I

(Retsakter, hvis offentliggørelse er obligatorisk)

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2006/56/EF

af 12. juni 2006

om ændring af bilagene til Rådets direktiv 93/85/EØF om bekæmpelse af kartoflens ringbakteriose

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 93/85/EØF af 4. oktober 1993 om bekæmpelse af kartoflens ringbakteriose [1], særlig artikel 12, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) En af de vigtigste kartoffelskadegørere er *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al*. ssp. *sepedonicus* (Spieckermann et Kotthoff) Davis *et al*., som er det patogen, der forårsager kartoffelringbakteriose (i det følgende benævnt »skadegøreren«).

(2) Skadegøreren forekommer fortsat i visse dele af Fællesskabet.

(3) Ved direktiv 93/85/EØF 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 skadegørerens biologi 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 bilagene til direktiv 93/85/EØF.

(6) Med hensyn til procedurerne til påvisning og identifikation medtages nyudviklede procedurer såsom fluorescerende in situ-hybridisering (FISH) og polymerasekædereaktion (PCR) samt forbedringer af en række tekniske elementer i den eksisterende procedure til påvisning og identifikation.

(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 områder.

(8) Foranstaltningerne i dette direktiv er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Plantesundhed —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Bilagene til direktiv 93/85/EØF 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 tilsender 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 259 af 18.10.1993, s. 2.

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 12. juni 2006.

På Kommissionens vegne
Markos KYPRIANOU
Medlem af Kommissionen

BILAG I

PROTOKOL TIL DIAGNOSTICERING, PÅVISNING OG IDENTIFIKATION AF RINGBAKTERIOSE, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann et Kotthoff) Davis *et al.*

OMRÅDE

Denne protokol beskriver de forskellige procedurer, der indgår i:

i) diagnosticering af ringbakteriose i kartoffelknolde og -planter

ii) påvisning af *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prøver af kartoffelknolde og -planter

iii) identifikation af *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* som kontrolmateriale, er det nødvendigt at gennemføre procedurerne 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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 kontaminerer 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 93/85/EØF, forudsætter et positivt resultat ved diagnose- eller screeningtest af en prøve som nærmere angivet i flowdiagrammer.

Hvis den første screeningtest (IF eller PCR/FISH) er positiv, er der mistanke om *Cms*-kontaminering, 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 *Cms*.

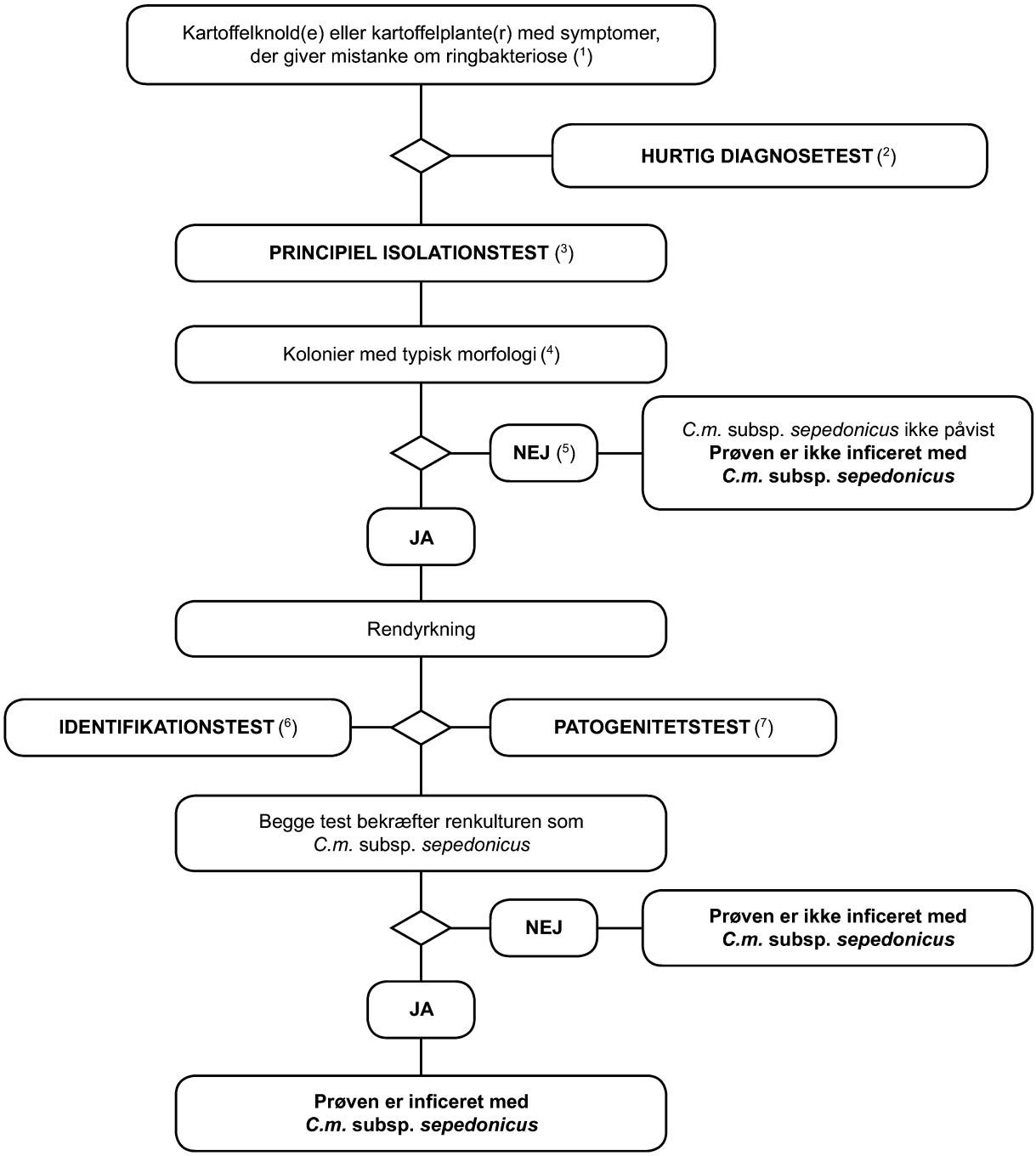
Ved en positiv IF-test, jf. artikel 4, stk. 2, forstås således et positivt IF-resultat bekræftet ved endnu en screeningtest (PCR/FISH).

Bekræftet forekomst, jf. artikel 5, stk. 1, i direktiv 93/85/EØF, forudsætter isolering og identifikation af en renkultur af *C. m.* subsp. *sepedonicus* med bekræftelse af patogenitet.

1. FLOWDIAGRAM

1.1. **Protokol til påvisning og diagnosticering af ringbakteriose i kartoffelknolde og -planter med symptomer på ringbakteriose**

Testproceduren er beregnet til kartoffelknolde og -planter med symptomer, der er typiske for ringbakteriose eller giver mistanke om ringbakteriose. Den omfatter en hurtigscreeningtest, isolering af patogenet fra inficeret karvæv på diagnostiske medier og i tilfælde af positivt resultat identifikation af kulturen som *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



(1) Symptomerne er beskrevet i afsnit 2.

(2) Egnede test er:
— IF-test (afsnit 4),
— PCR-test (afsnit 6),
— FISH-test (afsnit 5).

(3) Skønt isolering af patogenet fra plantemateriale med typiske symptomer ved pladespredning af forskellige fortyndinger er ligetil, kan dyrkningen dog slå fejl på fremskredne infektionsstadier. Blødrådsbakterier, der vokser på sygt væv, kan vokse stærkere end eller hæmme patogenet på dyrkningsmediet. Det anbefales derfor at anvende såvel non-selektive som selektive medier, helst MTNA (afsnit 8) eller biotest (afsnit 7).

(4) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit 8.

(5) Hvis isoleringstesten er negativ, men sygdomssymptomerne typiske, skal isoleringen gentages.

(6) Pålidelig identifikation af en renkultur af *C. m.* subsp. *sepedonicus* opnås ved anvendelse af de test, der er angivet i afsnit 9.

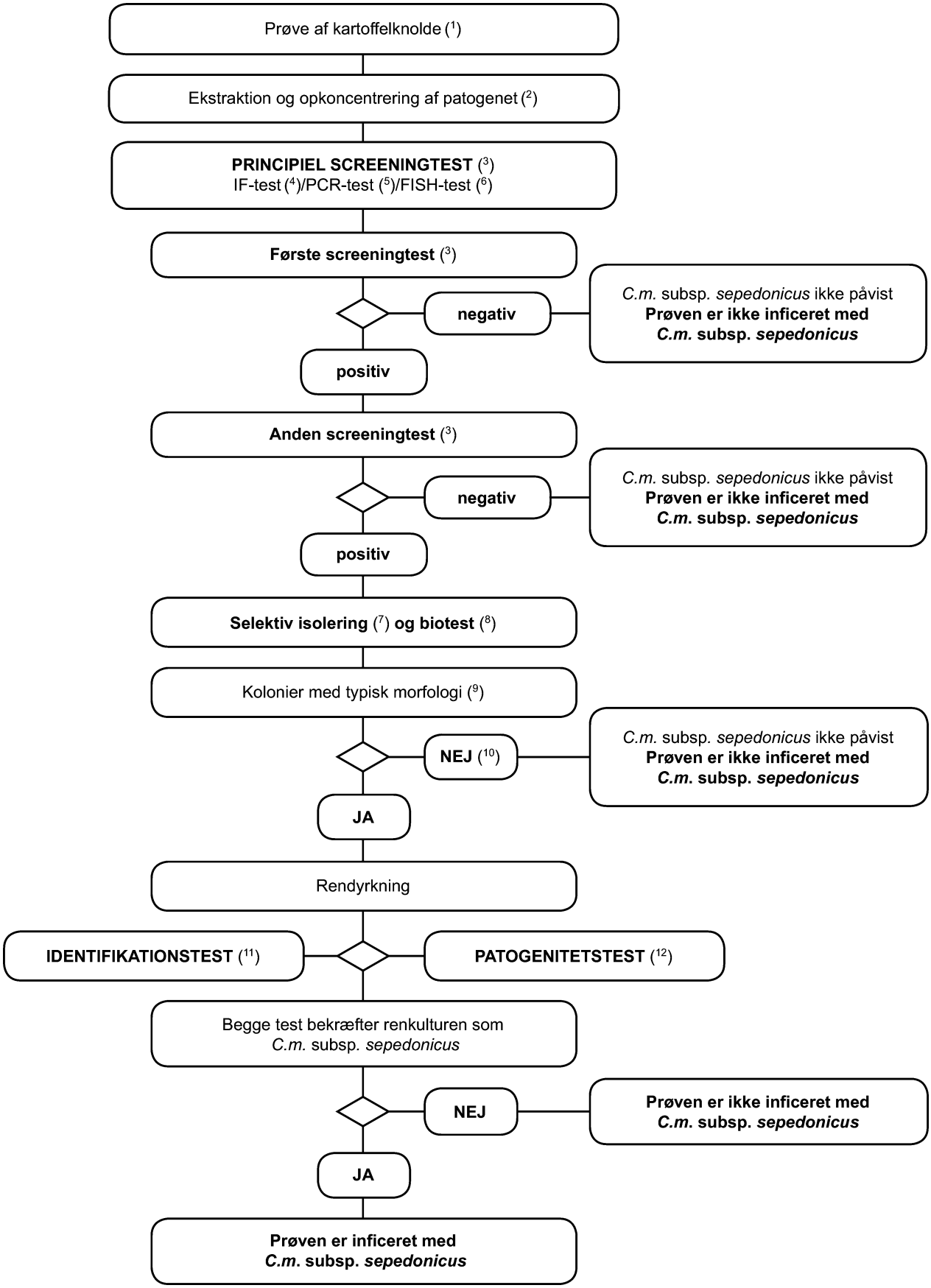
(7) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit 10.

1.2. **Protokol til påvisning og identifikation af *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prøver af symptomfrie kartoffelknolde**

Princip

Testproceduren er beregnet til påvisning af latente infektioner i kartoffelknolde. Et positivt resultat fra mindst to screeningtest baseret på forskellige biologiske principper skal suppleres med isolering af patogenet med efterfølgende bekræftelse af en renkultur som *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 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 til 10^4 celler/ml resuspenderet pellet, der er medtaget som positive kontroller i hver testserie.


Prøve af kartoffelknolde (1)
Ekstraktion og opkoncentrering af patogenet (2)
PRINCIPIEL SCREENINGTEST (3)
IF-test (4)/PCR-test (5)/FISH-test (6)
Første screeningtest (3)
negativ
C.m. subsp. sepedonicus ikke påvist
Prøven er ikke inficeret med
C.m. subsp. sepedonicus
positiv
Anden screeningtest (3)
negativ
C.m. subsp. sepedonicus ikke påvist
Prøven er ikke inficeret med
C.m. subsp. sepedonicus
positiv
Selektiv isolering (7) og biotest (8)
Kolonier med typisk morfologi (9)
NEJ (10)
C.m. subsp. sepedonicus ikke påvist
Prøven er ikke inficeret med
C.m. subsp. sepedonicus
JA
Rendyrkning
IDENTIFIKATIONSTEST (11)
PATOGENITETSTEST (12)
Begge test bekræfter renkulturen som
C.m. subsp. sepedonicus
NEJ
Prøven er ikke inficeret med
C.m. subsp. sepedonicus
JA
Prøven er inficeret med
C.m. subsp. sepedonicus

([1]) Standardprøvestørrelse er 200 knolde, dog kan proceduren tillige anvendes med mindre prøver, hvis der ikke er 200 knolde til rådighed.

([2]) Metoder til patogenekstraktion og -opkoncentrering er beskrevet i afsnit 3.1.

([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]) Immunofluorescenstest (IF-test).
Der skal altid anvendes et polyklonalt antistof til IF-screening; supplerende monoklonale antistoffer kan øge specificiteten (jf. afsnit 4).

([5]) PCR-test.
Der skal anvendes korrekt validerede PCR-reagenser og protokoller (jf. afsnit 6).

([6]) Fish-test.
Der skal anvendes validerede reagenser og protokoller (jf. afsnit 5).

([7]) Selektiv isolering.
MTNA-mediet eller NCP-88-mediet og en 1/100 opløsning af den resuspenderede pellet er i mange tilfælde en egnet metode til direkte isolering af *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Der kan opnås typiske kolonier 3-10 dage efter udsæd. Derefter kan patogenet rendyrkes og identificeres. For at testens potentiale kan udnyttes fuldt ud, kræves omhyggelig forberedelse af kerner fra navleender for at eliminere sekundære bakterier forbundet med kartoffelknolde, som er konkurrenter til *C. m.* subsp. *sepedonicus* på mediet og kan overvokse patogenet. Hvis pladetesten ikke lykkes, skal der foretages isolering fra planter, der anvendes til biotesten (jf. afsnit 8).

([8]) Biotesten bruges til isolering af *C. m.* subsp. *sepedonicus* fra kartoffelekstraktpellet ved selektiv berigelse i ægplanter (aubergine) (*Solanum melongena*). Testen kræver optimale inkuberingsbetingelser som beskrevet i denne metode. Bakterier, der er inhibitorer af *C. m.* subsp. *sepedonicus* på MTNA- eller NCP-88-mediet, vil sandsynligvis ikke virke forstyrrende i denne test (jf. afsnit 7).

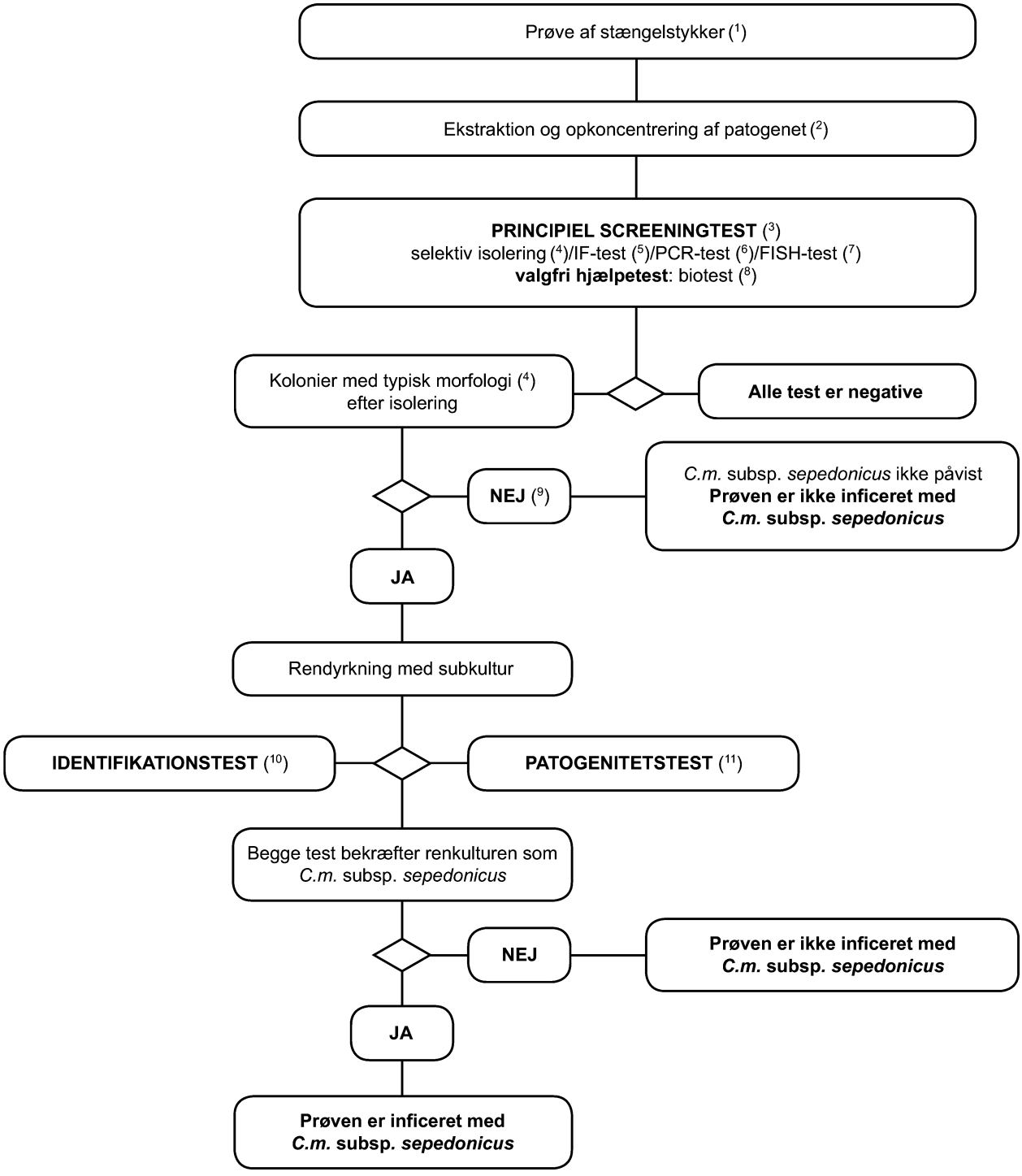
([9]) Den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit 8.

([10]) Dyrkning eller biotest kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsbakterier. Hvis screeningtest giver 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.

([11]) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *C. m.* subsp. *sepedonicus* opnås ved anvendelse af de tests, der er beskrevet i afsnit 9.

([12]) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit 10.

1.3. **Protokol til påvisning og identifikation af *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prøver af symptomfrie kartoffelplanter**



([1]) Anbefalede prøvestørrelser er angivet i afsnit 3.2.

([2]) Metoder til patogenekstraktion og -opkoncentrering er beskrevet i afsnit 3.2.

([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 og den typiske kolonimorfologi er beskrevet i afsnit 8.

([5]) IF-testen er beskrevet i afsnit 4.

([6]) PCR-testen er beskrevet i afsnit 6.

([7]) FISH-testen er beskrevet i afsnit 5.

([8]) Biotesten er beskrevet i afsnit 7.

([9]) Dyrkning eller biotest kan mislykkes som følge af konkurrence eller hæmning forårsaget af blødrådsbakterier. Hvis screeningtest giver positive resultater, men isolationstestene er negative, gentages isolationstestene, og om nødvendigt testes supplerende prøver.

([10]) Pålidelig identifikation af formodede renkulturer af *C. m.* subsp. *sepedonicus* opnås ved anvendelse af de test, der er beskrevet i afsnit 9.

([11]) Patogenitetstesten er beskrevet i afsnit 10.

2. VISUEL UNDERSØGELSE FOR SYMPTOMER PÅ RINGBAKTERIOSE

2.1. **Kartoffelplanter**

Under europæiske klimaforhold findes der sjældent symptomer i marken og ofte kun mod sæsonens slutning. Endvidere sløres eller forveksles symptomerne ofte af eller med andre sygdomme, ældning eller mekaniske skader. Symptomer kan derfor let overses ved markinspektioner. Visnesymptomerne er meget forskellige fra symptomer på brunbakteriose. Nedvisning foregår normalt langsomt og er i begyndelsen begrænset til bladrandene. Unge inficerede blade fortsætter ofte væksten, om end i mindre omfang i de inficerede områder. Dermed får bladene en mærkelig form. Blade, der er påvirket af blokering af karvæv længere nede i stænglen, udvikler ofte klorotiske, gule til orange områder mellem ribberne. Inficerede småblade, blade og endda stængler kan til sidst dø. Blade og knolde er ofte blot mindre. Det forekommer, at planter viser vaksthæmning. Der findes farvebilleder af en række symptomer på Kommissionens websted: (http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

2.2. **Kartoffelknolde**

De tidligste symptomer er en svag glasagtighed eller gennemsigtighed i plantevævet rundt om ledningsvævet, der ikke må vise tegn på råd, især tæt ved navleenden. Ledningsvævet ved navleenden kan være lidt mørkere i farven end normalt. Det første letgenkendelige symptom viser sig ved, at karvævsringen har en gullig farve, og at der, når knolden presses svagt, kommer strenge af ostelignende materiale ud fra ledningsvævet. Denne udsondring indeholder millioner af bakterier. Der kan i dette stadium udvikle sig brunfarvning af ledningsvævet, og knoldsymptomerne i denne fase ligner symptomerne på brunbakteriose forårsaget af *Ralstonia solanacearum*. I begyndelsen kan disse symptomer være begrænset til en del af ledningsvævet, der ikke nødvendigvis er tæt ved navleenden, og de kan gradvis brede sig til hele ringen. Efterhånden som infektionen skrider frem, ødelægges karvævet; den ydre cortex kan blive adskilt fra den indre cortex. På fremskredne stadier af infektionen opstår revner på knoldens overflade, som ofte er rødligt-brune ved randene. Der har i den seneste tid været adskillige tilfælde i Europa, hvor den indre cortex rådner samtidig med ledningsvævet med resulterende sekundært angreb, der forårsager indre hulhed og nekrose. Sekundære svampe- eller bakterieangreb kan sløre symptomerne, og det kan være vanskeligt, ja umuligt, at skelne fremskredne ringbakteriosesymptomer fra andre bakterioser i knoldene. Der kan forekomme atypiske symptomer. Der findes farvebilleder af en række symptomer på Kommissionens websted: (http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

3. FORBEREDEDELSE AF PRØVERNE

3.1. **Kartoffelknolde**

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 tillige 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 *Ralstonia solanacearum*, der forårsager kartoflens brunbakteriose.

Valgfri forbehandling forud for prøveforberededelse.

Knoldene vaskes. Der anvendes passende desinfektionsmidler (chlorforbindelser, når der skal anvendes PCR-test, for at fjerne eventuelt 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.

3.1.1. Med en ren, desinficeret skalpel eller grøntsagskniv fjernes huden fra de enkelte knoldes navleende, 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 symptomer på ringbakteriose anbringes og undersøges for sig.

Hvis der under fjernelsen af kartoffelproppen fra navleenden observeres mistænkelige symptomer på ringbakteriose, undersøges knolden visuelt, efter at den er overskåret tæt ved navleenden. Overskårne knolde med mistænkelige symptomer bør forkorkes ved stuetemperatur i 2 dage og derefter opbevares de ved 4-10 °C under karantænebetingelser, indtil samtlige test er gennemført. Alle prøver af knolde, herunder prøver med mistænkelige symptomer, bør opbevares i overensstemmelse med bilag II.

3.1.2. Navleenderne samles i ubrugte engangsbeholdere, som kan lukkes og/eller forsegles (hvis beholderne genbruges, bør de rengøres og desinficeres grundigt ved hjælp af chlorforbindelser). Navleenderne skal tages i behandling 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. Tørring og forkorkning af kartoffelpropper og saprofytvækst under opbevaringen kan hindre påvisning af den bakterie, der forårsager ringbakteriose.

3.1.3. Navleenderne behandles på en af nedenstående måder:

a) Navleenderne dækkes med en tilstrækkelig mængde (ca. 40 ml) ekstraktionsbuffer (tillæg 3) 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 3) enten i en blender (f.eks. Waring eller Ultra Thurax) eller ved knusning i en forseglet 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 nysteriliserede 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.

3.1.4. 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 (tillæg 3).

3.1.5. Bakteriefraktionen 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 kasseres, idet det undgås at forstyrre pelleten.

3.1.6. Pelleten resuspenderes i 1,5 ml pelletbuffer (tillæg 3). Der anvendes 500 µl til test for *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 µl til test for *Ralstonia solanacearum* og 500 µl til referenceformål. Der tilsættes steril glycerol, til der opnås en slutkoncentration 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 24-48 timer.

3.1.7. Det er nødvendigt, at alle positive *C. m.* subsp. *sepedonicus*-kontroller og prøver behandles for sig for at undgå kontaminering. Dette gælder IF-glas og alle test.

3.2. **Kartoffelplanter**

NB:

Med henblik på påvisning af latente populationer af *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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.)

3.2.1. Med en ren, desinficeret kniv eller beskæresaks fjernes et stykke på 1-2 cm forneden af hver stængel lige over jorden.

Stængelstykkerne desinficeres kortvarigt med 70 % ethanol og tørres straks på filtrerpapir.

Stængelstykkerne samles i en lukket steril beholder i overensstemmelse med følgende procedurer:

3.2.2. Stængelstykkerne behandles på en af nedenstående måder:

a) Stykkerne dækkes med en tilstrækkelig mængde (ca. 40 ml) ekstraktionsbuffer (tillæg 3) 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 Biorebapose) med en passende mængde ekstraktionsbuffer (tillæg 3) 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.

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

3.2.4. Yderligere klaring af ekstraktet eller opkoncentrering af bakteriefraktionen er normalt ikke nødvendig, men kan foretages ved filtrering og/eller centrifugering som beskrevet i afsnit 3.1.4-3.1.6.

3.2.5. 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.

4. IF-TEST

Princip

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

Når IF-testen anvendes som den primære screeningtest og IF-resultatet er positivt, skal 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 komplettere analysen.

NB:

Der skal altid anvendes et polyklonalt antistof, når IF-testen anvendes som den primære screeningtest. I tilfælde af et positivt IF-resultat med et polyklonalt antistof kan en supplerende screening med et monoklonalt antistof give større specificitet, men den kan være mindre følsom.

Der anvendes antistoffer over for en referencestamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus*. 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 til 10^6 celler/ml fra den homologe stamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Der benyttes en passende fortynding af fluoresceinisothiocyanatkonjugatet (FITC-konjugatet) ifølge producentens anbefalinger. De ubehandlede polyklonale eller monoklonale antistoffer bør have 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. Der anvendes validerede antistoffer (jf. webstedet http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Testen bør gennemføres på frisklavede prøveekstrakter. Om nødvendigt kan testen udmærket gennemføres på ekstrakter, der er opbevaret ved – 68 til – 86 °C under 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 (jf. 2.2).

Der forberedes særskilte, positive kontrolglas fra den homologe stamme eller en anden referencestamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspenderet i kartoffelekstrakt, som angivet i tillæg 2, og evt. i buffer.

Naturligt inficeret væv (opbevaret evt. efter 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 anvendes delprøver af prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt.

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.

4.1. 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 forholdsmæssigt for større vinduer) af en fortynding på 1:100 af den resuspenderede kartoffelpellet 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 og 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.

4.2. 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 (højst 3 måneder) inden yderligere test.

4.3. IF-procedure

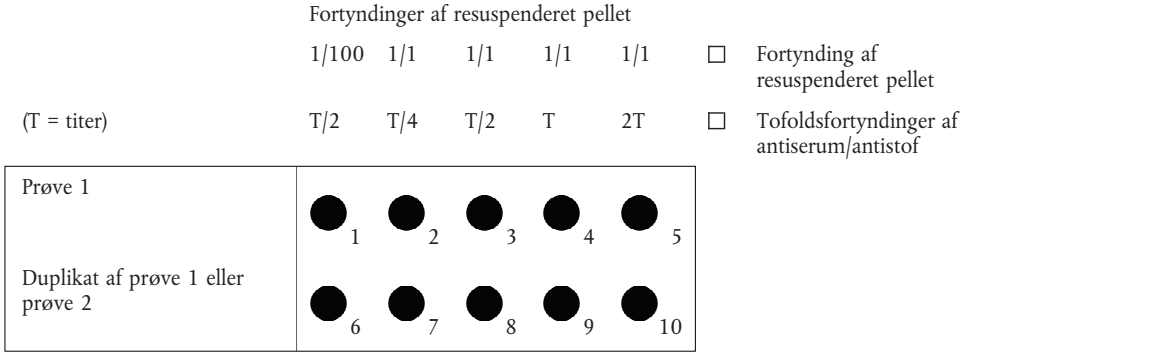
i) Forberedelse af testglas som beskrevet ovenfor i punkt 4.1, nr. i):

Der laves en række tofoldsfortyndinger af antistoffet i IF-buffer. 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).

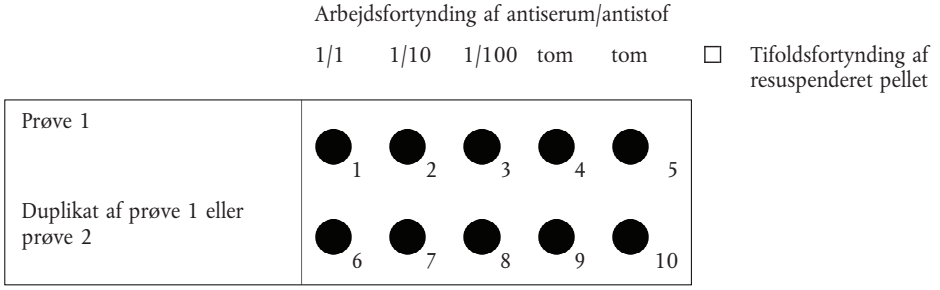
ii) Forberedelse af testglas som beskrevet ovenfor i punkt 4.1, nr. ii):

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

Figur 1. Forberedelse af objektglas som beskrevet i punkt 4.1, nr. i), og punkt 4.3, nr. i)



Figur 2. Forberedelse af testglas som beskrevet i punkt 4.1, nr. ii), og punkt 4.3, nr. ii)



4.3.1. 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.

4.3.2. Glassene inkuberes tildækket på fugtigt papir i 30 min. ved stuetemperatur (18-25 °C).

4.3.3. 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 3) og efterfølgende i 5 min. i IF-buffer. Aerosoldannelse eller overførsel af dråber, der kan medføre krydskontaminering, skal undgås. Overskydende fugt fjernes omhyggeligt ved at duppe dem forsigtigt.

4.3.4. 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.

4.3.5. Glassene inkuberes tildækket på fugtigt papir i 30 min. ved stuetemperatur (18-25 °C).

4.3.6. Konjugatdråberne rystes af glasset. Glassene skylles og vaskes som ovenfor (4.3.3).

Overskydende fugt fjernes forsigtigt.

4.3.7. 5-10 µl af 0,1 M fosfatbufferet glycerol (tillæg 3) eller et tilsvarende indlejringsmiddel, der modvirker falmning, og som kan fås i handelen, afpipetteres på hvert vindue, og der sættes dækglas på.

4.4. Aflæsning af IF-testen:

4.4.1. Testglassene undersøges i et epifluorescensmikroskop med et filter, som er egnet til arbejdet med FITC, i immersionsolie eller -vand ved 500-1 000 ganges forstørrelse. Vinduerne gennemsøges 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 (tillæg 4) gentages, hvis farvningen er unormal.

4.4.2. Dernæst observeres, om der er stærkt fluorescerende celler med den karakteristiske morfologi for *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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 ved samme antistoffortynding. Celler med ufuldstændig farvning eller med svag fluorescens ses der bort fra.

Hvis der er mistanke om kontaminering, gentages testen. Det 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.

4.4.3. Der er flere problemer forbundet med immunofluorescens-testens specificitet. Baggrundsflora af fluorescerende celler med atypisk morfologi og krydsreagerende blødrådsbakterier, som i størrelse og morfologi ligner *C. m.* subsp. *sepedonicus* vil sandsynligvis forekomme i pellets af navleende og stængelstykker fra kartofler.

4.4.4. Kun fluorescerende celler med typisk størrelse og morfologi ved den antistoftiter eller arbejdsfortynding, der er beskrevet i punkt 4.3, tages i betragtning.

4.4.5. 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 4).

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.

5. FISH-TEST

Princip

Når FISH-testen anvendes som den første screeningtest og resultatet er positivt, skal 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus*-specifikke oligo-prober (tillæg 7). Indledende test med denne metode skulle muliggøre reproducerbar påvisning af mindst 10^3-10^4 celler af *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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 under glycerol ved – 16 til – 24 °C eller – 68 til – 86 °C.

Som negative kontroller anvendes delprøver af prøveekstrakt, som tidligere er testet negativt for *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Til anvendelse som positive kontroller forberedes suspensioner med 10^5 til 10^6 celler pr. ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* (f.eks. stamme NCPPB 4053 eller PD 406) i 0,01 M fosfatbuffer fra en 3-5 dage gammel dyrkning (forberedelse, se tillæg 2). Der forberedes særskilte glas med positive kontroller fra den homologe stamme eller en anden referencestamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus* suspenderet i kartoffelekstrakt, som angivet i tillæg 2.

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

Test af kontrolmateriale foretages som for prøvernes vedkommende.

5.1. **Fiksering af kartoffelekstrakt**

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

5.1.1. En fikseringsopløsning forberedes (se tillæg 7).

5.1.2. Der afpipetteres 100 µl af hvert prøveekstrakt i et eppendorfrør, og der centrifugeres i 8 min. ved 7 000 g.

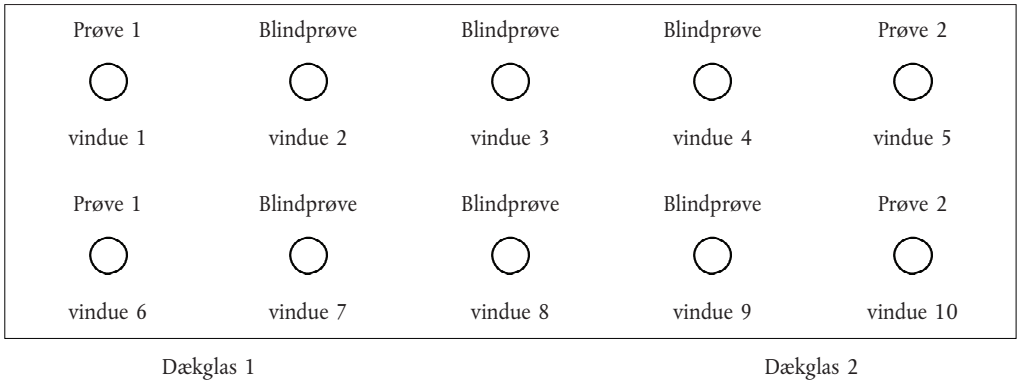
5.1.3. Supernatanten fjernes, og pellet opløses i 500 µl fikseringsopløsning, der er forberedt mindre end 24 timer før. Der vortexes og inkuberes natten over ved 4 °C.

Som alternativ fikseringsvæske kan anvendes 96 % ethanol. Hvis denne anvendes, opløses pellet fra trin 5.1.2 i 50 µl 0,01 M fosfatbuffer og 50 µl 96 % ethanol. Der vortexes og inkuberes ved 4 °C i 30-60 minutter.

5.1.4. Der centrifugeres i 8 min. ved 7 000 g, supernatanten fjernes, og pellet resuspenderes i 75 µl 0,01 M fosfatbuffer (se tillæg 3).

5.1.5. Der uddryppes 16 µl af de fikserede suspensioner på et rent multitest-glas, jf. figur 3. 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 3. Placering på FISH-glas



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

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

5.2. **Præhybridisering og hybridisering**

5.2.1. Der forberedes en lysozymopløsning, der indeholder 10 mg lysozym (Sigma L-6876) i 10 ml buffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0). Opløsningen kan opbevares, men der bør kun foretages én frysning-optøning. De enkelte prøver dækkes godt med ca. 50 µl lysozymopløsning og inkuberes i 10 minutter ved stuetemperatur. Dernæst neddyppes glassene én gang i demineraliseret vand, og tørres med filtrerpapir.

Der kan som alternativ til lysozym tilsættes 50 µl 40-400 µg ml^{-1} proteinase K i buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 7,4) til hver brønd, og der inkuberes ved 37 °C i 30 min.

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

5.2.3. Et fugtkammer til inkubation forberedes ved at dække bunden i en lufttæt kasse med filtrerpapir, der er gennemvædet med 1x hybmix (tillæg 7). Kassen præinkuberes i hybridiseringsovnen ved 55 °C i mindst 10 min.

5.2.4. Hybridiseringsopløsningen forberedes (tillæg 7), så der kan blive 45 µl pr. glas, og der præinkuberes i 5 min. ved 55 °C.

5.2.5. Glassene anbringes på en varm plade ved 45 °C, og der tilsættes 10 µl hybridiseringsopløsning til hver af de 4 brønde på glassene.

5.2.6. 2 dækglas (24 × 24 mm) anbringes uden luftlommer på hvert objektglas. Objektglassene anbringes i det foropvarmede fugtkammer og hybridiseres natten over i ovnen ved 55 °C i mørke.

5.2.7. Der forberedes 3 bægerglas med 1 l ultrarent vand (UPW), 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix og 666 ml UPW) og 1 l 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix og 833 ml UPW). De præinkuberes alle i vandbad ved 55 °C.

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

5.2.9. Overskydende probe bortvaskes ved inkubation i 15 min. i bægerglasset med 1x hybmix ved 55 °C.

5.2.10. Glasholderen overføres til 1/2 hybmix vaskeopløsning, og der inkuberes i yderligere 15 min.

5.2.11. Glassene neddyppes kort i ultrarent vand og placeres på filtrerpapir. Overskydende vand fjernes ved at dække overfladen forsigtigt med filtrerpapir. 5-10 µl indlejringsopløsning, 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.

5.3. **Aflæsning af FISH-testen**

5.3.1. 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-isothiocyanat, ses Cy3-farvede celler af *C. m.* subsp. *sepedonicus* som fluorescerende røde. Cellemorfologien sammenlignes med de positive kontroller. Cellerne skal være lyse, fluorescerende og fuldstændigt farvede. FISH-testen (tillæg 9.4) gentages, hvis farvningen er unormal. Vinduerne gennemsøges langs to diametre vinkelret på hinanden og langs omkredsen. Ved prøver, hvor der ikke konstateres nogen eller kun få celler, undersøges mindst 40 mikroskopfelter.

5.3.2. Dernæst observeres, om der er stærkt fluorescerende celler med den karakteristiske morfologi for *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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.

5.3.3. Hvis der er mistanke om kontaminering, gentages testen. Det kan være tilfælde, 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.

5.3.4. Der er flere problemer forbundet med FISH-testens specificitet. Baggrundsbestande af fluorescerende celler med atypisk morfologi og krydsreagerende blødrådsbakterier med en størrelse og morfologi, der ligner *C. m.* subsp. *sepedonicus*, kan forekomme — om end mindre hyppigt end i IF-testen — i pellets af navleende og stængelstykker fra kartofler.

5.3.5. Kun fluorescerende celler med typisk størrelse og morfologi tages i betragtning, jf. 5.3.2.

5.3.6. Fortolkning af FISH-testresultatet:

i) 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 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 kontaminerede. Der skal gennemføres yderligere test. Prøver med mindre end 5×10^3 typiske celler pr. ml resuspenderet pellet betragtes som negative.

ii) FISH-testen er negativ, hvis ikke ses stærkt rødt-fluorescerende celler med størrelse og morfologi, der er typisk for *C. m.* subsp. *sepedonicus*, ved anvendelse af rhodaminfilteret, forudsat at der ses typiske stærkt rødt-fluorescerende celler i de positive kontrolpræparater ved anvendelse af rhodaminfilteret.

6. PCR-TEST

Principper

Når PCR-testen anvendes som den primære screeningtest og resultatet er positivt, skal IF-testen gennemføres som anden obligatoriske screeningtest. Når PCR-testen 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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. 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 PCR) 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus*

— bufferkontroller, der anvendes til ekstrahering af bakterien og dna'et fra prøven

— PCR-mastermix.

Den bør indeholde følgende positive kontroller:

— delprøver af resuspenderet pellet, til hvilke der er tilsat *C. m.* subsp. *sepedonicus* (forberedelse, se tillæg 2)

— en suspension i vand af 10^6 celler pr. ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* fra et virulent isolat (f.eks. NCPPB 2140 eller NCPPB 4053)

— 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 ud fra vaskede kartofler, hvis der skal anvendes PCR-protokoller.

6.1. **Dna-oprensningsmetoder**

Der anvendes positive og negative kontrolprøver som beskrevet ovenfor.

Kontrolmaterialet forberedes 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 den validerede PCR-metode, der er beskrevet i tillæg 6.

6.1.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 spinnes ned ved centrifugering, og 5 µl af den supernatant, der indeholder dna, anvendes til PCR.

6.1.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 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 den validerede protokol (tillæg 6). Der forberedes en tifoldsfortynding af prøve-dna-ekstrakt (1:10 i ultrarent vand).

6.2.2. Den relevante PCR-mastermix forberedes i et kontamineringsfrit miljø i overensstemmelse med den publicerede protokol (tillæg 6). Den validerede PCR-protokol er en multiplex-reaktion, som også omfatter en intern PCR-kontrol.

6.2.3. Der tilsættes 5 µl dna-ekstrakt pr. 25 µl PCR-reaktion i sterile PCR-rør.

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 den korrekt optimerede PCR-protokol gennemføres (tillæg 6).

6.3. **Analyse af PCR-produktet**

6.3.1. PCR-amplikoner kan adskilles ved agarosegelelektroferese. Ved testen anvendes mindst 12 µl amplificeret dna-reaktionblanding 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 30-45 min., idet der træffes de fornødne *forholdsregler ved håndteringen af dette mutagen*.

6.3.3. Den farvede gel undersøges ved UV-gennemlysning (f.eks. λ = 302 nm) for amplificerede PCR-produkter af den forventede størrelse (tillæg 6); resultatet skal dokumenteres.

6.3.4. Ved alle nye fund/tilfælde verificeres PCR-amlikonens 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 agarosegelelektroferese, 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus*-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 *C. m.* subsp. *sepedonicus*-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 (afsnit 9.3).

NB:

Der er mistanke om PCR-inhibition, hvis det forventede amplikon fremkommer fra den positive kontrolprøve, der indeholder *C. m.* subsp. *sepedonicus* i vand, men der fås negative resultater fra positive kontrolprøver med *C. m.* subsp. *sepedonicus* kartoffelekstrakt. I multiplex-PCR-protokoller med interne PCR-kontroller er det tegn på inhibering 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. BIOTEST

NB:

Indledende test med denne metode skal muliggøre reproducerbar påvisning af 10^3-10^4 kolonidannende celler af *C. m.* subsp. *sepedonicus* pr. ml tilsat til prøveekstrakter, som tidligere er testet negative (forberedelse, se tillæg 2).

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.

Visse arter af ægplanter befordrer selektivt vækst af *C. m.* subsp. *sepedonicus* — også selv om der ikke forekommer symptomer. Ægplanter er også gode til en konfirmativ værtstest.

Vækstbetingelserne bør være optimale for at reducere risikoen for falske negative testresultater.

For detaljer vedrørende dyrkning, se tillæg 8.

7.1. Hele den resterende testdelprøve af den resuspenderede pellet fra afsnit 3.1.6 eller 3.2.5 fordeles mellem ægplanterne ved en af nedenstående metoder (7.3 eller 7.4). Der anvendes udelukkende planter i bladstadium 2-3, hvor højst tre blade er foldet helt ud. For at sikre, at den resuspenderede pellet anvendes fuldt ud, og at inokuleringen er effektiv, kræver de nedenfor beskrevne procedurer, at der bruges 15-25 ægplanter pr. prøve.

7.2. Ægplanterne vandes ikke i 1-2 dage forud for inokulering for således at mindske saftspændingen.

7.3. Snitinokulering

7.3.1. 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.

7.3.2. 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.

7.3.3. Snittet lukkes med steril vaseline fra en sprøjte.

7.4. Sprøjteinokulering

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

7.5. Som positive kontroller podes 5 planter med en vandig suspension af 10^5-10^6 celler pr. ml af en kendt *C. m.* subsp. *sepedonicus*-kultur og om muligt med naturligt inficeret knoldvæv (jf. afsnit 4) efter samme podningsmetode (7.3 eller 7.4).

7.6. Som negativ kontrol podes 5 planter med steril pelletbuffer efter samme podningsmetode (7.3 eller 7.4).

7.7. Planterne inkuberes under karantæneforhold i op til 4 uger ved 18-24 °C. Planterne inkuberes med tilstrækkeligt lys og høj fugtighed (70-80 %), og de vandes således, at såvel overvanding som vandmangel med deraf følgende visnen undgås. *C. m.* subsp. *sepedonicus*-cellerne dør ved temperaturer over 30 °C, og den optimale temperatur er 21 °C. For at undgå krydskontaminering 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 gødskning, vanding, inspektion eller anden håndtering udvises der stor omhu for at undgå krydskontaminering. Det er af afgørende betydning, at drivhuse og vækstkammere holdes fri for alle skadegørende insekter, idet sådanne kan overføre bakterien fra den ene prøve til den anden.

7.8. Der undersøges regelmæssigt for symptomer efter en uge. Antallet af planter med symptomer tælles. *C. m.* subsp. *sepedonicus* forårsager visnen af blade på ægplanter, der kan begynde som en slaphed i bladrandene eller mellem bladstrengene. Vissent væv kan i begyndelsen forekomme mørkegrønt eller spættet, men bliver blegere, før det nekrotiserer. Visnede steder mellem bladstrengene har ofte et fedtet, gennemblødt udseende. Nekrotisk væv har ofte en lysegul rand. Planterne dør ikke nødvendigvis; jo længere perioden før symptomernes udvikling er, desto større er chancerne for overlevelse. Planterne kan vokse fra infektionen. Unge ægplanter er langt mere modtagelige for ringe bestande af *C. m.* subsp. *sepedonicus* end ældre planter, derfor er det nødvendigt at anvende planter på eller lige før bladstadium 3.

Visnen kan også skyldes bestande af andre bakterier eller svampe, der findes i pellet fra knoldenes væv. De omfatter *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* og *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata* samt store bestande af blødrådsbakterier. Navnlig *Erwinia chrysanthemi* kan forårsage symptomer og visnen, der ligner *C. m.* subsp. *sepedonicus* symptomer meget. Den eneste forskel er en sortfarvning af stænglerne, når det drejer sig om *Erwinia chrysanthemi*-infektioner. Andre former for visnen kan skelnes fra dem, der skyldes *C. m.* subsp. *sepedonicus,* eftersom hele blade eller hele planter hurtigt visner. Der kan også forberedes en gram-farvning: Ved denne test skelnes der mellem *C. m.* subsp. *sepedonicus* og *Erwinia* spp.

7.9. Så snart der observeres symptomer på ægplanter, bør der laves en reisolering, idet der anvendes stykker af visnet bladvæv og stængelvæv fra planter (udblødning af væv, se 3.1.3). Desinficer overfladen af ægplanternes blade og stængler ved aftørring med 70 % ethanol. Der gennemføres en IF-test eller en PCR-test af ægplantesaften, og der isoleres på et egnet (selektivt) medie (se afsnit 8). Der kan også forberedes en gram-farvning (tillæg 9). Der foretages identifikation af formodede renkulturer af *C. m.* subsp. *sepedonicus,* og patogeniteten bekræftes (se afsnit 9 og 10).

7.10. Under visse omstændigheder, især hvor vækstbetingelserne ikke er optimale, kan *C. m.* subsp. *sepedonicus* eksistere som en latent infektion i ægplanter selv efter en inkubationstid på op til 4 uger. Hvis der ikke observeres symptomer efter 4 uger, gennemføres en IF-/PCR-test af en blandingsprøve af stængelstykker på 1 cm fra hver testplante, idet stykkerne skal være taget over podningsstedet. Hvis testen er positiv, bør der foretages reisolering på et egnet (selektivt) medie efter proceduren i afsnit 8. Der foretages identifikation af formodede renkulturer af *C. m.* subsp. *sepedonicus,* og patogeniteten bekræftes (se afsnit 9 og 10).

Fortolkning af resultatet 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus,* og forudsat at *C. m.* subsp. *sepedonicus* er påvist i de positive kontrolplanter.

Biotesten er positiv, hvis testplanterne er inficeret med *C. m.* subsp. *sepedonicus.*

8. ISOLERING AF *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

NB:

Diagnose er først fuldført, når *C. m.* subsp. *sepedonicus* er blevet isoleret og efterfølgende identificeret (se afsnit 9) samt bekræftet ved en patogenitetstest (afsnit 10). Skønt *C. m.* subsp. *sepedonicus* er en organisme, det er vanskeligt at dyrke på medie, kan den isoleres fra væv, der udviser symptomer.

Den kan imidlertid blive overvokset af hurtigtvoksende blødrådsbakterier, og det er vanskeligt at isolere direkte fra pellet fra knold- eller stængelvævet (afsnit 3.1.6 eller 3.2.5). Med et selektivt medie og en passende opløsning af den resuspenderede pellet fra navleender eller stængler af kartofler er det muligt at foretage direkte isolering af *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Der skal foretages isolering fra alle kartoffelknolde eller -stængelstykker og fra ægplanter, for hvilke der ikke er blevet observeret symptomer, men hvor IF-/PCR-testen af blandingsprøven fra positiv (se afsnit 7.10). Macerering af ægplantestængler bør, hvis det er påkrævet, udføres som beskrevet i afsnit 3.1.3.

Til anvendelse som positive kontroller forberedes tifoldsfortyndinger af en suspension af 10^6 cfu pr. ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* (f.eks. NCPPB 4053 eller PD 406). For at undgå mulighed for 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.

8.1. **Udpladning på selektive medier**

8.1.1. Af en 100 µl delprøve fra en genopløst kartoffelpelletprøve eller ægplantesaft laves tifoldsfortyndinger i pelletbuffer (tillæg 3).

8.1.2. Isolering fra ufortyndet kartoffelpellet mislykkes normalt som følge af at *Cms* er vanskelig at dyrke på medier samt konkurrence fra blødrådsbakterier. Eftersom bakterien normalt forekommer i store populationer i inficeret væv, kan blødrådsbakterierne normalt fortyndes væk, mens patogenet bliver tilbage. Det anbefales derfor at udplade 100 µl fra hver af prøverne i fortyndinger på 1:100 til 1:10 000 på MTNA-medie eller NCP-88-medie (tillæg 5) (hvis der anvendes petriskåle med en diameter på 90 mm, ellers tilpasses mængden i forhold til andre skålstørrelser), idet der anvendes podenåle (»hockey sticks«) og pladespredningsmetoden.

NB:

Som alternativ kan den oprindelige delprøve på 100 µl kartoffelpellet udplades på den første agarplade med en podenål, og dernæst flyttes podenålen til en anden agarplade, idet eventuelle rester på podenålen stryges af. Til sidst gentages dette med en tredje plade, hvorved man opnår en virkning som pladespredning af forskellige fortyndinger via podenålen.

8.1.3. Pladerne inkuberes i mørke ved 21-23 °C.

8.1.4. De første undersøgelser af pladerne, der omfatter tælling af *C. m.* subsp. *sepedonicus*-lignende kolonier, idet kontrolplader anvendes som reference, foretages efter 3 dage med yderligere tællinger efter 5, 7 og til sidst 10 dage.

8.2. **Rendyrkning af Cms-lignende kolonier**

NB:

Rendyrkning af *C. m.* subsp. *sepedonicus*-lignende kolonier bør foretages på gærekstraktmedie til ægplanteinokulering og/eller efterfølgende identifikation; dette bør ske, inden pladerne bliver for overvoksede, dvs. helst efter 3-5 dage.

8.2.1. Der udstryges *C. m.* subsp. *sepedonicus* -lignende kolonier på et af følgende medier (tillæg 5 angiver formler):

næringsagar med dextrose (kun til rendyrkning)

gæragar med peptonglukose

gærekstraktagar med mineralsalte.

Der inkuberes ved 21-24 °C i op til 10 dage.

C. m. subsp. *sepedonicus* er langsomtvoksende og giver sædvanligvis punktformede, cremefarvede og kuppelformede kolonier i løbet af højst 10 dage. (Der findes fotografier af typiske *C. m.* subsp. *sepedonicus*-kolonier på webstedet http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

8.2.2. Der udstryges på ny for at sikre renheden.

Væksthastigheden kan øges ved hjælp af subkulturer. Kolonidannelserne er typisk cremehvide eller elfenbensfarvede, til tider gule, afrundede, glatte, ophøjede, kuppelkonvekse, slimagtige til flydende, har ubrudte kanter og er sædvanligvis 1 til 3 mm i diameter.

En almindelig gram-farvning (tillæg 9) kan benyttes som hjælp til at vælge kolonier til yderligere test.

8.2.3. Formodede kulturer identificeres (se afsnit 9), og der gennemføres en patogenitetstest (se afsnit 10).

9. IDENTIFIKATION

Formodede renkulturer af *C. m.* subsp. *sepedonicus*-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.

9.1. **Biokemiske undersøgelser og enzymundersøgelser**

Følgende fænotypiske egenskaber, som *C. m.* subsp. *sepedonicus* enten har eller slet ikke har, bestemmes efter metoderne Lelliott and Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), anonym (1987).

Alle medier bør inkuberes ved 21 °C og undersøges efter seks dages forløb. Er der efter 6 dage ingen vækst, inkuberes der i op til 20 dage.

Alle test skal omfatte en kendt *C. m.* subsp. *sepedonicus*-kontrol. Biokemiske test og fysiologiske test udføres ved podning med renkulturer fra vækstmedier. Der skal foretages morfologiske sammenligninger af kulturer fra vækstmedier med dextrose.

Test	*Forventet resultat*
Oxidations/fermenteringstest (O/F)	Negativt inert eller svagt oxiderende
Oxidaseaktivitet	–
Vækst ved 37 °C	–
Ureaseaktivitet	–
Hydrolyse af aesculin	+
Hydrolyse af stivelse	– eller svag
Tolerance over for 7 % NaCl	–
Indolproduktion	–
Katalaseaktivitet	+
H_2S-produktion	–
Citratudnyttelse	–
Smeltning af gelatine	–
Syre og glycerol	–
Syre af lactose	– eller svag
Syre af rhamnose	–
Syre af salicin	–
Gram-farvning (tillæg 9)	+

9.2. **IF-test**

a) Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i IF-buffer (tillæg 3).

b) Der forberedes en tofoldsfortyndingsrække af et passende antiserum.

c) IF-metoden benyttes (afsnit 4).

d) IF-testen er positiv, hvis isolatets IF-titer svarer til den positive kontrols titer.

9.3. **PCR-test**

a) Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i ultrarent vand.

b) 100 µl af cellesuspensionen opvarmes i lukkede rør i en varmeblok eller i kogende vandbad ved 100 °C i 4 min. Om nødvendigt kan tilsætning af frisklavet NaOH, så der opnås en slutkoncentration på 0,05 M, medvirke til cellelysis. Prøverne kan da opbevares ved – 16 til – 24 °C, indtil der er brug for dem.

c) Der anvendes relevante PCR-procedurer for at amplificere *C. m.* subsp. *sepedonicus*-specifikke amplikoner (f.eks. Pastrik, 2000; se tillæg 4; Li and de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

d) Der opnås en positiv identifikation af *C. m.* subsp. *sepedonicus*, hvis PCR-amplikonerne har samme størrelse og har samme restriktionsfragmentlængde-polymorfisme (RFLP) som den positive kontrolstamme.

9.4. **FISH-test**

a) Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i ultrarent vand.

b) FISH-metoden benyttes (afsnit 5).

c) FISH-testen er positiv, hvis isolatet og den positive kontrol giver samme reaktioner.

9.5. **Fedtsyreprofilering (FAP)**

a) Kulturen dyrkes i 72 timer ved 21 °C (+/– 1°) på trypticasesojaagar (Oxoid).

b) Der benyttes en passende FAP-procedure (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) FAP-testen er positiv, hvis den formodede kulturs profil er identisk med den positive kontrols. Forekomst af karakteristiske fedtsyrer som 15:1 antiso A, 15:0 iso, 15:0 antiso, 16:0 iso, 16:0 og 17:0 antiso er et klart tegn på *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Andre slægter som *Curtobacterium, Arthrobacter* og *Micrococcus* har også nogle af disse fedtsyrer, men 15:1 antiso A er en sjælden fedtsyre hos disse bakterier; den forekommer dog hos alle *Clavibacter* spp. i et niveau på 1-5 %. Hos *C. m.* subsp. *sepedonicus* ligger værdien normalt på ca. 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

a) Der forberedes en suspension af ca. 10^6 celler pr. ml i ultrarent vand.

b) Testen benyttes ifølge proceduren (Smith *et al.*, 2001).

10. KONFIRMATIV TEST

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

10.1. Der forberedes et inokulum på 10^6 celler pr. ml fra 3 dage gamle kulturer af det isolat, der skal testen, og en passende positiv kontrolstamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.2. Der podes på 5-10 ægplantestængler på unge planter på bladstadium 3 (afsnit 7.3 eller 7.4).

10.3. Planterne inkuberes ved 18-24 °C med tilstrækkeligt lys og høj relativ fugtighed, og de vandes i passende omfang, således at såvel overvanding som vandmangel undgås (afsnit 7.7). For sådanne rene isolater bør der indtræde karakteristisk visnen efter højst 2 ugers forløb, men planter uden symptomer (se afsnit 7.8) efter dette tidsrum bør inkuberes i op til 3 uger ved temperaturer, der fremmer ægplanters vækst, men som ikke overstiger 25 °C (jf. tillæg 8). Er der ingen symptomer efter 3 uger, kan det ikke bekræftes, at kulturen er en patogen form af *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4. Der foretages isolering fra planter med symptomer, ved at der 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 3). Der foretages isolering fra suspensionen ved udpladning eller afstrygning på MTNA og YPGA (tillæg 5), der inkuberes i 3-5 dage ved 21-23 °C, og der observeres, om der forekommer typiske *C. m.* subsp. *sepedonicus*-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
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederlandene
Planteforsk, Plantevernet	Ås	Norge
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenien
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien

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

Tillæg 2

Forberedelse af positive og negative kontroller til de principielle screeningtest PCR/IF og FISH

Der fremstilles en 72-timers kultur af en virulent stamme af *C. m.* subsp. *sepedonicus* (NCPPB 4053 eller PD 406) på MTNA-grundmedie, og den suspenderes i 10 mM fosfatbuffer for at opnå en celletæthed på ca. 1-2 × 10^8 cfu pr. ml. Det opnås normalt ved en svagt uklar suspension, der svarer til en optisk densitet på 0,20 ved 600 nm.

Navleender udskæres af 200 knolde, af en lys sort, som vides at være fri for *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* til det første eppendorfrør. Eppendorfrøret vortexes.

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

De seks kontaminerede eppendorfrør anvendes som positive kontroller. De fire ikke-kontaminerede eppendorfrør anvendes som negative kontroller. Eppendorfrørene mærkes med 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* 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 *C. m.* subsp. *sepedonicus* mindst påvises i de positive kontroller med 10^6 og 10^4 celler pr. ml og ikke i nogen af de negative kontroller.

Tillæg 3

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_2HPO_4 (vandfri)	4,26 g
KH_2PO_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:

	Formål	Mængde (pr. l)
Lubrolflager	Antiflokkuleringsmiddel (*)	0,5 g
DC-siliconeantiskum	Antiskummiddel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrophosphat	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (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 koncentration til en pellet ved centrifugering.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilleret vand	1,00 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 saltvand med fosfatbuffer (PBS), pH 7,2)*

Denne buffer benyttes til fortynding af antistoffer.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	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-bufferen.

2.3. *Glycerol med fosfatbuffer, pH 7,6*

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

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destilleret vand	100 ml

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

Tillæg 4

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

$s = \pi i^2/4G^2K^2$ hvor i = synsfeltkoefficienten (afhænger af okulartype og varierer fra 8 til 24)
K = rørkoefficienten (1 eller 1,25)
G = objektivets forstørrelse (100x, 40x 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 fortyndingssfaktor.

Tillæg 5

Medier til isolering og dyrkning af C. m. subsp. sepedonicus

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.

Næringsagar med dextrose (NDA)

Difco Bacto Nutrient Agar indeholdende 1 % D(+)-glucose (monohydrat). Der steriliseres ved autoklavering ved 115 °C i 20 minutter.

Gær-pepton-glucoseagar (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.

Gærekstraktmedie med mineralsalte (YGM)

Bacto-gærekstrakt (Difco)	2,0 g
D(+)-glucose (monohydrat)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto-agar (Difco)	18 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og der steriliseres 0,5 l af mediet ved autoklavering ved 115 °C i 20 min.

b) Validerede selektive vækstmedier

MTNA-medie

Medmindre andet er anført, er alle mediekomponenterne fra BDH.

Gærekstrakt (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g

KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid nr. 1)	16,0 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og pH-værdien justeres til 7,2. Efter autoklavering (ved 121 °C i 15 min.) og nedkøling til 50 °C tilsættes følgende antibiotika: trimethoprim 0,06 g, nalidixinsyre 0,002 g og amphotericin B 0,01 g.

Stamopløsninger af antibiotika: trimethoprim (Sigma) og nalidixinsyre (Sigma) (begge på 5 mg/ml) i 96 % methanol, amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) i dimethylsulfoxid. Stamopløsninger filtersteriliseres.

NB:

Et grundmedies holdbarhed er 3 måneder. Efter at der er tilsat antibiotika, er holdbarheden 1 måned, når den opbevares på køl.

NCP-88-medie

Næringsagar (Difco)	23 g
Gærekstrakt (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,25 g
Destilleret vand	1,0 l

Ingredienserne opløses, og pH-værdien justeres til 7,2. Efter autoklavering og nedkøling til 50 °C tilsættes følgende antibiotika: polymyxin B sulfat (Sigma) 0,003g, nalidixinsyre (Sigma) 0,008 g og cycloheximid (Sigma) 0,2 g.

Antibiotika opløses i stamopløsninger som følger: nalidixinsyre i 0,01 M NaOH, cycloheximid i 50 % ethanol og polymyxin B sulfat i destilleret vand. Stamopløsninger filtersteriliseres.

NB:

Et grundmedies holdbarhed er 3 måneder. Efter at der er tilsat antibiotika, er holdbarheden 1 måned, når den opbevares på køl.

Tillæg 6

Valideret PCR-protokol og validerede reagenser

NB:

Indledende test med denne metode skal muliggøre reproducerbar påvisning af 10^3-10^4 celler af *C. m.* subsp. *sepedonicus* pr. ml prøveekstrakt.

Indledende test bør endvidere ikke give falsk positive resultater med et udvalg af forskellige bakteriestammer.

1. **Multiplex-PCR-protokol med intern PCR-kontrol (Pastrik, 2000)**

1.1. *Oligonukleotidprimere*

Forward primer PSA-1	5′- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3′
Reverse primer PSA -R	5′- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3′
Forward primer NS-7-F	5′- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3′
Reverse primer NS-8-R	5′- tcc gca ggt tca cct acg ga -3′

Forventet amplikonstørrelse fra *C. m.* subsp. *sepedonicus*dna = 502 bp (PSA-primersæt)

Forventet amplikonstørrelse fra den interne PCR-kontrol (18S rRNA) = 377 bp (NS-primersæt)

1.2. *PCR-mastermix*

Reagens	Mængde pr. reaktion	Slutkoncentration
Sterilt ultrarent vand	15,725 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 %
d-nTP-blanding (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Taq-polymerase (5U/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 eller Gold) og Gibco BRL.

(2) Koncentration af primere NS-7 F og NS-8-R blev optimeret til ekstraktion fra navleenden ved homogeniseringsmetoder og oprensning i overensstemmelse med Pastrik (2000) (se afsnit 6.1.a) og 6.2). Det er nødvendigt med en ny optimering af reagenskoncentrationer, hvis der benyttes ekstraktion ved rystning eller andre dna-isoleringsmetoder.

1.3. *PCR-reaktionsbetingelser*

Følgende program køres:

1 cyklus på	i)	3 min. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
10 cykler på	ii)	1 min. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
	iii)	1 min. ved 64 °C (annealing af primere)
	iv)	1 min. ved 72 °C (forlængelse af kopi)

25 cykler på	v)	30 sek. ved 95 °C (denaturering af dna-template)
	vi)	30 sek. ved 62 °C (annealing af primere)
	vii)	1 min. ved 72 °C (forlængelse af kopi)
1 cyklus på	viii)	5 min. ved 72 °C (yderligere forlængelse)
	ix)	henstand ved 4 °C.

NB:

Dette program er optimeret til anvendelse med et MJ Research PTC 200-PCR-apparat. Det kan være nødvendigt at ændre varigheden af cyklerne ii), iii) iv), v), vi) og vi i) ved anvendelse af andre modeller.

1.4. *Restriktionsenzymanalyse af amplikon*

PCR-produkter, der er amplificeret fra *C. m.* subsp. *sepedonicus*-dna, giver en distinktiv restriktionsfragmentlængde-polymorfisme med enzym Bgl II efter inkubation ved 37 °C i 30 min. Størrelsen på restriktionsfragmenterne fra det *C. m.* subsp. *sepedonicus*-specifikke fragment er 282 bp og 220 bp.

2. Fremstilling af loadingbuffer

2.1. *Bromphenolblå (10 % stamopløsning)*

Bromphenolblå	5 g
Destilleret vand (dobbeltdestilleret)	50 ml

2.2. *Loadingbuffer*

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

3. 10x tris-acetat-EDTA-buffer (TAE-buffer), pH 8,0

Tris-buffer	48,4 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**

Cms-specifik probe CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Ikke-specifik eubakteriel probe EUB-338-FITC:	5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fikseringsopløsning**

[ADVARSEL! FIKSERINGSOPLØSNINGEN INDEHOLDER PARAFORMALDEHYD, DER ER TOKSISK. BÆR HANDSKER, OG UNDGÅ AT INDÅNDE PRODUKTET. DET TILRÅDES AT ARBEJDE I ET 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 1 N 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 PARAFORMALEDHYD.]

iii) Opløsningen filtreres gennem et 0,22 µm membranfilter og holdes støvfri ved 4 °C, indtil den skal anvendes igen.

iv) *NB:*

Som alternativ fikseringsvæske kan anvendes 96 % ethanol.

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 %
Probe EUB 338	5 ng/µl
Probe CMSCY301	5 ng/µl

Der forberedes hybridiseringsopløsning i mængder, der er i overensstemmelse med beregningerne i skemaet. For hvert objektglas (med 2 forskellige prøver i duplikat) skal der bruges 90 µl hybridiseringsopløsning.

Skema: Foreslåede mængder til forberedes af hybridiseringsblanding

	2 objektglas	8 objektglas
Sterilt ultrarent vand	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Probe CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Volumen i alt (µl)	90,0	360,0

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

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

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilleret vand	1,00 l

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

Tillæg 8

Dyrkning af ægplanter

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

Ægplanterne bør dyrkes i drivhus under følgende vækstbetingelser:

Daglængde:	14 timer eller den naturlige daglængde, hvis denne er på mere end 14 timer
Temperatur:	21-24 °C om dagen
	15 °C om natten.

Modtagelige ægplantesorter:	»Black Beauty«
	»Long Tom«
	»Rima«
	»Balsas«.

Leverandør: se webstedet http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

---

Tillæg 9

Gram-farvningsprocedure (Huckers modifikation) (Doetsch, 1981) ([1])

Krystalviolet-opløsning

2 g krystalviolet opløses i 20 ml 95 % ethanol.

0,8 g ammoniumoxalat opløses i 80 ml destilleret vand.

De to opløsninger blandes.

Lugols jodopløsning

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destilleret vand	300 ml

De to masser røres sammen i en morter. Vandet hældes i, og der omrøres i en lukket beholder, indtil opløsning har fundet sted.

Safranin-kontrastfarveopløsning

Stamopløsning:

Safranin O	2,5 g
95 % ethanol	100 ml

Der blandes og henstilles.

Der opløses i forholdet 1:10 for at få en brugsopløsning.

Farvningsprocedure

1. Udstrygningspræparater, lufttørring og varmefiksering forberedes.
2. Objektglas overhældes med krystalviolet-opløsningen i 1 min.
3. Der skylles kort med hanevand.
4. Der overhældes med Lugols jodopløsning i 1 min.
5. Der skylles med hanevand og duppes tørt.
6. Farve fjernes med 95 % ethanol, tilført dråbevis, indtil farve ikke længere forsvinder, eller der foretages nedsænkning og let omrysten i 30 sekunder.
7. Der skylles med hanevand og duppes tørt.
8. Der overhældes med safranin-opløsning i 10 sek.
9. Der skylles med hanevand og duppes tørt.

Gram-positive bakterier farves blåviolette; gram-negative bakterier farves lyserøde.

([1]) Det er muligt at anvende opløsninger og farvningskit, som findes i handelen.

LITTERATURHENVISNINGER

1. Anonym, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Kommissionen for De Europæiske Fællesskaber, Luxembourg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. 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.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.
16. Pastrik, K.-H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.
17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.
24. 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.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

BILAG II

1. I ethvert tilfælde af mistanke om forekomst, hvor screening efter metoderne i bilag I har givet positivt resultat, og der afventes bekræftelse eller afkræftelse efter gennemførelsen af de nævnte metoder, bør nedennævnte tilbageholdes 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,

   og

   — 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 skadegørerens tilstedeværelse tilbageholdes nedennævnte og opbevares hensigtsmæssigt:

   — det i punkt 1 nævnte materiale,

   og

   — en prøve af det inficerede ægplantemateriale, der blev podet med knold- eller planteekstrakt,

   og

   — den isolerede skadegørerkultur,

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

BILAG III

1. Følgende elementer tages i betragtning ved bestemmelsen af omfanget af en sandsynlig infektion som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra b):

   — knolde eller planter, der er dyrket på et produktionssted, som er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a)

   — et eller flere produktionssteder med en vis produktionsmæssig tilknytning til de knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), herunder dem, der deler produktionsudstyr og -faciliteter direkte eller ved en maskinstation

   — knolde eller planter, der er produceret på produktionssteder som omhandlet i foregående led, eller som befandt sig på sådanne produktionssteder i den periode, hvor de knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), befandt sig på produktionsstedet som omhandlet i første led

   — kartoffeloplagringssteder, der håndterer kartofler fra de i de foregående led omhandlede produktionssteder

   — maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder deraf og alle andre genstande, herunder emballage, der kan have været i kontakt med knolde eller planter, som er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a)

   — knolde eller planter, der har været opbevaret i eller været i kontakt med nogen af de anlæg eller genstande, som er anført i foregående led, inden disse anlæg og genstande blev rengjort og desinficeret

   — som resultat af testene i henhold til artikel 6 knolde eller planter med samme klonale oprindelse som knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), og med hensyn til hvilke undersøgelser viser, at de sandsynligvis er inficeret. Der kan foretages sortsafprøvning for at verificere de inficerede og klonbeslægtede knolde eller planters identitet

   — det eller de steder, hvor de knolde eller planter, der er omhandlet i det foregående led, er produceret.

2. Følgende elementer tages i betragtning ved bestemmelsen af den mulige udbredelse som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra c):

   — nærheden af andre produktionssteder, hvor der dyrkes kartofler eller andre værtsplanter

   — fælles produktion og anvendelse af læggekartoffelmateriale.

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 I, meddeles mindst følgende:

      — sortsnavnet på kartoffelpartiet

      — typen (spisekartofler, læggekartofler osv.), og, hvis det er relevant, læggekartoffelkategorien.

   — Når der er risiko for infektion af kartofler, der kommer fra eller er på vej til andre medlemsstater, skal den medlemsstat, hvori det mistænkte tilfælde er blevet bekræftet, straks meddele vedkommende medlemsstat(er) de oplysninger, der er nødvendige for at efterkomme artikel 5, stk. 3, herunder:

      — sortsnavnet på kartoffelpartiet

      — afsenders og modtagers navn og adresse

      — kartoffelpartiets leveringsdato

— det leverede kartoffelpartis størrelse

— 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, hvis der er givet sådanne oplysninger.

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

— dato for bekræftelse af infektion

— en kort beskrivelse af den undersøgelse, der er foretaget for at identificere kilden og infektionens mulige udbredelse, herunder angivelse af omfanget af prøveudtagninger

— oplysninger om den/de identificerede eller formodede infektionskilde(r)

— nærmere oplysninger om omfanget af den erklærede infektion, herunder antal produktionssteder og antal partier med oplysning om sort og, hvis det drejer sig om læggekartofler, kategori

— nærmere oplysninger om områdeafgrænsningen, herunder antallet af produktionssteder, der ikke er erklæret inficerede, men som hører under området

— andre oplysninger om det/de bekræftede angreb, som Kommissionen måtte ønske.

BILAG IV

1. Foranstaltningerne under officielt tilsyn som omhandlet i artikel 7, stk. 1, omfatter:

— anvendelse til foder efter en varmebehandling, sådan 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 patogenet spredes til miljøet, f.eks. via udsivning til 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 desinfektion 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 V til dette direktiv.

2. Passende anvendelse eller bortskaffelse af knolde og planter, som er erklæret for sandsynligvis inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra b), og som omhandlet i artikel 7, stk. 2, under tilsyn af de pågældende medlemsstaters officielle ansvarlige organer og med passende kommunikation mellem de officielle ansvarlige organer for at sikre sådant tilsyn på ethvert tidspunkt og godkendelse fra de officielle ansvarlige organer 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:

— 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 desinfektion og med faciliteter til rengøring og desinfektion 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.

3. De passende metoder til rengøring og desinfektion af de genstande, der omhandles i artikel 7, stk. 3, er dem, for hvilke det er fastslået, at der ikke er nogen påviselig risiko for, at skadegøreren spredes, og at de anvendes under tilsyn af medlemsstaternes officielle ansvarlige organer.

4. Den række foranstaltninger, der skal træffes af medlemsstaterne i det afgrænsede område, jf. artikel 5, stk. 1, litra c), og artikel 7, stk. 4, omfatter følgende:

4.1. For produktionssteder, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), gælder følgende:

a) På marker, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a):

i) — i mindst de første tre vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om angreb

— træffes der foranstaltninger til at udrydde gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren

— må der ikke plantes kartoffelknolde, -planter eller egentlige læggekartofler eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren eller planter, for hvilke det er fastslået, at der er en påviselig risiko for, at skadegøreren spredes

— må der i den første kartoffeldyrkningssæson efter den i foregående led nævnte periode kun produceres spise-, foder- eller industrikartofler, dog kun på betingelse af at marken er fundet fri for gengroninger eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren i mindst to på hinanden følgende vækstår forud for udplantning, og de høstede knolde skal testes efter proceduren i bilag I

— kan der i den kartoffeldyrkningssæson, 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, lægges kartofler til produktion af læggekartofler eller andre kartofler, og der skal foretages en officiel undersøgelse som beskrevet i artikel 2, stk. 1, eller

ii) — i de første fire vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion

— træffes der foranstaltninger til at udrydde gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren

— braklægges marken og bevares som brakmark eller omdannes til og bevares som permanent græsareal med hyppig tæt klipning eller intensiv græsning

— må der i den første kartoffeldyrkningssæson efter den i foregående led nævnte periode produceres læggekartofler eller andre kartofler, dog kun på betingelse af at marken er fundet fri for gengroninger eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren i mindst to på hinanden følgende vækstår forud for udplantning, og de høstede knolde skal testes efter proceduren i bilag I.

b) På alle andre marker på det inficerede produktionssted, forudsat at de officielle ansvarlige organer har forvisset sig om, at risikoen for gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren er fjernet:

— i det første vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion, må der enten ikke plantes kartoffelknolde, -planter eller egentlige læggekartofler eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, eller

— må der kun lægges certificerede læggekartofler til avl af spise-, foder- eller industrikartofler

— i det andet vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion, må der kun lægges certificerede læggekartofler eller læggekartofler, der er officielt testet for ringbakteriose og er dyrket under officielt tilsyn på andre produktionssteder end dem, der er omhandlet i punkt 4.1, til avl af læggekartofler eller andre kartofler

— i mindst det tredje vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion, må der kun lægges certificerede læggekartofler eller læggekartofler, der er dyrket under officielt tilsyn af certificerede læggekartofler, til avl af læggekartofler eller andre kartofler

— 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, og der skal i alle kartoffelmarker gennemføres en officiel test af de høstede kartofler efter proceduren i bilag I.

c) Umiddelbart efter erklæringen om infektion, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), og efter det førstfølgende vækstår skal alle maskiner og lagerfaciliteter på produktionsstedet, der benyttes i kartoffelproduktionen, efter omstændighederne rengøres og desinficeres, hvor relevant, ved hjælp af passende metoder som beskrevet i punkt 3.

d) I en enhed med beskyttet planteproduktion, hvor det er muligt helt at udskifte vækstmediet

— må der ikke plantes knolde, planter eller egentlige læggekartofler, medmindre produktionsenheden er underkastet foranstaltninger under officielt tilsyn til at udrydde skadegøreren og fjerne alt værtsplantemateriale, herunder mindst en fuldstændig udskiftning af vækstmedie og rengøring og desinfektion af produktionsenheden og alt udstyr, og de officielle ansvarlige organer derefter har godkendt, at der produceres kartofler

— skal kartoffelproduktionen foregå med certificerede læggekartofler eller miniknolde eller mikroplanter, der hidrører fra testet materiale.

4.2. Inden for det afgrænsede område skal medlemsstaterne, uden at det berører foranstaltningerne i punkt 4.1:

a) omgående efter erklæringen om infektion sikre rengøring og desinfektion, hvor relevant, af maskiner og lagre på sådanne steder, der indgår i kartoffelavl, ved hjælp af passende metoder som beskrevet i punkt 3

b) omgående efter erklæringen om infektion og i mindst tre vækstsæsoner herefter:

— sørge for, at deres officielle ansvarlige organer fører tilsyn med steder, hvor der dyrkes, opbevares og håndteres kartofler, samt med steder, hvor der i øvrigt anvendes kartoffelmaskineri

— kræve, at der kun lægges certificerede læggekartofler eller læggekartofler dyrket under officielt tilsyn til al kartoffeldyrkning inden for området, og at læggekartoffelafgrøden, der er dyrket på produktionssteder, der er erklæret sandsynligvis inficeret i henhold til artikel 5, stk. 1, litra b), testes efter høsten

— kræve, at alle høstede læggekartofler håndteres særskilt fra andre kartofler overalt i området, eller at der gennemføres rengøring og desinfektion mellem håndtering af læggekartofler og håndtering af andre kartofler

— foretage en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1

c) om fornødent opstille et program for udskiftning af alle læggekartofler i løbet af en passende periode.

BILAG V

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 IV:

i) Bortskaffelse af kartoffelaffald (herunder kartoffelskræller og kasserede kartofler) og alt andet fast affald forbundet med kartoflerne (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. 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. 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 inficerede partier.