger ved 25-30 °C og høj relativ fugtighed, og de vandes i passende omfang, således at såvel overvanding som vandmangel med deraf følgende visnen undgås. For at undgå kontaminering inkuberes planter til positiv kontrol og negativ kontrol på tydeligt adskilte bænke i et drivhus eller vækstkammer, eller, hvis pladsen er begrænset, der sikres absolut adskillelse mellem behandlingerne. Hvis det er nødvendigt at inkubere planter, der anvendes til forskellige prøver, tæt sammen, adskilles de med passende afskærmning. Ved gødsning, vanding, inspektion eller anden håndtering udvises der stor omhu for at undgå krydskontaminering. Det er af afgørende betydning, at drivhuse og vækstkamre holdes fri for alle skadegørende insekter, idet sådanne kan overføre bakterien fra den ene prøve til den anden.

Der observeres for symptomer på visnen, epinasti, klorose og/eller nedsat vækst.

- 9.5. Der isoleres fra inficerede planter (afsnit II, punkt 3) og foretages identifikation af formodede renkulturer af *R. solanacearum* (afsnit VI, del B).
- 9.6. Hvis der ikke er observeret symptomer efter 3 uger, gennemføres en IF-/PCR-test/isolering af en sammensat prøve af stængelstykker på 1 cm fra hver testplante, idet stykkerne skal være taget over podningsstedet. Hvis testen er positiv, foretages fortyndingsudstrygning (afsnit IV, punkt 1).
- 9.7. Der foretages identifikation af eventuelle formodede renkulturer af *R. solanacearum* (afsnit VI, del B).

Fortolkning af resultaterne af biotesten

Biotestresultaterne er gyldige, hvis planterne til positiv kontrol udviser typiske symptomer, hvis bakterierne kan reisoleres fra disse planter, og hvis der ikke observeres symptomer på de negative kontroller.

Biotesten er negativ, hvis testplanterne ikke er inficeret med *R. solanacearum*, og forudsat at *R. solanacearum* er påvist i de positive kontrolplanter.

Biotesten er positiv, hvis testplanterne er inficeret med *R. solanacearum*.

B. IDENTIFIKATIONSTEST

Formodede renkulturer af *R. solanacearum*-isolater identificeres ved at anvende mindst to af følgende test, der bygger på forskellige biologiske principper.

Hvor det er relevant, inddrages kendte referencestammer i hver af de test, der gennemføres (jf. tillæg 3).

1. Biokemiske undersøgelser og enzymundersøgelser

Følgende fænotypiske egenskaber, som *R. solanacearum* enten har eller slet ikke har, bestemmes efter metoderne Lelliott and Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001).

Test	Forventet resultat
Fluorescerende pigmentproduktion	–
Poly- β -hydroxybutyrat-inklusioner	+
Oxidations/fermenteringstest (O/F)	O+/F–
Katalaseaktivitet	+
Kovacs oxidasetest	+
Nitratreduktion	+
Udnyttelse af citrat	+
Vækst ved 40 °C	–
Vækst i 1 % NaCl	+
Vækst i 2 % NaCl	–
Arginindihydrolase-aktivitet	–
Smeltning af gelatine	–
Hydrolyse af stivelse	–
Hydrolyse af aesculin	–
Levanproduktion	–

2. IF-test

- 2.1. Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i IF-buffer (tillæg 4).
- 2.2. Der forberedes en tofoldsfortyndingsrække af et passende antiserum (jf. webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. IF-metoden benyttes (afsnit VI, del A, punkt 5).
- 2.4. IF-testen er positiv, hvis isolatets IF-titer svarer til den positive kontrols titer.

3. ELISA-test

NB: Hvis der kun gennemføres to identifikationstest, skal der ikke anvendes andre serologiske test ud over denne metode.

- 3.1. Der forberedes en suspension af ca. 10^8 celler pr. ml i 1 x PBS (tillæg 4).
- 3.2. Der gennemføres en passende ELISA-procedure med et specifikt monoklonalt antistof mod *R. solanacearum*.
- 3.3. ELISA-testen er positiv, hvis ELISA-aflæsningen af isolatet svarer til mindst halvdelen af aflæsningsværdien for den positive kontrol.

4. PCR-test

- 4.1. Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i steriliseret vand af molekylærbiologisk kvalitet.
- 4.2. 100 µl af celled suspensionen opvarmes i lukkede rør i en varmeblok eller i kogende vandbad ved 100 °C i 4 min. Prøverne kan da opbevares ved -16 til -24 °C, indtil der er brug for dem.
- 4.3. Der anvendes relevante PCR-procedurer for at amplificere *R. solanacearum*-specifikke amplikoner (f.eks. Seal *et al.* (1993); Pastrik og Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4. Der opnås en positiv identifikation af *R. solanacearum*, hvis PCR-amplikonerne har samme størrelse og samme restriktionsfragmentlængde-polymorfisme (RFLP) som den positive kontrolstamme.

5. FISH-test

- 5.1. Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i ultrarent vand.
- 5.2. FISH-metoden benyttes (afsnit VI, del A, punkt 7), idet der anvendes mindst to *R. solanacearum*-specifikke oligo-prober (tillæg 7).
- 5.3. FISH-testen er positiv, hvis isolatet og den positive kontrol giver samme reaktioner.

6. Fedtsyreprofilering (FAP)

- 6.1. Kulturen dyrkes i 48 timer ved 28 °C på trypticasesojaagar (Oxoid).
- 6.2. Der benyttes en passende FAP-procedure (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. FAP-testen er positiv, hvis den formodede kulturs profil er identisk med den positive kontrols. Forekomst af karakteristiske fedtsyrer som 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH og 18:1 2OH og ingen forekomst af 16:0 3OH tyder med stor sandsynlighed på forekomst af en *Ralstonia*-stamme.

7. Metoder til bestemmelse af stammer

Det anbefales at anvende en af følgende metoder til bestemmelse af stammer ved hver ny isolering af *R. solanacearum*.

Hvor det er relevant, inddrages kendte referencestammer i hver af de test, der gennemføres (jf. tillæg 3).

7.1. Biovarbestemmelse

R. solanacearum opdeles i biovarer ud fra deres evne til at udnytte og/eller oxidere tre disaccharider og tre hexosealkoholer (Hayward, 1964, og Hayward *et al.*, 1990). Vækstmedier til biovar testen er beskrevet i tillæg 2. Testen kan gennemføres på vellykket vis ved at sprøjteinokulere renkulturer af *R. solanacearum*-isolater i medierne og inkubere ved 28 °C. Hvis medierne fordeles på sterile celledyrkningsplader med 96 brønde (200 µl pr. brønd), kan der observeres et farveskift fra olivengrøn til gul inden for 72 timer, hvilket viser et positivt testresultat.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Udnyttelse af:					
Maltose	-	+	+	-	+
Laktose	-	+	+	-	+
D(+)-cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Supplerende test differentierer biovar 2-underfænotyper

	Biovar 2A (Fundes i hele verden)	Biovar 2A (Fundet i Chile og Colombia)	Biovar 2T (Fundet i tropiske egne)
Udnyttelse af trehalose	-	+	+
Udnyttelse af meso-inositol	+	-	+
Udnyttelse af D-ribose	-	-	+
Pektolytisk aktivitet (¹)	Lav	Lav	Høj

(¹) Jf. Lelliott og Stead (1987).

7.2. »Fingeraftryk« af genomet

Molekylær differentiering af stammer i *R. solanacearum*-komplekset kan foretages med forskellige teknikker, herunder:

7.2.1. Restriktions-fragment-længde-polymorfisme-analyse (RFLP-analyse) (Cook *et al.*, 1989)

7.2.2. Gentagen sekvens-PCR med REP-, BOX- og ERIC-primere (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. Amplifikations-fragment-længde-polymorfisme-analyse (AFLP-analyse) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. PCR-metoder

Specifikke PCR-primere (Pastrik *et al.*, 2002; jf. tillæg 6) kan anvendes til at differentiere stammer tilhørende gruppe 1 (biovar 3, 4 og 5) og gruppe 2 (biovar 1, 2A og 2T) af *R. solanacearum*, som oprindeligt defineret ved RFLP-analyse (Cook *et al.*, 1989) og 16S rDNA-sekventering (Taghavi *et al.*, 1996).

C. KONFIRMATIV TEST

Patogenitetstesten skal gennemføres som endelig bekræftelse af en *R. solanacearum*-diagnose og til vurdering af, i hvilket omfang kulturer, der er identificeret som *R. solanacearum*, er virulente.

1) Der forberedes et inokulum på ca. 10^6 celler pr. ml fra en 24-48 dage gammel kultur af det isolat, der skal testes, og en passende positiv kontrolstamme af *R. solanacearum* (f.eks. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; jf. tillæg 3).

2) Der podes på 5-10 modtagelige tomat- eller ægplantestiklinger på bladstadium 3 (afsnit VI, del A, punkt 9).

- 3) Planterne inkuberes i op til 2 uger ved 25-28 °C og høj relativ fugtighed, og de vandes i passende omfang, således at såvel overvanding som vandmangel undgås. For rene isolater bør der indtræde karakteristisk visnen efter højst 15 dages forløb. Er der ingen symptomer efter denne periode, kan det ikke bekræftes, at kulturen er en patogen form af *R. solanacearum*.
 - 4) Der observeres for symptomer på visnen og/eller epinasti, klorose og nedsat vækst.
 - 5) Der foretages isolering fra planter med symptomer, ved at der ca. 2 cm over indpodningsstedet fjernes et stykke stængel. Der foretages findeling og suspension i en lille mængde sterilt destilleret vand eller 50 mM fosfatbuffer (tillæg 4). Der foretages isolering fra suspensionen ved udpladning eller afstrygning på et passende medie, helst et selektivt medie (tillæg 2), og der inkuberes i 48-72 timer ved 28 °C, og der observeres, om der forekommer typiske *R. solanacearum*-kolonier.
-

Tillæg 1

Laboratorier, der har deltaget i optimering og validering af protokoller

Laboratorium ⁽¹⁾	Sted	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien og Linz	Østrig
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgien
Plantedirektoratet	Lyngby	Danmark
Central Science Laboratory	York	England
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankrig
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankrig
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Tyskland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Tyskland
State Laboratory	Dublin	Irland
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italien
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italien
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nederlandene
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederlandene
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Centro Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spanien
Sveriges lantbruksuniversitet	Uppsala	Sverige

⁽¹⁾ Kontaktpersoner: se webstedet <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Tillæg 2

Medier til isolering og dyrkning af *Ralstonia solanacearum*a) **Generelle vækstmedier***Næringsagar (NA)*

Næringsagar (Difco)	23,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Gær-pepton-glucose-agar (YPGA)

Gærekstrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-glucose (monohydrat)	10,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Saccharose-pepton-agar (SPA)

Saccharose	20,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleret vand	1,0 l

pH 7,2-7,4

Ingredienserne opløses, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Kelmans tetrazolium-medie

Casaminosyrer (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 g
Bacto-agar (Difco)	15,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Der afkøles til 50 °C, og der tilsættes en filtersteriliseret opløsning af 2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma), så der opnås en slutkoncentration på 50 mg/l.

b) **Validerede selektive vækstmedier**

SMSA-medie (Englebrecht, 1994, som ændret ved Elphinstone *et al.*, 1996)

Grundmedie

Casaminosyrer (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Glycerol	5,0 ml
Bacto-agar (Difco) (jf. note 2)	15,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Der afkøles til 50 °C, og der tilsættes filtersteriliserede vandige stamopløsninger af følgende ingredienser, så de angivne slutkoncentrationer opnås:

Krystalviolet (Sigma)	5 mg/l
Polymyxin-B-sulfat	(Sigma P-1004) 600 000 U (ca. 100 mg) pr. l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (ca. 25 mg) pr. l
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (ca. 0,5 mg) pr. l
2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma)	50 mg/l

NB:

1. Anvendelse af andre reagenser end de nedenfor angivne kan have konsekvenser for *R. solanacearum*s vækst.
2. Oxoid-agar nr. 1 kan anvendes i stedet for Bacto-agar (Difco). I dette tilfælde vil *R. solanacearum* vokse langsommere, samtidig med at konkurrerende blødrådsakteriers vækst dog også vil kunne blive reduceret. Karakteristiske *R. solanacearum*-kolonier kan tage 1-2 dage længere om at dannes, og den røde farve, der fremkommer, kan være lysere og mere diffus end på Bacto-agar.
3. Ved at øge bacitracin-koncentrationen til 2 500 U pr. l vil det i visse tilfælde være muligt at reducere antallet af konkurrerende bakterier, uden at *Ralstonia solanacearum*s vækst påvirkes.

Medier og stamopløsninger af antibiotika opbevares ved 4 °C i mørke og anvendes inden for en måned.

Det sikres, at pladernes overflade er kondensfri, når de tages i brug.

Overdreven tørring af pladerne bør undgås.

Der bør foretages kvalitetskontrol efter tilberedning af hver ny batch af medie, ved at der udstryges en suspension af en *R. solanacearum*-referencekultur (jf. tillæg 3) og observeres for dannelse af karakteristiske kolonier efter inkubation ved 28 °C i 2-5 dage.

c) Validerede berigelsesmedier

SMSA-bouillon (Elphinstone et al., 1996)

Tilberedningen foregår som for det selektive SMSA-agarmedie, men Bacto-agaren og 2,3,5-tetrazoliumchloridet udelades.

Modificeret Wilbrink-bouillon (Caruso et al., 2002)

Saccharose	10 g
Proteosepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Destilleret vand	1,0 l

Der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 minutter og afkøles til 50 °C.

Stamopløsningen af antibiotika tilsættes som beskrevet for SMSA-bouillon.

Tillæg 3

A. Standardiseret kontrolmateriale, som fås i handelen

a) Bakterieisolater

Det anbefales at anvende nedenstående bakterieisolater som standardreferencemateriale, enten som positive kontroller (skema 1) eller under optimeringen af test, så krydsreaktioner undgås (skema 2). Alle stammer findes i handelen og kan købes hos:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Det Forenede Kongerige
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Nederlandene.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA — Station de phytobactériologie, Angers, Frankrig.

Skema 1: SMT-referenceliste over isolater af *R. solanacearum*

NCPBP-kode	SMT nr.	Andre koder	Oprindelsesland	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypten	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Tyrkiet	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	England	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cypern	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Sverige	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgien	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nederlandene	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Frankrig	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Spanien	2
NCPBP 4161	76	B3B	Tyskland	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasilien	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australien	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filippinerne	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kina	5

(*) Anvendes som standardreferencestamme af *R. solanacearum*, biovar 2 (race 3).

NB: Der er kun sikkerhed for ovenstående stammers ægthed, hvis de kommer fra en autentisk stammesamling.

Skema 2: SMT-referenceliste over serologisk eller genetisk beslægtede bakterier til brug ved optimering af påvisningstest.

NCPPB-kode	SMT nr.	Anden kode	Identifikation
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	Bananblodsuge-bakterie ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPPB 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Stamme, som i serologiske test (IF og/eller ELISA) vil kunne kryds reagere med polyklonale antisera.

⁽²⁾ Stamme, hvorfra PCR-produktet i visse laboratorier kan amplificeres i den størrelse, der forventes ved anvendelse af de specifikke primere OLI-1 og Y-2 (jf. tillæg 6).

⁽³⁾ Kan forventes at ville kryds reagere i de fleste test, men vides kun at forekomme på bananer i Indonesien.

b) Standardiseret kontrolmateriale, som fås i handelen

Nedenstående standardkontrolmateriale er tilgængeligt fra NCPPB-stammesamlingen.

Frysetørret kartoffelekstraktpellet fra 200 sunde kartoffelknolde som negativ kontrol i alle test.

Frysetørret kartoffelekstraktpellet fra 200 sunde kartoffelknolde indeholdende 10^3 - 10^4 og 10^4 - 10^6 celler af *R. solanacearum*, biovar 2 (stamme NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), som positive kontroller i serologiske test og PCR-test. Da frysetørring påvirker cellernes levedygtighed, egner disse sig ikke som standardkontroller ved isole-ring eller i biotest.

Formalinfikserede suspensioner af 10^6 celler pr. ml af *R. solanacearum*, biovar 2 (stamme NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), som positive kontroller i serologiske test.

B. Forberedelse af positive og negative kontroller til de principielle screeningstest PCR/IF og FISH

Der fremstilles en 48-timers kultur af en virulent race 3/biovar 2-stamme af *R. solanacearum* (f.eks. stamme NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) på SMSA-medie, og den suspenderes i 10 mM fosfatbuffer for at opnå en celletæthed på ca. 2×10^8 cfu pr. ml. Det opnås normalt ved en svagt uklar suspension, der svarer til en optisk densitet på 0,15 ved 600 nm.

Navleender udskæres fra 200 knolde af en lys sort, som vides at være fri for *R. solanacearum*.

Navleenderne behandles som sædvanlig, og pellet resuspenderes i 10 ml.

Der forberedes 10 sterile 1,5 ml eppendorfrør med 900 µl af den resuspenderede pellet.

Der overføres 100 µl af suspensionen af *R. solanacearum* til det første eppendorfrør. Eppendorfrøret vortexes.

Der laves tifoldsniveauer af kontaminering ved yderligere fortynding i de næste fem eppendorfrør.

De seks kontaminede eppendorfrør anvendes som positive kontroller. De fire ikke-kontaminede eppendorfrør anvendes som negative kontroller. Eppendorfrørene mærkes med de relevante oplysninger.

Der forberedes delprøver på 100 µl i sterile 1,5 ml eppendorfrør, hvorved man får 9 replikater af hver kontrolprøve. De opbevares ved -16 til -24 °C, indtil de skal anvendes.

Forekomst og kvantificering af *R. solanacearum* i kontrolprøverne bør først bekræftes med IF.

Med henblik på PCR-testen foretages dna-ekstraktion fra positive og negative kontrolprøver for hver testprøverække.

Ved rutinetestning med IF-test og FISH-test inkluderes der altid assays af positive og negative kontrolprøver.

Med henblik på IF-, FISH- og PCR-assays skal *R. solanacearum* mindst påvises i de positive kontroller med 10^6 og 10^4 celler pr. ml og ikke i nogen af de negative kontroller.

—

Tillæg 4

Buffere til testprocedurer

GENERELT: Uåbnede steriliserede buffere kan opbevares i op til et år.

1. Buffere til ekstraktionsprocedure**1.1. Ekstraktionsbuffer (50 mM fosfatbuffer, pH 7,0)**

Denne buffer anvendes til ekstraktion af bakterien fra plantevæv ved homogenisering eller rystning.

Na ₂ HPO ₄ (vandfri)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilleret vand	1,00 l

Ingredienserne opløses, pH-værdien kontrolleres, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Følgende supplerende komponenter kan tilsættes efter behov:

	<i>Formål</i>	<i>Mængde (pr. l)</i>
Lubrolflager	Antiflokkuleringsmiddel (*)	0,5 g
DC-siliconeantiskum	Antiskummiddel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrophosphat	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	Binding af PCR-inhibitorer	50 g

(*) Til anvendelse i forbindelse med homogeniseringsekstraktionsmetoden.

1.2. Pelletbuffer (10 mM fosfatbuffer, pH 7,2)

Denne buffer benyttes til resuspension og fortynding af ekstrakter af kerner af navleenden fra kartoffelknolde efter opkoncentrering til en pellet ved centrifugering.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, pH-værdien kontrolleres, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

2. Buffere til IF-testen**2.1. IF-buffer (10 mM fosfatbufferet saltopløsning (PBS), pH 7,2)**

Denne buffer benyttes til fortynding af antistoffer.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, pH-værdien kontrolleres, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

2.2. IF-buffer-Tween

Denne buffer benyttes til skylning af objektglas.

Der tilsættes 0,1 % Tween 20 til IF-buffere.

2.3. Glycerol med fosfatbuffer, pH 7,6

Denne buffer benyttes som indlejningsmiddel på vinduerne i IF-objektglassene for at intensivere fluorescensen.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destilleret vand	100 ml

Der fås indlejningsopløsninger, der modvirker falmning, i handelen, f.eks. Vectashield® (Vektor Laboratories) eller Citifluor® (Leica).

3. **Buffere til den indirekte ELISA-test**

3.1. Coatingbuffer af dobbelt styrke, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilleret vand	1,00 l

Ingredienserne opløses, pH-værdien kontrolleres, og der steriliseres ved autoklavering ved 121 °C i 15 min.

Der kan om nødvendigt tilsættes natriumsulfit (0,2 %) som antioxidant for at forhindre udvikling af oxiderede aromatiske forbindelser.

3.2. 10 x saltvand med fosfatbuffer (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29,0 g
KCl	2,0 g
Destilleret vand	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10 x PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilleret vand	895 ml

3.4. Blokerende (antistof) buffer (skal være frisklavet)

10 x PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mælkepulver	0,5 g
Destilleret vand	der fyldes op til 100 ml

3.5. Alkalisk phosphatasesubstratopløsning, pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilleret vand	800 ml

Der blandes og justeres til pH 9,8 med koncentreret HCl.

Der fyldes op til 1 l med destilleret vand.

Der tilsættes 0,2 g MgCl₂.

2 phosphatasesubstrattabletter (5 mg) (Sigma) opløses pr. 15 ml opløsning.

4. **Buffere til DASI ELISA-test**

4.1. Coatingbuffer, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Destilleret vand	1 000 ml

Ingredienserne opløses, og det kontrolleres, at pH-værdien er 9,6.

4.2. 10 x fosfatbufferet saltopløsning (PBS), pH 7,2-7,4

NaCl	80,0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	27,0 g
Destilleret vand	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10 x PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilleret vand	950 ml

4.4. Substratbuffer, pH 9,8

Diethanolamin	100 ml
Destilleret vand	900 ml

Der blandes og justeres til pH 9,8 med koncentreret HCl.

Tillæg 5

Bestemmelse af cellekoncentration i IF- og FISH-testen

1. Optælling: middelantallet af typisk fluorescerende celler pr. synsfelt (c).
2. Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. objektglasvindue (C).

$$C = c \times S/s$$

hvor S = overfladearealet af vindue på multispot-objektglas

og s = synsfeltets overfladeareal

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{hvor} \quad i = \text{synsfeltkoefficienten (afhænger af okularstype og varierer fra 8 til 24)}$$

K = rørkoefficienten (1 eller 1,25)

G = objektivets forstørrelse (100 ×, 40 × etc.).

3. Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. ml resuspenderet pellet (N).

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

hvor y = den resuspenderede pellets volumen på hvert vindue

og F = den resuspenderede pellets fortyndingsfaktor.

Tillæg 6

Validerede PCR-protokoller og -reagenser

NB: Indledende test med denne metode skulle muliggøre reproducerbar påvisning af 10^3 - 10^4 celler af *R. solanacearum* pr. ml prøveekstrakt.

Indledende test bør endvidere ikke give falsk positive resultater med et udvalg af forskellige bakteriestammer (jf. tillæg 3).

1. PCR-protokol efter Seal *et al.* (1993)

1.1. Oligonukleotidprimere

Forward primer OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Reverse primer Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

Forventet amplikonstørrelse fra *R. solanacearum*-dna-template = 288 bp.

1.2. PCR-mastermix

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slut-koncentration
Sterilt ultrarent vand	17,65 µl	
10x PCR-buffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-blanding (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Prøvevolumen	2,0 µl	
Volumen i alt	25 µl	

⁽¹⁾ Metode valideret ved anvendelse af Taq-polymerase fra Perkin Elmer (AmpliTaq) og Gibco BRL.

1.3. PCR-reaktionsbetingelser

Følgende program køres:

- 1 cyklus på i) 2 min. ved 96 °C (denaturering af dna-template)
- 35 cykler på ii) 20 sek. ved 94 °C (denaturering af dna-template)
- iii) 20 sek. ved 68 °C (annealing af primere)
- iv) 30 sekunder ved 72 °C (forlængelse af kopi)
- 1 cyklus på v) 10 min. ved 72 °C (yderligere forlængelse)
- vi) henstand ved 4 °C.

NB: Dette program er optimeret til anvendelse med en Perkin Elmer 9600-thermocycler. Det kan være nødvendigt at ændre varigheden af cyklerne ii), iii) og iv) ved anvendelse af andre modeller.

1.4. Restriktionszymanalyse af amplikon

PCR-produkter, der er amplificeret fra *R. solanacearum*-dna, giver en karakteristisk restriktionsfragmentlængdepolymerfisme med enzym Ava II efter inkubation ved 37 °C.

2. PCR-protokol efter Pastrik og Maiss (2000)

2.1. Oligonukleotidprimere

Forward primer Ps-1 5'- agt cga acg gca gcg ggg g -3'

Reverse primer Ps-2 5'- ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca -3'

Forventet amplikonstørrelse fra *R. solanacearum*-dna-template = 553 bp.

2.2. PCR-mastermix

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slutkoncentration
Sterilt ultrarent vand	16,025 µl	
10x PCR-buffer (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-blanding (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Prøvevolumen	5,0 µl	
Volumen i alt	25,0 µl	

(1) Metode valideret ved anvendelse af Taq-polymerase fra Perkin Elmer (AmpliTaq) og Gibco BRL.

NB: Oprindeligt optimeret for MJ Research PTC 200-thermocycler med Taq-polymerase fra Gibco.

Også Perkin Elmer AmpliTaq og buffer kan anvendes i samme koncentrationer.

2.3. PCR-reaktionsbetingelser

Følgende program køres:

- 1 cyklus på i) 5 min. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
- 35 cykler på ii) 30 sek. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
- iii) 30 sek. ved 68 °C (annealing af primere)
- iv) 45 sekunder ved 72 °C (forlængelse af kopi)
- 1 cyklus på v) 5 min. ved 72 °C (yderligere forlængelse)
- vi) henstand ved 4 °C.

NB: Dette program er optimeret til anvendelse med en MJ Research PTC 200-thermocycler. Det kan være nødvendigt at ændre varigheden af cyklerne ii), iii) og iv) ved anvendelse af andre modeller.

2.4. Restriktionszymanalyse af amplikon

PCR-produkter, der er amplificeret fra *R. solanacearum*-dna, giver en karakteristisk restriktionsfragmentlængdepolymorfisme med enzym Taq I efter inkubation ved 65 °C i 30 min. Størrelsen på restriktionsfragmenterne fra det *R. solanacearum*-specifikke fragment er 457 bp og 96 bp.

3. Multiplex-PCR-protokol med intern PCR-kontrol (Pastrik *et al.*, 2002)

3.1. Oligonukleotidprimere

Forward primer RS-1-F 5'- ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA -3'

Reverse primer RS-1-R 5'- CCC AGT CAC GGC AGA GAC T -3'

Forward primer NS-5-F 5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G -3'

Reverse primer NS-6-R 5'- GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC -3'

Forventet amplikonstørrelse fra *R. solanacearum*-dna-template = 718 bp (RS-primersæt)

Forventet amplikonstørrelse fra den interne PCR-kontrol (18S rRNA) = 310 bp (NS-primersæt).

3.2. PCR-mastermix

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slutkoncentration
Sterilt ultrarent vand	12,625 µl	
10x PCR-buffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-blanding (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Prøvevolumen	5,0 µl	
Volumen i alt	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metode valideret ved anvendelse af Taq-polymerase fra Perkin Elmer (AmpliTaq) og Gibco BRL.

⁽²⁾ Koncentrationen af primerne NS-5 F og NS-6-R blev optimeret til ekstraktion af kerner af navleenden fra kartofler ved anvendelse af homogeniseringsmetode og dna-oprensning i overensstemmelse med Pastrik (2000) (jf. afsnit VI, del A, punkt 6.1.a)). Det er nødvendigt med reoptimering af reagenskoncentrationer, hvis der benyttes ekstraktion ved rystning eller andre dna-isoleringsmetoder.

3.3. PCR-reaktionsbetingelser

Følgende program køres:

- 1 cyklus på i) 5 min. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
- 35 cykler på ii) 30 sek. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
- iii) 30 sek. ved 58 °C (annealing af primere)
- iv) 45 sekunder ved 72 °C (forlængelse af kopi)
- 1 cyklus på v) 5 min. ved 72 °C (yderligere forlængelse)
- vi) henstand ved 4 °C.

NB: Dette program er optimeret til anvendelse med en MJ Research PTC 200-thermocycler. Det kan være nødvendigt at ændre varigheden af cyklerne ii), iii) og iv) ved anvendelse af andre modeller.

3.4. Restriktionsenzymanalyse af amplikon

PCR-produkter, der er amplificeret fra *R. solanacearum*-dna, giver en karakteristisk restriktionsfragmentlængde-polymorfisme med enzym Bsm I eller en Isoschizomere (f.eks. Mva 1269 I) efter inkubation ved 65 °C i 30 min.

4. *R. solanacearum*-biovar-specifik PCR-protokol (Pastrik *et al.*, 2001)

4.1. Oligonukleotidprimere

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

Forventet amplikonstørrelse fra *R. solanacearum*-dna-template:

med RS-1-F/RS-1-R = 718 bp

med RS-1-F/RS-3-R = 716 bp.

4.2. PCR-mastermix

a) Biovar 1/2-specifik PCR

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slutkoncentration
Sterilt ultrarent vand	12,925 µl	
10x PCR-buffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-blanding (20 mM)	0,125 µl	0,1 Mm
Primer RS-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Prøvevolumen	5,0 µl	
Volumen i alt	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metode valideret ved anvendelse af Taq-polymerase fra Perkin Elmer (AmpliTaq) og Gibco BRL.

b) Biovar 3/4/5-specifik PCR

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slutkoncentration
Sterilt ultrarent vand	14,925 µl	
10x PCR-buffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-blanding (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
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Prøvevolumen	5,0 µl	
Volumen i alt	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metode valideret ved anvendelse af Taq-polymerase fra Perkin Elmer (AmpliTaq) og Gibco BRL.

4.3. PCR-reaktionsbetingelser

Følgende program køres for både biovar 1/2- og biovar 3/4/5-specifikke reaktioner:

- | | | |
|--------------|------|--|
| 1 cyklus på | i) | 5 min. ved 95 °C (denaturering af dna-template) |
| 35 cykler på | ii) | 30 sek. ved 95 °C (denaturering af dna-template) |
| | iii) | 30 sek. ved 58 °C (annealing af primere) |
| | iv) | 45 sekunder ved 72 °C (forlængelse af kopi) |
| 1 cyklus på | v) | 5 min. ved 72 °C (yderligere forlængelse) |
| | vi) | henstand ved 4 °C. |

NB: Dette program er optimeret til anvendelse med en MJ Research PTC 200-thermocycler. Det kan være nødvendigt at ændre varigheden af cyklerne ii), iii) og iv) ved anvendelse af andre modeller.

4.4. Restriktionszymanalyse af ampikon

PCR-produkter, der er amplificeret fra *R. solanacearum*-dna ved anvendelse af primerne RS-1-F og RS-1-R, giver en karakteristisk restriktionsfragmentlængde-polymorfisme med enzym Bsm I eller en Isoschizomere (f.eks. Mva 1269 I) efter inkubation ved 65 °C i 30 min. PCR-produkter, der er amplificeret fra *R. solanacearum*-dna ved anvendelse af primerne RS-1-F og RS-3-R, har ingen restriktionssteder.

5. Fremstilling af loadingbuffer**5.1. Bromphenolblå (10 % *stamopløsning*)**

Bromphenolblå	5 g
Destilleret vand (dobbeltdestilleret)	50 ml

5.2. Loadingbuffer

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Bromphenolblå (5.1)	300 µl
Destilleret vand (dobbeltdestilleret)	6,2 ml

6. 10x tris-acetat-EDTA-buffer (TAE-buffer), pH 8,0

Tris-buffer	48,40 g
Iseddikesyre	11,42 ml
EDTA (dinatriumsalt)	3,72 g
Destilleret vand	1,00 l

Fortyndes til 1x inden brug.

Fås også i handelen (f.eks. Invitrogen eller tilsvarende).

Tillæg 7

Validerede reagenser til FISH-test

1. Oligo-prober

R. solanacearum-specifik probe OLI-1-CY3 5'- GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Ikke-specifik eubakteriel probe EUB-338-FITC 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

2. Fikseringsopløsning

[ADVARSEL! FIKSERINGSOPLØSNINGEN INDEHOLDER PARAFORMALDEHYD, SOM ER TOKSISK. BÆR HANDSKER, OG UNDGÅ AT INDÅNDE PRODUKTET. DET TILRÅDES AT ARBEJDE I STINKSKAB!]

- i) 9 ml vand af molekylærbiologisk kvalitet (f.eks. ultrarent vand (UPW)) opvarmes til ca. 60 °C, og der tilsættes 0,4 g paraformaldehyd. Paraformaldehyd opløses efter tilsætning af 5 dråber 1N NaOH og omrøring med en magnetomrører.
- ii) pH-værdien justeres til 7,0 ved at tilsætte 1 ml 0,1 M fosfatbuffer (pH 7,0) og 5 dråber 1 N HCl. pH-værdien kontrolleres med indikatorpapir og justeres om nødvendigt med HCl eller NaOH. [ADVARSEL! DER MÅ IKKE BENYTTES PH-METER I OPLØSNINGER MED PARAFORMALDEHYD.]
- iii) Opløsningen filtreres gennem et 0,22 µm membranfilter og holdes støvfri ved 4 °C, indtil den skal anvendes igen.

3. 3x hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtersteriliseret og autoklaveret)	15 mM

Fortyndes ved brug til 1x.

4. Hybridiseringsopløsning

1x hybmix

Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %,
Probe EUB 338	5 ng/µl
Probe OLI-1 eller OLI-2	5 ng/µl

Der forberedes hybridiseringsopløsning i mængder, der er i overensstemmelse med beregningerne i skema 1. For hvert objektglas (med 2 forskellige prøver i duplikat) skal der bruges 90 µl hybridiseringsopløsning. VIGTIGT: FORMAMID ER YDERST TOKSISK, SÅ BRUG HANDSKER, OG TRÆF ALLE NØDVENDIGE SIKKERHEDSFORANSTALTNINGER!

Skema: Foreslåede mængder til forberedelse af hybridiseringsblanding

Antal objektglas	1	4	6	8	10
Sterilt ultrarent vand	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Probe OLI-1 eller OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Volumen i alt (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Alle opløsninger, der indeholder lysfølsomme oligo-prober, skal opbevares mørkt ved - 20 °C. De skal beskyttes mod direkte sollys og elektrisk lys under brug.

5. 0,1 M fosfatbuffer, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilleret vand	1,00 l

Ingredienserne opløses, pH-værdien kontrolleres, og der steriliseres ved autoklaving ved 121 °C i 15 min.

Tillæg 8

Dyrkning af tomat- og ægplanter

Frø af tomatplante (*Lycopersicon esculentum*) eller ægplante (*Solanum melongena*) sås i pasteuriseret dyrkningskompost. Stiklingerne udplantes, når kimbladene er helt udfoldet (10 til 14 dage), i pasteuriseret vækstkompost.

Ægplanterne/tomaterne bør dyrkes i drivhus under følgende vækstbetingelser forud for podningen:

Daglængde:	14 timer eller den naturlige daglængde, hvis denne er på mere end 14 timer
Temperatur:	om dagen: 21-24 °C om natten: 14-18 °C
Modtagelig tomatplantesort:	»Moneymaker«
Modtagelig ægplantesort:	»Black Beauty«
Leverandører:	se webstedet http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

LITTERATURHENVISNINGER

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas 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. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. 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 [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
 24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
 25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
 26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
 27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. 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 Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigallet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
 29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative 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.
-

BILAG III

1. I ethvert tilfælde af mistanke om forekomst, hvor screening efter de relevante metoder i bilag II for det nævnte plantemateriale vedkommende og i alle andre tilfælde har givet positivt resultat, og der afventes bekræftelse eller afkræftelse efter gennemførelsen af de nævnte metoder, tilbageholdes nedennævnte og opbevares hensigtsmæssigt:

- alle knolde og så vidt muligt alle planter, der er taget prøver fra
- eventuelt resterende ekstrakt og andet materiale forberedt til screening, f.eks. objektglas til immunofluorescens
- al relevant dokumentation

indtil nævnte metoder er gennemført.

Tilbageholdelse af knoldene gør det muligt at foretage sortsafprøvning, hvis det er relevant.

2. Ved bekræftelse af skadegørers tilstedeværelse tilbageholdes nedennævnte og opbevares hensigtsmæssigt:

- det i punkt 1 nævnte materiale
- hvor relevant en prøve af det inficerede tomat- eller ægplantemateriale, som blev podet med knold- eller planteekstraktet
- den isolerede skadegørerkultur

i mindst en måned efter den i artikel 5, stk. 2, omhandlede meddelelsesprocedure.

BILAG IV

Elementerne i forbindelse med den undersøgelse, der omhandles i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. i), skal omfatte:

i) produktionssteder:

- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler, der er klonbeslægtede med kartofler, som er fundet kontamineret med skadegøreren
- hvor der bliver eller har været dyrket tomater, der kommer fra samme kilde som tomater, der er fundet kontamineret med skadegøreren
- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler eller tomater, som har været sat under officielt tilsyn på grund af mistanke om skadegørers forekomst
- hvor der bliver eller har været dyrket kartofler, der er klonbeslægtede med kartofler, som er blevet dyrket på produktionssteder, der er fundet kontamineret med skadegøreren
- hvor der er kartofler eller tomater i vækst, der befinder sig i nærheden af kontaminede produktionssteder, herunder produktionssteder, som direkte eller via en maskinstation deler produktionsudstyr og -anlæg
- hvor der benyttes overfladevand til vanding eller sprøjtning fra kilder, for hvilke der enten foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at de er kontamineret med skadegøreren
- hvor der benyttes overfladevand til vanding eller sprøjtning fra kilder, der bruges i fællesskab med produktionssteder, for hvilke der enten foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at de er kontamineret med skadegøreren
- som er eller har været oversvømmet med overfladevand, for hvilket der foreligger en bekræftelse af eller en mistanke om, at det er kontamineret med skadegøreren

og

ii) overfladevand, der benyttes til vanding eller sprøjtning af, eller som har oversvømmet marker eller produktionssteder, for hvilke der foreligger en bekræftelse af, at de er kontamineret med skadegøreren.

—

BILAG V

1. Ved bestemmelsen af den sandsynlige kontaminerings omfang, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), og artikel 5, stk. 1, litra c), nr. iii), skal følgende tages i betragtning:
 - det nævnte plantemateriale, som dyrkes på et produktionssted, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)
 - produktionssteder med en produktionsforbindelse til det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), herunder produktions- eller oplagringssteder, som direkte eller via en maskinstation deler produktionsudstyr og -anlæg
 - det nævnte plantemateriale, som produceres på de produktionssteder, der omhandles i det foregående led, eller som befandt sig på sådanne produktionssteder i den periode, hvor det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), var på de produktionssteder, der omhandles i første led
 - foretagender, som håndterer det nævnte plantemateriale fra de i de foregående led omhandlede produktionssteder
 - maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder heraf og alle andre genstande, herunder emballage, der kan have været i kontakt med det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)
 - det nævnte plantemateriale, der opbevares i eller er i kontakt med noget af det i det foregående led omhandlede, inden dette er blevet rengjort og desinficeret
 - som resultat af undersøgelse og test, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. i), for kartoflers vedkommende knolde eller planter med klonslægtsskab på søster- eller forældreniveau og for tomaters vedkommende planter med samme kilde som det nævnte plantemateriale, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), og for hvilke det, selv om de er undersøgt for skadegøreren og fundet negative, alligevel ser ud til, at kontaminering er sandsynlig via en klonforbindelse. Der kan foretages sortsafprøvning for at verificere de kontaminede og klonslægtede knolde eller planters identitet
 - produktionssteder med det nævnte plantemateriale, der omhandles i det foregående led
 - produktionssteder med det nævnte plantemateriale, som benytter vand til vanding eller sprøjtning, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii)
 - det nævnte plantemateriale, som er produceret på marker, der er oversvømmet med overfladevand, for hvilket der foreligger en bekræftelse af, at det er kontamineret.
2. Ved bestemmelsen af mulig spredning, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), og artikel 5, stk. 1, litra c), nr. iii), skal følgende tages i betragtning:
 - i) for tilfælde som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv):
 - afstanden til andre produktionssteder, der dyrker det nævnte plantemateriale
 - fælles produktion og anvendelse af læggekartoffelmateriale
 - produktionssteder, som benytter overfladevand til vanding eller sprøjtning af det nævnte plantemateriale, i tilfælde, hvor der er eller har været risiko for overfladevandsafstrømning fra eller oversvømmelse af produktionssteder, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii)

- ii) for tilfælde, hvor overfladevand er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii):
 - produktionssteder, som producerer det nævnte plantemateriale og støder op til eller risikerer at blive oversvømmet af overfladevand, der er erklæret kontamineret
 - eventuelt særskilt vandingsbassin, som har tilknytning til overfladevand, der er erklæret kontamineret
 - vandområder, som har tilknytning til overfladevand, der er erklæret kontamineret, under hensyntagen til:
 - strømningsretningen og -hastigheden for det vand, der er erklæret kontamineret
 - forekomst af vilde værtsplanter af natskyggefamilien.

3. Følgende gælder for den meddelelse, der er omhandlet i artikel 5, stk. 2, første afsnit:

- Umiddelbart efter at forekomsten af skadegøreren er blevet bekræftet ved laboratorieundersøgelse ved anvendelse af metoder omhandlet i bilag II, meddeles mindst følgende:
 - for kartofler:
 - a) sortsnavnet på partiet
 - b) typen (spisekartofler, læggekartofler osv.) og, hvis det er relevant, læggekartoffelkategorien
 - for tomatplanter: sortsnavnet på partiet og, hvis det er relevant, tomatkategorien.
- Uden at det berører kravene vedrørende meddelelse af mistanke om forekomst i artikel 4, stk. 3, skal den medlemsstat, hvori det mistænkte tilfælde er blevet bekræftet, hvor der er risiko for kontaminering af det nævnte plantemateriale fra eller til andre medlemsstater, straks meddele vedkommende medlemsstat(er) de oplysninger, der er nødvendige for at efterkomme artikel 5, stk. 3, herunder:
 - a) sortsnavnet på kartoffel- eller tomatpartiet
 - b) afsenders og modtagers navn og adresse
 - c) kartoffel- eller tomatpartiets leveringsdato
 - d) det leverede kartoffel- eller tomatpartis størrelse
 - e) en kopi af plantepasset eller i det mindste plantepasnummeret, hvis det er relevant, eller, hvis det er relevant, producentens eller handelsforetagendets registreringsnummer og en kopi af følgesedlen.

Kommissionen skal øjeblikkelig underrettes om meddelelse af sådanne oplysninger.

4. Følgende gælder for oplysningerne i den supplerende meddelelse, der er omhandlet i artikel 5, stk. 2, andet afsnit:

Når alle undersøgelser er afsluttet, meddeles for hvert enkelt tilfælde:

- a) dato for bekræftelse af kontaminering
- b) en kort beskrivelse af den undersøgelse, der er foretaget for at identificere kilden og kontamineringens mulige udbredelse, herunder angivelse af omfanget af prøveudtagninger
- c) oplysninger om den/de identificerede eller formodede kontamineringskilde(r)
- d) nærmere oplysninger om omfanget af den erklærede kontaminering, herunder antal produktionssteder og for kartofler antal partier med oplysning om sort og, hvis det drejer sig om læggekartofler, kategori

- e) nærmere oplysninger om zoneafgrænsningen, herunder antallet af produktionssteder, der ikke er erklæret kontamineret, men som hører under zonen
 - f) nærmere oplysninger vedrørende erklæringen om kontaminering af vand, herunder det pågældende vandområdes navn og beliggenhed samt rækkevidden af erklæringen/vandingsforbuddet
 - g) for tomatplantesendinger eller -partier, der er erklæret kontamineret, de certifikater, der foreskrives i artikel 13, stk. 1, nr. ii), i direktiv 2000/29/EF, samt plantepasnummer i henhold til del A, afsnit I, punkt 2.2, i bilag V til direktiv 2000/29/EF
 - h) andre oplysninger om de(n) bekræftede forekomst(er), som Kommissionen måtte ønske.
-

BILAG VI

1. I medfør af bestemmelserne i artikel 6, stk. 1, træffes følgende foranstaltninger:

- anvendelse til foder efter en varmebehandling, som sikrer, at der ikke er nogen risiko for, at skadegøreren overlever,

eller
- bortskaffelse på et sted, der er officielt godkendt til bortskaffelse af affald, og hvor der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes til miljøet, f.eks. via udsivning til landbrugsjord eller kontakt med vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord,

eller
- forbrænding

eller
- industriel forarbejdning ved direkte, øjeblikkelig levering til et forarbejdningsanlæg med officielt godkendte faciliteter til bortskaffelse af affald, for hvilke det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og med faciliteter til rengøring og desinficering af mindst de afgående køretøjer,

eller
- andre foranstaltninger, forudsat at det er blevet fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes; disse foranstaltninger og begrundelsen herfor skal meddeles Kommissionen og de øvrige medlemsstater.

Eventuelt resterende affald, der er forbundet med og dannet i forbindelse med ovenstående processer, bortskaffes efter officielt godkendte metoder i overensstemmelse med bilag VII til dette direktiv.

2. Den korrekte brug eller bortskaffelse af det nævnte plantemateriale, jf. artikel 6, stk. 2, under tilsyn af de(n) pågældende medlemsstat(er)s officielle ansvarlige organer og med passende kommunikation mellem de officielle ansvarlige organer for at sikre sådant tilsyn på ethvert tidspunkt og godkendelse fra det officielle ansvarlige organ i den medlemsstat, hvor kartoflerne skal pakkes eller forarbejdes, for så vidt angår de i første og andet led omhandlede faciliteter til bortskaffelse af affald, er følgende:

i) for kartoffelknolde:

- anvendelse som spisekartofler, færdigpakket til direkte levering og anvendelse uden ompakning, på et anlæg med passende faciliteter til bortskaffelse af affald. Kartofler til udplantning må kun håndteres på det samme anlæg, hvis det sker separat eller efter rengøring og desinficering,

eller
- anvendelse som industrikartofler og bestemt til direkte og øjeblikkelig levering til en forarbejdningsvirksomhed med hensigtsmæssige faciliteter til bortskaffelse af affald og med faciliteter til rengøring og desinficering af mindst de afgående køretøjer,

eller
- anden anvendelse eller bortskaffelse, såfremt det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og forudsat at de nævnte officielle ansvarlige organer giver deres godkendelse

ii) for andre plantedele, herunder stykker af stængel og blade:

- destruktion,

eller
- anden brug eller bortskaffelse, såfremt det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og forudsat at de nævnte officielle ansvarlige organer giver deres godkendelse.

3. De egnede metoder til dekontaminering af de genstande, der omhandles i artikel 6, stk. 3, er rengøring og hvor relevant desinficering, således at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og metoderne skal følges under tilsyn af medlemsstaternes officielle ansvarlige organer.
4. Den række foranstaltninger, der skal gennemføres af medlemsstaterne i afgrænsede zoner som fastsat i artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv), og litra c), nr. iii), og omhandlet i artikel 6, stk. 4, omfatter:
 - 4.1. I tilfælde, hvor produktionssteder er erklæret kontaminerede efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii):
 - a) i en mark eller enhed med beskyttet planteproduktion, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), gælder følgende:
 - i) i mindst fire vækstår efter erklæringen om kontaminering
 - skal der træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger af kartofler og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien,
 - og
 - må der ikke udplantes følgende:
 - kartoffelknolde, kartoffelplanter eller egentlige læggekartofler
 - tomatplanter og -frø
 - under hensyntagen til skadegøreren's biologi:
 - andre værtsplanter
 - planter af slægten *Brassica*, for hvilke der er en påvist risiko for, at skadegøreren kan overleve
 - afgrøder, for hvilke der er en åbenbar risiko for, at skadegøreren kan spredes
 - i den første kartoffel- eller tomatdyrknings sæson efter den i foregående led nævnte periode, dog på betingelse af, at marken ved officielle kontrolbesøg er fundet fri for gengroninger af kartofler og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter, herunder ukrudt af natskyggefamilien, i mindst to på hinanden følgende vækstår forud for udplantning
 - må der for kartoflers vedkommende kun produceres spise-, foder- og industrikartofler
 - skal der for såvel kartoflers som tomaters vedkommende foretages en test af høstede kartoffelknolde eller tomatplanter efter den i bilag II nærmere beskrevne procedure
 - skal der i den kartoffel- eller tomatdyrknings sæson, der følger efter den i foregående led omhandlede, og efter et passende sædskifte, som skal være på mindst to år, hvis der skal dyrkes læggekartofler, foretages en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1,
 - eller
 - ii) i de fem vækstår, der følger efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om kontaminering
 - skal der træffes foranstaltninger til at eliminere gengroninger af kartofler og selvsåede tomatplanter eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien,
 - og
 - skal marken i de første tre år etableres og holdes enten som helbrak eller med korn, alt efter den påviste risiko, eller vedvarende græs med hyppige, dybe slæt eller intensiv græsning eller som græs til frøavl efterfulgt af udplantning i de to følgende år med ikke-værtsplanter for skadegøreren, for hvilke der ikke er nogen påvist risiko for, at skadegøreren kan overleve eller spredes

- i den første kartoffel- eller tomatdyrknings sæson efter den i foregående led nævnte periode, dog på betingelse af, at marken ved officielle kontrolbesøg er fundet fri for gengroninger af kartofler og selvsåede tomatplanter eller andre værtsplanter, herunder ukrudt af natskyggefamilien, i mindst to på hinanden følgende vækstår forud for udplantning
 - er det for kartoflers vedkommende tilladt at producere læggekartofler og andre kartofler
 - skal der foretages en test af høstede kartoffelknolde eller tomatplanter efter den i bilag II nærmere beskrevne procedure
- b) i alle andre marker på det kontaminerede produktionssted gælder følgende, forudsat at de officielle ansvarlige organer har forvisset sig om, at risikoen for gengroninger af kartofler og selvsåede tomatplanter eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, herunder ukrudt af natskyggefamilien, er fjernet:
 - i det første vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om kontaminering
 - må der enten ikke plantes kartoffelknolde, kartoffelplanter eller egentlige læggekartofler eller andre værtsplanter for skadegøreren,

eller
 - må der for kartoffelknoldes vedkommende kun lægges certificerede læggekartofler til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler
 - må der for tomatplanters vedkommende kun udplantes tomatplanter avlet af frø, der opfylder kravene i direktiv 2000/29/EF, til produktion af tomater
 - i det andet vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om kontaminering
 - må der for kartoflers vedkommende kun lægges certificerede læggekartofler eller læggekartofler, der er officielt testet for brunbakteriose og er dyrket under officielt tilsyn på andre produktionssteder end dem, der er omhandlet i punkt 4.1, til produktion af læggekartofler eller andre kartofler
 - må der for tomaters vedkommende kun udplantes tomatplanter avlet af frø, der opfylder kravene i direktiv 2000/29/EF, eller, hvis de er vegetativt formeret, af tomatplanter avlet af sådanne frø under officielt tilsyn på andre produktionssteder end dem, der er omhandlet i punkt 4.1, til produktion af tomatplanter eller tomater
 - i mindst det tredje vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om kontaminering
 - må der for kartoflers vedkommende kun lægges certificerede læggekartofler eller læggekartofler, der er avlet af certificerede læggekartofler under officielt tilsyn, til produktion af læggekartofler eller andre kartofler
 - må der for tomaters vedkommende kun udplantes tomatplanter avlet af frø, der opfylder kravene i direktiv 2000/29/EF, eller tomatplanter avlet af sådanne planter under officielt tilsyn til produktion af tomatplanter eller tomater
 - i hvert af de i de foregående led nævnte vækstår skal der træffes foranstaltninger til at eliminere eventuelle gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, der skal på passende tidspunkter foretages en officiel undersøgelse af bestanden, og i alle kartoffelmarker skal de høstede kartofler underkastes officielle undersøgelser efter den i bilag II nærmere beskrevne procedure
- c) straks efter erklæringen om kontaminering efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), og efter det førstfølgende vækstår:
 - skal alle maskiner og lagerfaciliteter på produktionsstedet, der indgår i kartoffel- eller tomatavl, rengøres og, hvor relevant, desinficeres efter passende metoder som beskrevet i punkt 3
 - skal der indføres offentlig kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder eventuelt forbud mod vanding og sprøjtning, for at hindre, at skadegøreren spredes

d) i en enhed med beskyttet planteproduktion, der er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. ii), hvor det er muligt at udskifte vækstmediet fuldstændigt:

- må der ikke udplantes kartoffelknolde, kartoffelplanter eller egentlige læggekartofler eller andre værtsplanter for skadegøreren, herunder tomatplanter og -frø, medmindre produktionsenheden har været underkastet foranstaltninger under officielt tilsyn til at eliminere skadegøreren og fjerne alt værtsplantemateriale, herunder i det mindste en fuldstændig udskiftning af vækstmedium samt rengøring og, hvor relevant, desinficering af nævnte enhed og alt udstyr, således at enheden derefter fra de officielle ansvarlige organer har fået godkendelse til at procedure kartofler eller tomater,

og

- skal denne produktion for kartoffelavl vedkommende være fra certificerede læggekartofler eller fra miniknolde eller mikroplanter hidrørende fra testet materiale
- skal denne produktion for tomatavl vedkommende være fra frø, der opfylder kravene i direktiv 2000/29/EF, eller, hvis de er vegetativt formeret, fra tomatplanter avlet af sådanne frø under officielt tilsyn
- skal der indføres offentlig kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder eventuelt forbud mod vanding og sprøjtning, for at hindre, at skadegøreren spredes.

4.2. Uden at det berører foranstaltningerne i punkt 4.1, skal medlemsstaterne i en afgrænset zone:

a) straks efter erklæringen om kontaminering sikre, at alle maskiner og lagerfaciliteter på sådanne steder, der indgår i kartoffel- eller tomatavl, rengøres og desinficeres i det nødvendige omfang efter passende metoder som beskrevet i punkt 3

b) straks og i mindst tre vækstår efter erklæringen om kontaminering:

ba) i tilfælde, hvor den afgrænsede zone er bestemt efter artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iv):

- drage omsorg for, at deres officielle ansvarlige organer fører tilsyn med foretagender, der dyrker, opbevarer eller håndterer kartoffelknolde eller tomater, såvel som med foretagender, der arbejder med maskiner til kartoffel- eller tomatavl som maskinstation
- kræve, at der kun udplantes certificerede læggekartofler eller læggekartofler dyrket under officielt tilsyn til al kartoffeldyrkning i zonen, og at læggekartoffelafgrøden, der er dyrket på produktionssteder, der er erklæret sandsynligvis kontamineret i henhold til artikel 5, stk. 1, litra a), nr. iii), testes efter høsten
- kræve, at alle høstede læggekartofler håndteres særskilt fra andre kartofler overalt i zonen, eller at der gennemføres rengøring og, hvor relevant, desinficering mellem håndtering af læggekartofler og håndtering af andre kartofler
- kræve, at der kun udplantes tomatplanter avlet af frø, der opfylder kravene i direktiv 2000/29/EF, eller, hvis de er vegetativt formeret, af tomatplanter avlet af sådanne frø under officielt tilsyn, til al tomatdyrkning i zonen
- foretage en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1

bb) i tilfælde, hvor overfladevand er erklæret kontamineret efter artikel 5, stk. 1, litra c), nr. ii), eller indgår i de elementer, der giver mulighed for spredning af skadegøreren efter bilag V, punkt 2:

- foretage en årlig undersøgelse på passende tidspunkter, herunder prøvetagning af overfladevand og, hvor relevant, passende værtsplanter af natskygefamilien i de pågældende vandkilder samt test efter de relevante metoder i bilag II for det nævnte plantemateriale vedkommende og i alle andre tilfælde

- indføre offentlig kontrol med vandings- og sprøjteprogrammer, herunder forbud mod benyttelse af vand, der er erklæret kontamineret, til vanding eller sprøjtning af det nævnte plantemateriale og, hvor relevant, andre værtsplanter, for at hindre, at skadegøreren spredes. Et sådant forbud kan tages op til fornyet overvejelse på grundlag af resultaterne af ovennævnte årlige undersøgelse, ligesom erklæringer om kontaminering kan trækkes tilbage, hvis de officielle ansvarlige organer har forvisset sig om, at overfladevandet ikke længere er kontamineret. Der kan gives tilladelse til vanding og sprøjtning af værtsplanter med vand, der er omfattet af et forbud, hvis dette sker under officielt tilsyn, og hvis der anvendes officielt godkendte teknikker, som eliminerer skadegøreren og forhindrer, at den spredes.
 - i tilfælde, hvor udledninger af spildevand er kontaminerede, indføre offentlig kontrol med bortskaffelse af fast affald og udledning af spildevand fra industrielle forarbejdnings- eller pakkevirksomheder, der håndterer det nævnte plantemateriale
- c) om fornødent opstille et program for udskiftning af alle læggekartofler i løbet af en passende periode.
-

BILAG VII

Med henblik på at undgå enhver påviselig risiko for spredning af skadegøreren gælder følgende for de officielt godkendte metoder til bortskaffelse af affald, der er omhandlet i punkt 1 i bilag VI:

- i) Bortskaffelse af kartoffel- og tomataffald (herunder kartoffelskræller og kasserede kartofler og tomater) og alt andet fast affald forbundet med kartoflerne og tomaterne (herunder jord, sten og andet materiale) skal ske ved
- bortskaffelse på et sted, der er officielt godkendt til bortskaffelse af affald, og hvor der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes til miljøet, f.eks. via udsivning til landbrugsjord eller kontakt med vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord. Affaldet skal sendes direkte til bortskaffelsesstedet indesluttet på en måde, der sikrer, at affaldet ikke tabes eller spildes,
- eller
- forbrænding
- eller
- andre foranstaltninger, forudsat at det er blevet fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes; sådanne foranstaltninger meddeles til Kommissionen og de øvrige medlemsstater.
- ii) Flydende affald, der indeholder opslæmmede faste stoffer, skal inden bortskaffelse underkastes en filtrerings- eller bundfældningsproces, der fjerner de faste stoffer. De faste stoffer bortskaffes i overensstemmelse med nr. i).

Efterfølgende træffes en af følgende foranstaltninger:

- Spildevandet (hele mængden) opvarmes til mindst 60 °C i mindst 30 min. inden bortskaffelse,
- eller
- spildevandet bortskaffes efter en anden, officielt godkendt metode og under officielt tilsyn, således at der ikke er nogen påviselig risiko for, at affaldet kommer i kontakt med landbrugsjord eller med vandkilder, som kunne benyttes til vanding af landbrugsjord. En nærmere beskrivelse af sådanne foranstaltninger meddeles til Kommissionen og de øvrige medlemsstater.

De i dette bilag beskrevne processer finder også anvendelse på affald dannet i forbindelse med håndtering, bortskaffelse og behandling af kontaminerede partier.*