

RICHTLINIE 2006/63/EG DER KOMMISSION**vom 14. Juli 2006****zur Änderung der Anhänge II bis VII der Richtlinie 98/57/EG des Rates zur Bekämpfung von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.***

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 98/57/EG des Rates vom 20. Juli 1998 zur Bekämpfung von *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 11,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Ein für Kartoffeln und Tomaten gefährlicher Schadorganismus ist *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, der Erreger der Schleimkrankheit (Bakterielle Braunfäule) der Kartoffel und der Bakteriellen Welke an Kartoffeln und Tomaten (im Folgenden „Schadorganismus“ genannt).
- (2) In einigen Teilen der Gemeinschaft tritt der Schadorganismus nach wie vor auf.
- (3) Mit der Richtlinie 98/57/EG des Rates wurde im Einzelnen festgelegt, welche Maßnahmen die Mitgliedstaaten treffen müssen, um den Schadorganismus zu lokalisieren und das Ausmaß seiner Verbreitung zu ermitteln, sein Auftreten und seine Verschleppung zu verhindern und ihn, soweit er tatsächlich festgestellt wird, im Interesse der Tilgung zu bekämpfen und seine Ausbreitung zu verhüten.
- (4) Seither hat es in Bezug auf die Biologie und die Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung des Schadorganismus bedeutende neue Entwicklungen gegeben. Darüber hinaus machen die bisherigen Erfahrungen mit der Bekämpfung des Schadorganismus die Überarbeitung bestimmter technischer Aspekte der Bekämpfungsmaßnahmen erforderlich.
- (5) Angesichts der genannten Entwicklungen sollten die in bestimmten Anhängen der Richtlinie 98/57/EG vorgesehenen Maßnahmen überarbeitet und aktualisiert werden.
- (6) Die Nachweis- und Identifizierungsverfahren wurden durch eine neue Nachweismethode, die „Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung“ (FISH) ergänzt. Die Polymerase-Kettenreaktions-Methode (PCR) sowie bestimmte technische

Punkte des geltenden Nachweis- und Identifizierungsverfahrens wurden verbessert und Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung des Schadorganismus in anderen Wirtspflanzen als Kartoffeln sowie in Wasser und Boden eingeführt.

- (7) Auch die Bekämpfungsmaßnahmen werden unter bestimmten technischen Gesichtspunkten verbessert, namentlich — zur Rückverfolgbarkeit des Schadorganismus — der Art und Weise der Konservierung getesteter Proben, der zur Feststellung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination erforderlichen Daten, der Einzelheiten der Mitteilung eines bestätigten Auftretens des Schadorganismus und der betreffenden Befallszone sowie der Maßnahmen, die an als kontaminiert ausgewiesenen Produktionsorten und innerhalb der abgegrenzten Sicherheitszonen durchzuführen sind. Darüber hinaus wurden Bestimmungen für Tomaten eingeführt, um der Bedeutung der Tomate als Wirtspflanze für den Schadorganismus verstärkt Rechnung zu tragen.
- (8) Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für Pflanzenschutz —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Die Anhänge II bis VII der Richtlinie 98/57/EG erhalten die Fassung des Anhangs der vorliegenden Richtlinie.

Artikel 2

- (1) Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen bis spätestens 31. März 2007 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie teilen der Kommission unverzüglich den Wortlaut dieser Rechtsvorschriften mit und fügen eine Entsprechungstabelle dieser Rechtsvorschriften und der vorliegenden Richtlinie bei.

Sie wenden diese Vorschriften ab 1. April 2007 an.

Bei Erlass dieser Vorschriften nehmen die Mitgliedstaaten in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf die vorliegende Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

⁽¹⁾ ABl. L 235 vom 21.8.1998, S. 1.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission unverzüglich den Wortlaut der wichtigsten innerstaatlichen Vorschriften mit, die sie auf dem unter die vorliegende Richtlinie fallenden Gebiet erlassen.

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 14. Juli 2006.

Für die Kommission
Markos KYPRIANOU
Mitglied der Kommission

ANHANG

„ANHANG II

TESTSCHEMA FÜR DIE DIAGNOSE, DEN NACHWEIS UND DIE IDENTIFIZIERUNG VON RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

ANWENDUNGSBEREICH DES TESTSCHEMAS

Das folgende Testschema beschreibt die verschiedenen Verfahren:

- i) zur Diagnose der Schleimkrankheit (Bakteriellen Braunfäule) bei Kartoffelknollen und der Bakteriellen Welke bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen und einigen anderen Wirtspflanzen;
- ii) zum Nachweis von *Ralstonia solanacearum* in Proben von Kartoffelknollen, Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen, Wasser und Boden;
- iii) zur Identifizierung von *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

INHALT

	Seite
	Grundregeln
	40
ABSCHNITT I:	Anwendung des Testschemas
	40
	1. Nachweisverfahren zur Diagnose der Bakteriellen Braunfäule und der Bakteriellen Welke (<i>R. solanacearum</i>) in Kartoffelknollen und Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen mit Symptomen der Bakteriellen Braunfäule oder der Bakteriellen Welke
	40
	2. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Proben symptomfreier Kartoffelknollen
	43
	3. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Proben symptomfreien Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen
	46
ABSCHNITT II:	Detaillierte Beschreibung der Methoden zum Nachweis von <i>R. solanacearum</i> in Kartoffelknollen und Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen mit Symptomen der Bakteriellen Braunfäule oder der Bakteriellen Welke
	48
	1. Symptome
	48
	2. Schnell-Screeningtests
	48
	3. Isolierungsverfahren
	49
	4. Tests zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i>
	49
ABSCHNITT III:	1. Detaillierte Beschreibung der Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Proben symptomfreier Kartoffelknollen
	49
	1.1. Probenaufbereitung
	49
	1.2. Testung
	51
	2. Detaillierte Beschreibung der Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Proben von symptomfreien Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen
	51
	2.1. Probenaufbereitung
	51
	2.2. Testung
	52
ABSCHNITT IV:	1. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Wasser
	53
	2. Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> in Wasser
	55
	2.1. Probenaufbereitung
	55
	2.2. Testung
	55
ABSCHNITT V:	1. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> im Boden
	56
	2. Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von <i>R. solanacearum</i> im Boden
	58
	2.1. Probenaufbereitung
	58
	2.2. Testung
	58

	Seite
ABSCHNITT VI: Optimierte Protokolle für den Nachweis und die Identifizierung von <i>R. solanacearum</i>	58
A. Diagnose- und Nachweistests	58
1. Gefäßbündeltest	58
2. Nachweis von Poly- β -hydroxybutyrat-Granula	58
3. Serologische Agglutinationstests	59
4. Selektive Isolierung	60
4.1. Selektivausstrich	60
4.2. Anreicherungsverfahren	60
5. Immunofluoreszenztest (IF-Test)	61
6. Polymerase-Kettenreaktionstest (PCR-Test)	64
6.1. DNA-Reinigungsmethoden	65
a) Methode nach Pastrik (2000)	65
b) Andere Methoden	65
6.2. PCR	66
6.3. Analyse des PCR-Produktes	66
7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Test (FISH-Test)	67
8. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	69
a) Indirekter ELISA	69
b) DASi (Double Antibody Sandwich Indirect) ELISA	70
9. Biotest	71
B. Identifizierungstests	72
1. Nähr- und enzymatische Tests zur Identifizierung	72
2. IF-Test	72
3. ELISA-Test	73
4. PCR-Test	73
5. FISH-Test	73
6. Bestimmung des Fettsäureprofils (FAP)	73
7. Stammcharakterisierungsmethoden	73
7.1. Biovarbestimmung	73
7.2. Genetischer Fingerabdruck	74
7.3. PCR-Methoden	74
C. Bestätigungstest	74
Anlage 1 An der Optimierung und Validierung von Protokollen beteiligte Laboratorien	76
Anlage 2 Medien zur Isolierung und Kultivierung von <i>R. solanacearum</i>	77
Anlage 3 A. Handelsübliches standardisiertes Kontrollmaterial	79
B. Vorbereitung der Kontrollen	80
Anlage 4 Puffer für Testverfahren	82
Anlage 5 Ermittlung des Kontaminationsgrads im IF- und FISH-Test	85
Anlage 6 Validierte PCR-Protokolle und -Reagenzien	86
Anlage 7 Validierte Reagenzien für den FISH-Test	91
Anlage 8 Tomaten- und Auberginenkultivierung	93
Bibliographie	94

GRUNDREGELN

Optimierte Protokolle für die verschiedenen Methoden, validierte Reagenzien und die Einzelheiten für die Vorbereitung der Test- und Kontrollmaterialien sind in den Anlagen festgelegt. Anlage 1 enthält eine Liste der an der Optimierung und Validierung von Protokollen beteiligten Laboratorien.

Da die Protokolle dem Nachweis eines Quarantäneschadorganismus dienen und als Kontrollmaterialien lebensfähige Kulturen von *R. solanacearum* voraussetzen, müssen die Testverfahren in geeigneten Quarantäneeinrichtungen durchgeführt werden, die über angemessene Abfallentsorgungsanlagen und über eine entsprechende Zulassung durch die für Pflanzenquarantäne zuständige Behörde verfügen.

Die Testparameter müssen den eindeutigen und reproduzierbaren Nachweis von *R. solanacearum* auf den für die gewählten Methoden vorgegeben Schwellenwerten gewährleisten.

Die präzise Vorbereitung der Positivkontrollen ist unerlässlich.

Das Testen auf der Grundlage vorgegebener Schwellenwerte erfordert auch eine korrekte Einstellung, Wartung und Eichung der Testgeräte, den sorgfältigen Umgang mit und die Aufbewahrung von Reagenzien sowie Vorkehrungen zur Verhütung der Kontamination zwischen Proben, beispielsweise durch Trennung der Positivkontrollen von Testproben. Zur Vermeidung administrativer und sonstiger Fehler, insbesondere bei der Etikettierung und Dokumentierung, sind Qualitätskontrollen durchzuführen.

Ein Verdachtsfall im Sinne von Artikel 4 Absatz 2 der Richtlinie 98/57/EG setzt ein positives Ergebnis der Diagnose- oder Screeningtests an einer Probe nach den Vorgaben der Flussdiagramme voraus. Fällt der erste Screeningtest (IF- oder PCR-/FISH-Test, selektive Isolierung) positiv aus, so ist er durch einen zweiten Screeningtest, der auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruht, zu bestätigen.

Fällt der erste Screeningtest positiv aus, so besteht Verdacht auf Kontamination mit *R. solanacearum*, und es muss ein zweiter Screeningtest durchgeführt werden. Fällt dieser zweite Test ebenfalls positiv aus, so gilt der Verdacht als bestätigt (Befallsverdacht) und die im Flussdiagramm vorgegebenen Tests müssen fortgesetzt werden. Fällt der zweite Screeningtest negativ aus, so gilt die Probe als nicht kontaminiert.

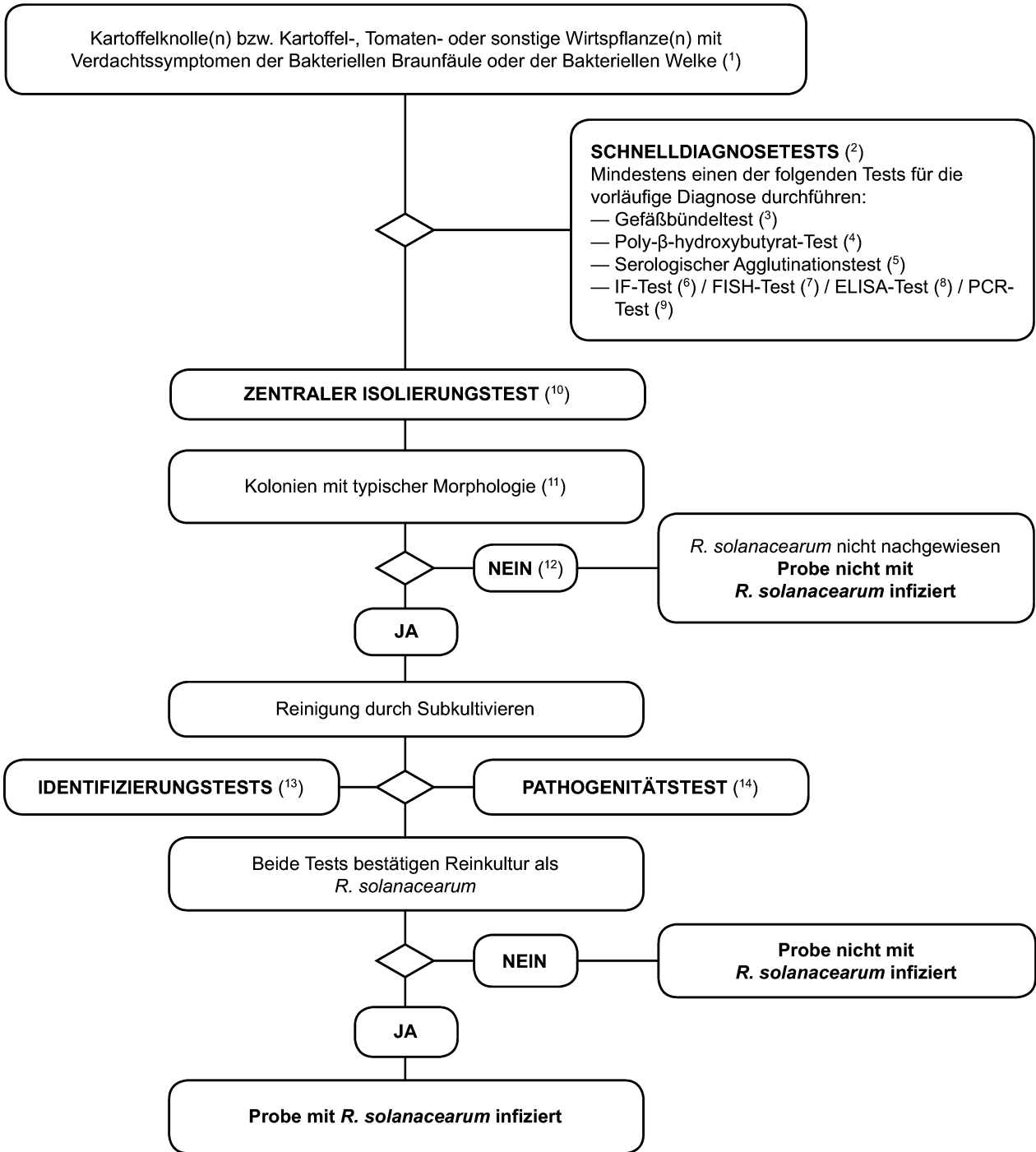
Ein bestätigter Verdacht im Sinne von Artikel 5 Absatz 1 der Richtlinie 98/57/EG erfordert die Isolierung und Identifizierung einer *R. solanacearum*-Reinkultur und die Bestätigung der Pathogenität.

ABSCHNITT I

ANWENDUNG DES TESTSCHEMAS

1. Nachweisverfahren zur Diagnose der Bakteriellen Braunfäule und der Bakteriellen Welke (*Ralstonia solanacearum*) in Kartoffelknollen und Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen mit Symptomen der Bakteriellen Braunfäule oder der Bakteriellen Welke

Das Testverfahren ist für Kartoffelknollen und -pflanzen geeignet, die typische oder verdächtige Symptome der Schleimkrankheit oder der Bakteriellen Welke aufweisen. Es umfasst einen Schnell-Screeningtest, die Isolierung des Erregers aus infiziertem Gefäßgewebe auf (selektiven) Medien und — bei positivem Ergebnis — die Identifizierung der Kultur als *Ralstonia solanacearum*.



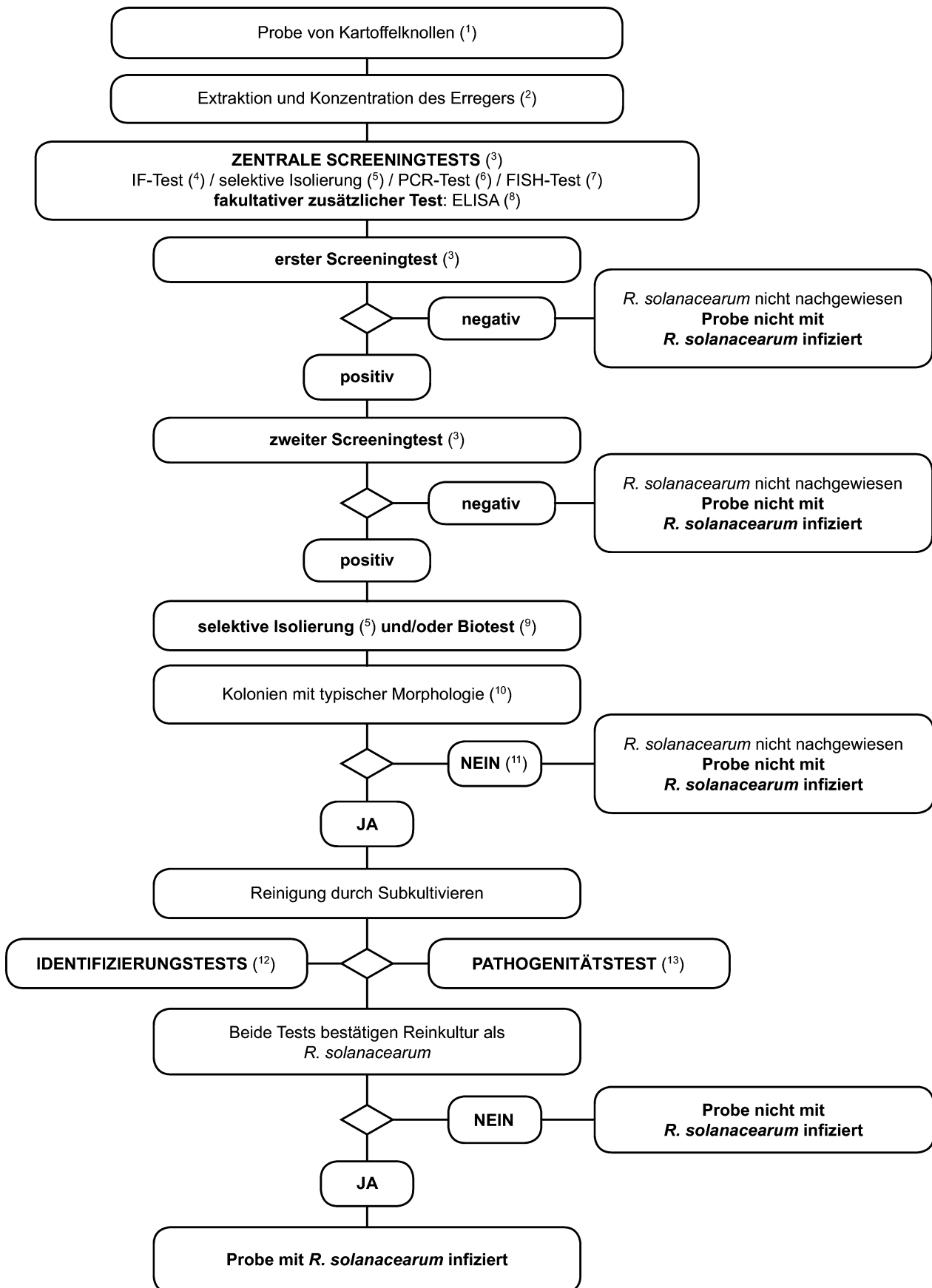
- (¹) Beschreibung der Symptome in Abschnitt II.1.
- (²) Schnell-Diagnostetests erleichtern die vorläufige Diagnose, sind jedoch nicht unbedingt erforderlich. Ein negatives Ergebnis garantiert nicht immer, dass kein Erreger vorhanden ist.
- (³) Beschreibung des Gefäßbündeltests (Austritt von Bakterien Schleim aus dem vaskulären Stängelgewebe) in Abschnitt VI.A.1.
- (⁴) Beschreibung des Tests für den Nachweis von Poly- β -hydroxybutyrat-Granula in bakteriellen Zellen in Abschnitt VI.A.2.
- (⁵) Beschreibung des serologischen Agglutinationstests an Bakterien Schleim oder Extrakten aus symptomatischem Gewebe in Abschnitt VI.A.3.
- (⁶) Beschreibung des IF-Tests an in Wasser suspendiertem Bakterien Schleim oder Extrakten aus symptomatischem Gewebe in Abschnitt VI.A.5.
- (⁷) Beschreibung des FISH-Tests an in Wasser suspendiertem Bakterien Schleim oder Extrakten aus symptomatischem Gewebe in Abschnitt VI.A.7.
- (⁸) Beschreibung des ELISA-Tests an in Wasser suspendiertem Bakterien Schleim oder Extrakten aus symptomatischem Gewebe in Abschnitt VI.A.8.
- (⁹) Beschreibung des PCR-Tests an in Wasser suspendiertem Bakterien Schleim oder Extrakten aus symptomatischem Gewebe in Abschnitt VI.A.6.
- (¹⁰) Der Erreger lässt sich in der Regel relativ einfach durch Verdünnungsausstrich aus Pflanzenmaterial mit typischen Symptomen isolieren (Abschnitt II.3).
- (¹¹) Beschreibung einer typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt II.3.d.
- (¹²) Im fortgeschrittenen Infektionsstadium kann das Kultivieren aufgrund konkurrierender oder überwuchernder saprophytischer Bakterien scheitern. Wenn typische Krankheitssymptome vorliegen, aber der Isolierungstest negativ ausfällt, ist die Isolierung zu wiederholen, vorzugsweise durch Selektivausstrich.
- (¹³) Reinkulturen von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten werden durch die Tests gemäß Abschnitt VI.B verlässlich identifiziert. Eine subspezifische Charakterisierung ist fakultativ, wird jedoch für jeden neuen Fall empfohlen.
- (¹⁴) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt VI.C.

2. **Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von *Ralstonia solanacearum* in Proben symptomfreier Kartoffelknollen**

Grundsatz

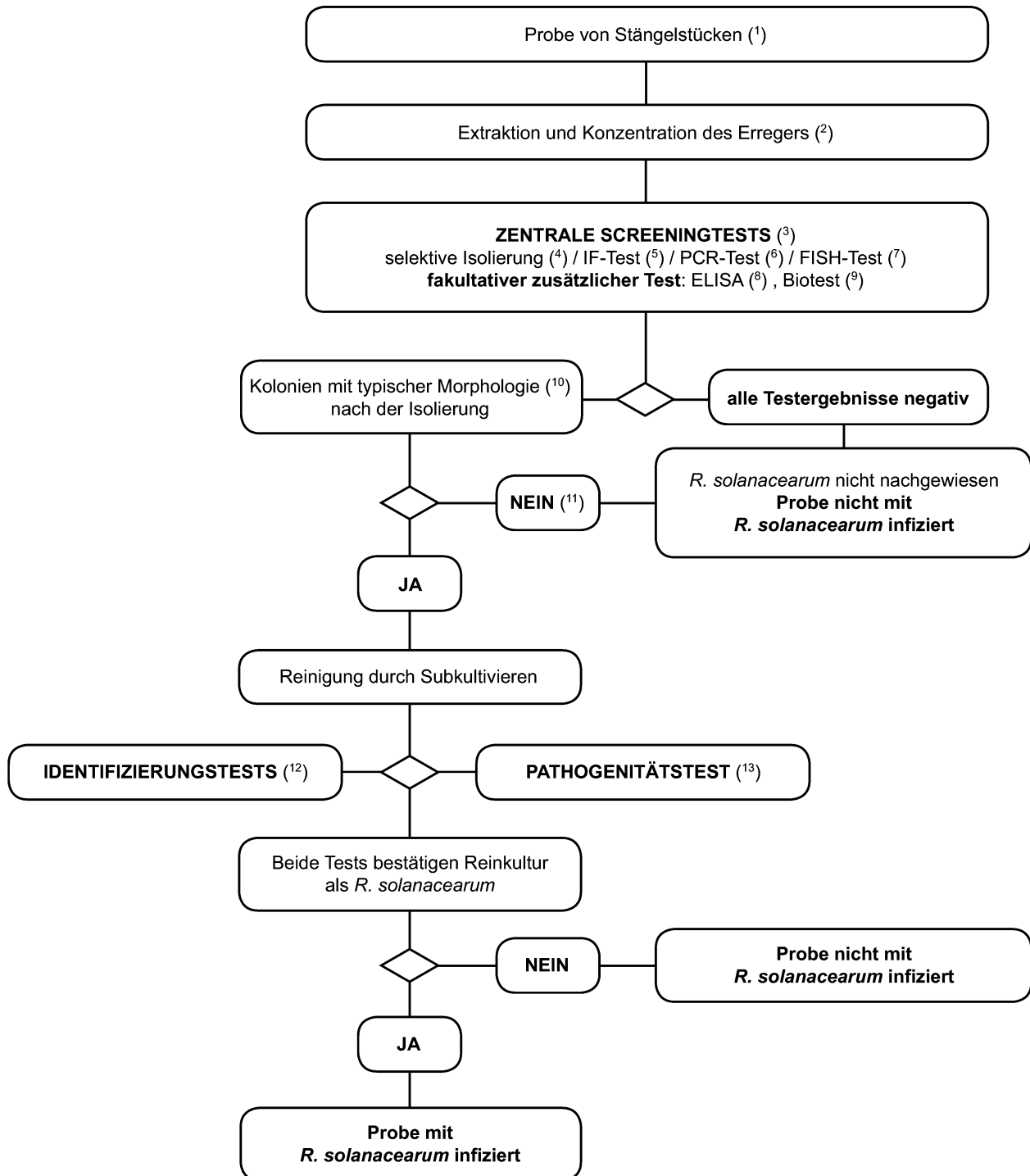
Das Testverfahren dient dem Nachweis latenter Infektionen von Kartoffelknollen. Ein positives Ergebnis bei mindestens zwei Screeningtests ⁽³⁾, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, ist durch Isolierung des Erregers zu bestätigen. Bei Isolierung typischer Kolonien ist eine Reinkultur als *R. solanacearum* zu bestätigen. Ein positiver Screeningtest allein reicht nicht aus, um die Probe als verdächtig einzustufen.

Screeningtests und Isolierungstests müssen eine Nachweisgrenze von 10^3 bis 10^4 Zellen/ml resuspendiertes Pellet gewährleisten, die als Positivkontrollen in jede Testreihe einzubeziehen sind.



- (¹) Eine Standardprobe besteht aus 200 Knollen; das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet.
- (²) Beschreibung von Methoden der Erregerextraktion und -konzentration in Abschnitt III.1.1.
- (³) Fallen mindestens zwei Tests, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, positiv aus, so muss der Erreger isoliert und bestätigt werden. Es ist mindestens ein Screeningtest vorzunehmen. Fällt dieser Test negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Fällt der Test positiv aus, so sind zur Abklärung des ersten positiven Ergebnisses und nach unterschiedlichen biologischen Grundsätzen ein zweiter oder weitere Screeningtests durchzuführen. Fallen der zweite oder andere Tests negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.
- (⁴) Beschreibung des IF-Tests in Abschnitt VI.A.5.
- (⁵) Beschreibung des selektiven Isolierungstests in Abschnitt VI.A.4.
- (⁶) Beschreibung des PCR-Tests in Abschnitt VI.A.6.
- (⁷) Beschreibung des FISH-Tests in Abschnitt VI.A.7.
- (⁸) Beschreibung der ELISA-Tests in Abschnitt VI.A.8.
- (⁹) Beschreibung des Biotests in Abschnitt VI.A.9.
- (¹⁰) Beschreibung der typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt II.3.d.
- (¹¹) Das Kultivieren oder die Biotests können aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Fallen Screeningtests positiv, die Isolierungstests jedoch negativ aus, so sind die Isolierungstests aus demselben Pellet oder durch Entnahme zusätzlichen Gefäßgewebes am Nabelende durchschnittlicher Knollen derselben Probe zu wiederholen; erforderlichenfalls sind weitere Proben zu testen.
- (¹²) Eine Reinkultur von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten wird durch die Tests gemäß Abschnitt VI.B verlässlich identifiziert.
- (¹³) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt VI.C.

3. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von *Ralstonia solanacearum* in Proben von symptomfreien Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen



- (¹) Empfohlene Probengrößen siehe Abschnitt III.2.1.
- (²) Beschreibung von Methoden der Erregerextraktion und -konzentration in Abschnitt III.2.1.
- (³) Fallen mindestens zwei Tests, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, positiv aus, so muss der Erreger isoliert und bestätigt werden. Es ist mindestens ein Screeningtest durchzuführen. Fällt dieser Test negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Fällt der Test positiv aus, so sind zur Abklärung des ersten positiven Ergebnisses und nach unterschiedlichen biologischen Grundsätzen ein zweiter oder weitere Screeningtests durchzuführen. Fallen der zweite oder andere Tests negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.
- (⁴) Beschreibung des selektiven Isolierungstests in Abschnitt VI.A.4.
- (⁵) Beschreibung des IF-Tests in Abschnitt VI.A.5.
- (⁶) Beschreibung der PCR-Tests in Abschnitt VI.A.6.
- (⁷) Beschreibung des FISH-Tests in Abschnitt VI.A.7.
- (⁸) Beschreibung der ELISA-Tests in Abschnitt VI.A.8.
- (⁹) Beschreibung des Biotests in Abschnitt VI.A.9.
- (¹⁰) Beschreibung der typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt II.3.d.
- (¹¹) Das Kultivieren oder die Biotests können aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Fallen Screeningtests positiv, die Isolierungstests jedoch negativ aus, so sind die Isolierungstests zu wiederholen.
- (¹²) Eine Reinkultur von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten wird durch die Tests gemäß Abschnitt VI.B verlässlich identifiziert.
- (¹³) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt VI.C.

ABSCHNITT II

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER METHODEN ZUM NACHWEIS VON RALSTONIA SOLANACEARUM IN KARTOFFELKNOLLEN UND KARTOFFEL-, TOMATEN- UND SONSTIGEN WIRTSPLANZEN MIT SYMPTOMEN DER BAKTERIELLEN BRAUNFÄULE ODER DER BAKTERIELLEN WELKE**1. Symptome** (siehe Website: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)**1.1. Symptome an der Kartoffel**

Die Kartoffelpflanze. In der frühen Phase der Infektion welken die Blätter an der Spitze der Pflanze bei hohen Temperaturen während des Tages und regenerieren nachts. Die Blätter bleiben zu Beginn der Welke zunächst grün, verfärben sich jedoch später gelb und nekrotisieren. Auch kommt es zu einer Epinastie. Die Welke eines Triebes oder der gesamten Pflanze wird schnell irreversibel und führt zum Kollabieren und Absterben der Pflanze. Das Gefäßgewebe in quer durchgeschnittenen Stängeln verwelkter Pflanzen kann braun werden, und aus der Schnittfläche tritt ein milchiges bakterielles Exsudat aus oder kann leicht herausgedrückt werden. Wird ein durchgeschnittener Stängel senkrecht ins Wasser gehalten, so treten aus den Gefäßbündeln Schleimfäden aus.

Die Kartoffelknolle. Die Kartoffelknollen sind am Nabelende quer oder längs durch das Nabelende durchzuschneiden. In der frühen Phase der Infektion zeigt sich eine glasig gelbe bis hellbraune Verfärbung des Gefäßbündelringes, aus dem nach einigen Minuten spontan ein blasses, cremefarbiges Exsudat austritt. Später wird die Verfärbung deutlich braun, und die Nekrose kann sich bis ins parenchymatische Gewebe erstrecken. In fortgeschrittenen Stadien breitet sich die Infektion von den Nabelenden und den Augen aus, aus denen Bakterien Schleim austreten kann, an dem Bodenpartikel haften bleiben. Durch den Zerfall des Gefäßgewebes im Knolleninneren können auf der Schale rötlich-braune, leicht eingesunkene Läsionen entstehen. Im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit ist ein sekundärer Befall mit pilzlicher und bakterieller Weichfäule üblich.

1.2. Symptome an der Tomate

Die Tomatenpflanze. Das erste sichtbare Symptom ist das schwammige Aussehen der jüngsten Blätter. Unter für den Erreger günstigen Bedingungen (Bodentemperatur etwa 25 °C bei gesättigter Luftfeuchtigkeit) wird eine Seite der Pflanze oder die gesamte Pflanze innerhalb weniger Tage von Epinastie und Welke befallen, die zum völligen Absterben der Pflanze führen. Unter weniger günstigen Bedingungen (Bodentemperatur unter 21 °C) ist die Welke geringer, aber es kann sich am Stängel eine große Zahl von Nebentrieben bilden. An der Stängelbasis lassen sich wässrig durchtränkte Streifen beobachten, die ein sichtbares Zeichen der Nekrose des vaskulären Systems sind. Wird der Stängel quer durchgeschnitten, so tritt aus dem braun verfärbten Gefäßgewebe des Stängels ein weißer oder gelblicher Bakterien Schleim aus.

1.3. Symptome an anderen Wirtspflanzen

Solanum dulcamara und S. nigrum. Unter natürlichen Bedingungen lassen sich die Welkesymptome an diesen Unkrautwirtspflanzen nur selten beobachten, es sei denn, die Bodentemperatur liegt über 25 °C oder die Inokulumdichte ist äußerst groß (z. B. wenn *S. nigrum* in der Nähe von kontaminierten Kartoffel- oder Tomatenpflanzen wächst). Tritt die Welke auf, so entsprechen die Symptome denen, die bei der Tomate zu beobachten sind. Bei *S.-dulcamara*-Pflanzen ohne Welkeerscheinung, die mit Stängel und Wurzeln im Wasser wachsen, kann das Gefäßgewebe an Querschnitten der Stängelbasis oder der unter Wasser befindlichen Stängelteile innen eine hellbraune Verfärbung aufweisen. Wird ein durchgeschnittener Stängel senkrecht ins Wasser gehalten, so können aus dem durchgeschnittenen Gefäßgewebe Bakterien austreten und Schleimfäden bilden, auch wenn keine Welkesymptome an der Pflanze zu beobachten sind.

2. Schnell-Screeningtests

Schnell-Screeningtests können die vorläufige Diagnose erleichtern, sind jedoch nicht unerlässlich. Einen oder mehrere der folgenden validierten Tests verwenden:

2.1. Gefäßbündeltest

(Siehe Abschnitt VI.A.1)

2.2. Nachweis von Poly- β -hydroxybutyrat-Granula (PHB)

Die charakteristischen PHB-Granula in den Zellen von *R. solanacearum* werden sichtbar gemacht, indem hitzefixierte Ausstriche von Bakterienexsudat aus infiziertem Gewebe auf einem Mikroskop-Objektträger mit Nilblau A oder Sudanschwarz angefärbt werden (siehe Abschnitt VI.A.2).

2.3. Serologische Agglutinationstests

(Siehe Abschnitt VI.A.3)

2.4. Sonstige Tests

Weitere geeignete Schnell-Screeningtests sind u. a. der IF-Test (Abschnitt VI.A.5), der FISH-Test (Abschnitt VI.A.7), die ELISA-Tests (Abschnitt VI.A.8) und die PCR-Tests (Abschnitt VI.A.6).

3. Isolierungsverfahren

- a) Das Exsudat oder Bereiche verfärbten Gewebes vom Gefäßbündelring in der Kartoffelknolle oder von den Gefäßsträngen im Stängel von Kartoffel- oder Tomatenpflanzen oder sonstigen welkenden Wirtspflanzen heraus-schneiden. In einem geringen Volumen sterilen, destillierten Wassers oder 50mM Phosphatpuffer (Anlage 4) suspendieren und 5-10 Minuten stehen lassen.
- b) Eine Reihe von Dezimalverdünnungen der Suspension herstellen.
- c) 50-100 µl der Suspension und der Verdünnungen auf ein Universalnährmedium (NA, YPGA oder SPA; siehe Anlage 2) und/oder auf das Kelman's selektive Tetrazolium-Medium (Anlage 2) und/oder ein validiertes selektives Medium (z. B. SMSA; siehe Anlage 2) auftragen. Mit einem geeigneten Verdünnungsausstrichverfahren aus-spateln oder austreichen. Es kann günstig sein, einen Satz separater Platten mit einer verdünnten Zellsuspension eines Biovar-2-Stamms von *R. solanacearum* als Positivkontrolle anzulegen.
- d) Die Platten 2-6 Tage bei 28 °C inkubieren.
 - Auf den Universalmedien bilden virulente Isolate von *R. solanacearum* perlweiße, flache, unregelmäßige und schleimige Kolonien, oft mit charakteristischen Wirbeln in der Mitte. Avirulente Formen von *R. solanacearum* bilden dagegen kleine, runde, nichtschleimige, butterartige Kolonien, die vollständig cremefarben erscheinen.
 - Auf Kelman's Tetrazolium-Medium und SMSA-Medium sind die Wirbel blutrot gefärbt. Avirulente Formen von *R. solanacearum* bilden dagegen kleine, runde, nichtflüssige, butterartige Kolonien, die vollständig dunkelrot erscheinen.

4. Tests zur Identifizierung von *R. solanacearum*

Tests zur Bestätigung der Identität *R.-solanacearum*-verdächtiger Isolate sind in Abschnitt VI. B aufgeführt.

ABSCHNITT III

1. Detaillierte Beschreibung der Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *Ralstonia solanacearum* in Proben symptomfreier Kartoffelknollen

1.1. Probenaufbereitung

Hinweis:

- Die Standardprobe umfasst 200 Knollen je Test. Für umfangreichere Tests müssen mehr Proben dieser Größe untersucht werden. Mehr als 200 Knollen in der Probe führen zu Hemmungsreaktionen oder erschweren die Ergebnisauswertung. Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet, wenn nur wenige Knollen zur Verfügung stehen.
- Die Validierung aller im Folgenden beschriebenen Nachweismethoden beruht auf der Untersuchung von Proben einer Größe von 200 Knollen.
- Der im Folgenden beschriebene Kartoffelextrakt kann auch zum Nachweis des Erregers der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, verwendet werden.

Fakultative Vorbehandlung vor Probenaufbereitung:

- a) Proben bis zu zwei Wochen vor der Testung bei 25-30 °C inkubieren, um die Vermehrung von *R.-solanacearum*-Populationen anzuregen.
- b) Knollen waschen. Zwischen den einzelnen Proben geeignete Desinfektionsmittel (Chlorverbindungen im Falle des PCR-Tests, um etwa vorhandene pathogene DNA zu entfernen) und Detergenzien verwenden. Knollen an der Luft trocknen. Dieses Waschverfahren ist besonders für Proben mit viel anhaftender Erde und in Fällen hilfreich (jedoch nicht vorgeschrieben), in denen ein PCR-Test oder ein direktes Isolierungsverfahren durchgeführt werden sollte.

- 1.1.1. Mit einem sauberen, sterilen Skalpell oder Gemüsemesser die Schale am Nabelende der Knolle entfernen, so dass das Gefäßbündelgewebe sichtbar wird. Am Nabelende jeder Knolle sorgfältig ein kleines, kegelförmiges Gewebestück aus dem Gefäßbereich herausschneiden. Dabei darauf achten, dass möglichst wenig nicht vaskuläres Gewebe erfasst wird (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Hinweis: Knollen mit Verdachtssymptomen der ‚Schleimkrankheit‘ (sichtbarer Fäulnis) sind auszusondern und separat zu testen.

Werden beim Entfernen des kegelförmigen Gewebestückchens Symptome der Schleimkrankheit festgestellt, so sollte diese Knolle visuell geprüft werden; sie wird zu diesem Zweck am Nabelende durchgeschnitten. Durchgeschnittene Knollen mit verdächtigen Symptomen sollten zur Wundverkröckung mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend unter angemessenen Quarantänebedingungen (bei 4-10 °C) gelagert werden. Alle Knollen, einschließlich solcher mit Verdachtssymptomen, sind gemäß Anhang III aufzubewahren.

- 1.1.2. Die kegelförmigen Nabelendstückchen in unbenutzten verschließbaren und/oder verplombbaren Einwegbehältnissen sammeln (werden Behältnisse wiederverwendet, so sind sie mit Chlorverbindungen gründlich zu reinigen und zu desinfizieren). Die Gewebestückchen sind möglichst sofort zu verarbeiten bzw. können — soweit dies nicht möglich ist — in ihrem Behältnis ohne Zugabe von Puffer für maximal 72 Stunden gekühlt bzw. für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Die Gewebestückchen nach einem der folgenden Verfahren verarbeiten:

- a) Entweder die Stückchen mit einer ausreichenden Menge (ca. 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 4) bedecken und auf einem Schüttler (50-100 rpm) für 4 Stunden bei einer Temperatur von weniger als 24 °C oder 16-24 Stunden bei Kühlschranktemperatur schütteln;

oder

- b) die Stückchen mit einer ausreichenden Menge (ca. 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 4) entweder in einem Waring- oder Ultra-Thurax-Mixer oder durch Zerkleinerung in einem robusten verschlossenen Einweg-Mazerationsbeutel (z. B. Stomacher- oder Bioreba-Plastikbeutel, 150 mm × 250 mm; strahlensterilisiert) mit einem Gummihammer oder einem geeigneten Zerkleinerungsgerät (z. B. Homex) homogenisieren.

Hinweis: Das Risiko der Kreuzkontamination von Proben ist groß, wenn letztere mit einem Mixer homogenisiert werden. Es sind Vorkehrungen zu treffen, um jedes Versprühen oder Verschütten während des Extraktionsprozesses zu vermeiden. Ferner ist sicherzustellen, dass für jede Probe frisch sterilisierte Mixerblätter und Gefäße verwendet werden. Beim PCR-Test ist eine DNA-Übertragung auf Behälter oder Zerkleinerungsgeräte zu vermeiden. Die Zerkleinerung sollte in Einweg-beuteln und Einwegröhrchen erfolgen, wenn der PCR-Test angewandt werden soll.

- 1.1.3. Den Überstand umfüllen. Wenn er sehr trüb ist, entweder durch langsames Zentrifugieren (nicht mehr als 180 g für 10 Minuten zwischen 4-10 °C) oder durch Vakuumfiltration (40-100 µm) klären und den Filter mit zusätzlichem (10 ml) Extraktionspuffer waschen.

- 1.1.4. Die Bakterien durch 15-minütiges Zentrifugieren des erhaltenen Überstandes bei 7 000 g (oder für 10 Minuten bei 10 000 g) bei einer Temperatur zwischen 4-10 °C konzentrieren und den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.

- 1.1.5. Das Pellet in 1,5 ml Pelletpuffer (Anlage 4) resuspendieren. 500 µl für das Testen auf *R. solanacearum*, 500 µl für *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und 500 µl für Referenzzwecke verwenden. Zum Referenzaliquot von 500 µl und den restlichen Testaliquots steriles Glycerin zugeben, um eine Endkonzentration von 10-25 % (v/v) zu erreichen, vortexen und bei – 16 bis – 24 °C (Wochen) oder bei – 68 bis – 86 °C (Monate) lagern. Die Testaliquots während der Testung bei 4-10 °C aufbewahren.

Von wiederholtem Einfrieren und Auftauen wird abgeraten.

Muss der Extrakt befördert werden, so ist sicherzustellen, dass der Transport innerhalb von 24 bis 48 Stunden erfolgt und eine Kühlbox verwendet wird.

- 1.1.6. Zur Vermeidung von Kontaminationen müssen alle *R.-solanacearum*-Positivkontrollen und Proben unbedingt separat behandelt werden. Dies gilt für IF-Objektträger und für sämtliche Tests.

1.2. Testung

Siehe Flussdiagramm und Beschreibung der Tests sowie der optimierten Protokolle in den entsprechenden Anlagen:

Selektive Isolierung (Abschnitt VI.A.4)

IF-Test (Abschnitt VI.A.5)

PCR-Tests (Abschnitt VI.A.6)

FISH-Test (Abschnitt VI.A.7)

ELISA-Tests (Abschnitt VI.A.8)

Biotest (Abschnitt VI.A.9)

2. Detaillierte Beschreibung der Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *R. solanacearum* in Proben von symptomfreien Kartoffel-, Tomaten- und sonstigen Wirtspflanzen

2.1. Probenaufbereitung

Hinweis: Zum Nachweis latenter *R. solanacearum*-Populationen wird empfohlen, Mischproben zu testen. Das Verfahren ist auch für Mischproben von bis zu 200 Stängelstücken geeignet. Werden Erhebungen durchgeführt, so sollten diese an einer statistisch repräsentativen Probe der zu untersuchenden Pflanzenpopulation ausgerichtet werden.

2.1.1. 1-2 cm lange Stängelstücke in einem verschließbaren, sterilen Behälter sammeln; dabei wie folgt vorgehen:

Tomatenjungpflanzen: Mit einem sauberen, sterilen Messer an der Stängelbasis genau über der Erde ein 1 cm langes Stängelstück ausschneiden.

Freiland- oder Gewächshaustomaten: Mit einem sterilen Messer von jeder Pflanze den untersten Seitentrieb genau an der Ansatzstelle am Haupttrieb abschneiden. Vom unteren Ende eines jeden Seitentriebs ein 1 cm großes Stück abschneiden.

Andere Wirtspflanzen: Mit einem sauberen, sterilen Messer oder einer Gartenschere an der Stängelbasis genau über der Erde ein 1 cm großes Stängelstück ausschneiden. Bei *S. dulcamara* oder anderen im Wasser wachsenden Wirtspflanzen 1-2 cm große Stücke aus den unter Wasser befindlichen Stängeln oder Stolonen mit Wasserwurzeln ausschneiden.

Soll ein bestimmter Standort beprobt werden, so empfiehlt es sich, die Testung an einer statistisch repräsentativen Probe von mindestens 10 Pflanzen der potenziellen Wirtspflanzen je Entnahmestelle vorzunehmen. Der Erreger lässt sich im Spätfrühling, Sommer und Herbst am verlässlichsten nachweisen, allerdings lassen sich natürliche Infektionen bei der an Wasserläufen wachsenden winterharten *Solanum dulcamara* das ganze Jahr über nachweisen. Zu den bekannten Wirtspflanzen gehören Durchwuchs-Kartoffeln, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* und andere Pflanzen aus der Familie der Nachtschattengewächse. Weitere Wirtspflanzen sind *Pelargonium* spp. und *Portulaca oleracea*. Zu den europäischen Unkräutern, deren Wurzeln und/oder Rhizosphäre unter bestimmten Umweltbedingungen potenziell mit *R. solanacearum*-Populationen (Biovar 2/Rasse 3) infiziert sind, zählen *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* und *Urtica dioica*.

Hinweis: In diesem Stadium können innere Symptome (Gewebeverfärbungen oder Bakterien Schleim) visuell festgestellt werden. Stängelstücke mit Symptomen aussondern und separat testen (siehe Abschnitt II).

2.1.2. Die Stängelstücke kurz mit 70 %igem Ethanol desinfizieren und sofort auf Papiertüchern trocken tupfen. Anschließend die Stängelstücke einer der folgenden Behandlungen unterziehen:

a) Entweder die Stücke mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 4) bedecken und auf einem Schüttler (bei 50-100 rpm) für 4 Stunden bei einer Temperatur von weniger als 24 °C bzw. für 16-24 Stunden bei Kühlschranktemperatur schütteln; oder

b) die Stücke mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 4) durch Zerkleinern in einem robusten Mazerationsbeutel (z. B. Stomacher- oder Bioreba-Beutel) mit einem Gummihammer oder einem geeigneten Zerkleinerungsgerät (z. B. Homex) unverzüglich verarbeiten. Ist dies nicht möglich, so können die Stängelstücke gekühlt für höchstens 72 Stunden und bei Raumtemperatur für höchstens 24 Stunden gelagert werden.

2.1.3. Den Überstand umfüllen, nachdem das Mazerat 15 Minuten gestanden hat.

2.1.4. Eine weitere Klärung des Extrakts oder Konzentration der Bakterien ist in der Regel nicht erforderlich, kann jedoch durch Filtrieren und/oder Zentrifugieren (siehe Abschnitte III.1.1.3 bis 1.1.5) erreicht werden.

- 2.1.5. Den unverdünnten oder konzentrierten Probenextrakt in zwei gleiche Teile teilen. Eine Hälfte während der Testung bei 4-10 °C aufbewahren, die andere Hälfte mit 10-25 % (v/v) sterilem Glycerin bei - 16 bis - 24 °C (Wochen) oder bei - 68 bis - 86 °C (Monate) lagern, für den Fall, dass weitere Tests erforderlich werden.

2.2. Testung

Siehe Flussdiagramm und Beschreibung der Tests sowie der optimierten Protokolle in den entsprechenden Anlagen:

Selektive Isolierung (Abschnitt VI.A.4)

IF-Test (Abschnitt VI.A.5)

PCR-Tests (Abschnitt VI.A.6)

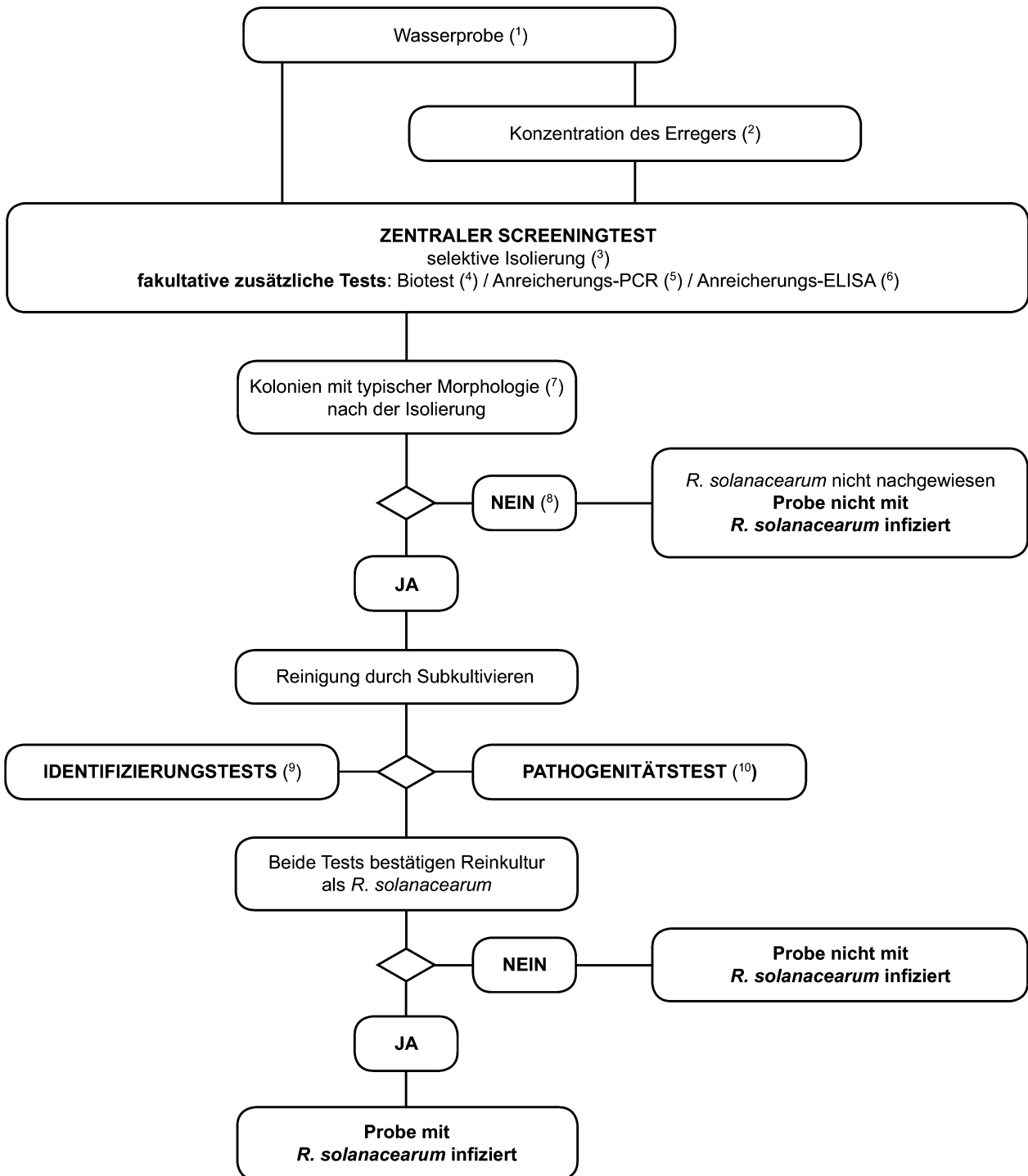
FISH-Test (Abschnitt VI.A.7)

ELISA-Tests (Abschnitt VI.A.8)

Biotest (Abschnitt VI.A.9)

ABSCHNITT IV

1. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von *R. solanacearum* in wasser



- (¹) Empfohlene Probenahmeverfahren siehe Abschnitt IV.2.1.
- (²) Beschreibung von Methoden der Erregerkonzentration in Abschnitt IV.2.1. Da die Populationen sowohl des Erregers als auch der konkurrierenden saprophytischen Bakterien durch die Konzentration zunehmen, sollte diese nur vorgenommen werden, wenn der Isolierungstest dadurch nicht gehemmt wird.
- (³) Beschreibung des selektiven Isolierungstests in Abschnitt VI.A.4.
- (⁴) Beschreibung des Biotests in Abschnitt VI.A.9.
- (⁵) Beschreibung von PCR-Anreicherungsverfahren in den Abschnitten VI.A.4.2 und VI.A.6.
- (⁶) Beschreibung von ELISA-Anreicherungsverfahren in den Abschnitten VI.A.4.2 und VI.A.8.
- (⁷) Beschreibung der typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt II.3.d.
- (⁸) Das Kultivieren kann aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Besteht der Verdacht, dass die Zuverlässigkeit der Isolierungstests durch hohe Saprophytenpopulationen beeinträchtigt wird, so sind die Isolierungstests nach Verdünnung der Probe mit sterilem Wasser zu wiederholen.
- (⁹) Eine Reinkultur von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolatens wird durch die Tests gemäß Abschnitt VI.B verlässlich identifiziert.
- (¹⁰) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt VI.C.

2. Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *R. solanacearum* in Wasser

Grundsatz

Das in diesem Abschnitt beschriebene validierte Verfahren ist zum Nachweis von Erregern in Proben von Oberflächengewässern bestimmt, kann aber auch zur Testung von Proben von Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlämmen verwendet werden. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die erwartete Nachweisempfindlichkeit je nach Substrat variiert. Die Sensitivität des Isolierungstests wird durch Populationen konkurrierender saprophytischer Bakterien beeinflusst, die bei der Kartoffelverarbeitung und in Klärschlämmen im Allgemeinen in viel größeren Mengen vorkommen als in Oberflächengewässern. So dürften mit der nachstehend beschriebenen Methode in Oberflächenwasser zwar 10^3 Zellen je Liter nachgewiesen werden, bei Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlämmen dürfte die Nachweisempfindlichkeit allerdings wesentlich niedriger sein. Daher wird empfohlen, Schlämme nach Reinigungsbehandlungen (z. B. Sedimentation oder Filtration) zu testen, durch die Populationen saprophytischer Bakterien verringert werden. Die begrenzte Empfindlichkeit der Testmethode sollte bei der Bewertung der Zuverlässigkeit etwaiger negativer Testergebnisse berücksichtigt werden. Die Methode hat sich bei Erhebungen zur Feststellung des Vorhandenseins bzw. des Nichtvorhandenseins des Erregers in Oberflächengewässern zwar bewährt, ihre Grenzen sollten jedoch klar sein, wenn ähnliche Erhebungen bei Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlämmen durchgeführt werden.

2.1. Probenaufbereitung

Hinweis:

- *R. solanacearum* in Oberflächengewässern lässt sich im Spätf Frühling, Sommer und Herbst, wenn die Wassertemperaturen über 15 °C betragen, am verlässlichsten nachweisen.
- Wiederholte Probenahmen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der oben genannten Zeitspanne an ausgewiesenen Probenahmestellen gewährleisten verlässliche Ergebnisse, da die Auswirkungen wechselnder Witterungsverhältnisse reduziert werden.
- Die Auswirkungen heftiger Niederschläge und die Geografie des Wasserlaufes müssen berücksichtigt werden, um größere Verdünnungseffekte, die das Auftreten des Erregers verschleiern könnten, zu vermeiden.
- Oberflächenwasserproben sollten in Nähe von Wirtspflanzen gezogen werden, sofern letztere vorhanden sind.

2.1.1. An ausgewählten Probenahmestellen, wenn möglich in mindestens 30 cm Tiefe und in 2 m Entfernung zum Ufer, Wasserproben ziehen und in sterile Einwegröhrchen oder -flaschen füllen. Für Verarbeitungs- und Klärschlammabfälle die Proben an der Stelle ziehen, an der die Abfälle in den Wasserlauf eingeleitet werden. Es werden Proben einer Größe von bis zu 500 ml je Entnahmestelle empfohlen. Werden kleinere Proben bevorzugt, so sollten sie mindestens 3x an jeder Entnahmestelle entnommen werden, wobei jede Probe aus 2 Unterproben von jeweils mindestens 30 ml besteht. Für eine umfassendere Erhebung je 3 km Wasserlauf mindestens 3 Entnahmestellen aussuchen und sicherstellen, dass in den Wasserlauf einmündende Flüsse ebenfalls beprobt werden..

2.1.2. Proben gekühlt (4-10 °C) und dunkel transportieren und innerhalb von 24 Stunden testen.

2.1.3. Die Bakterienfraktion kann erforderlichenfalls nach einer der folgenden Methoden konzentriert werden:

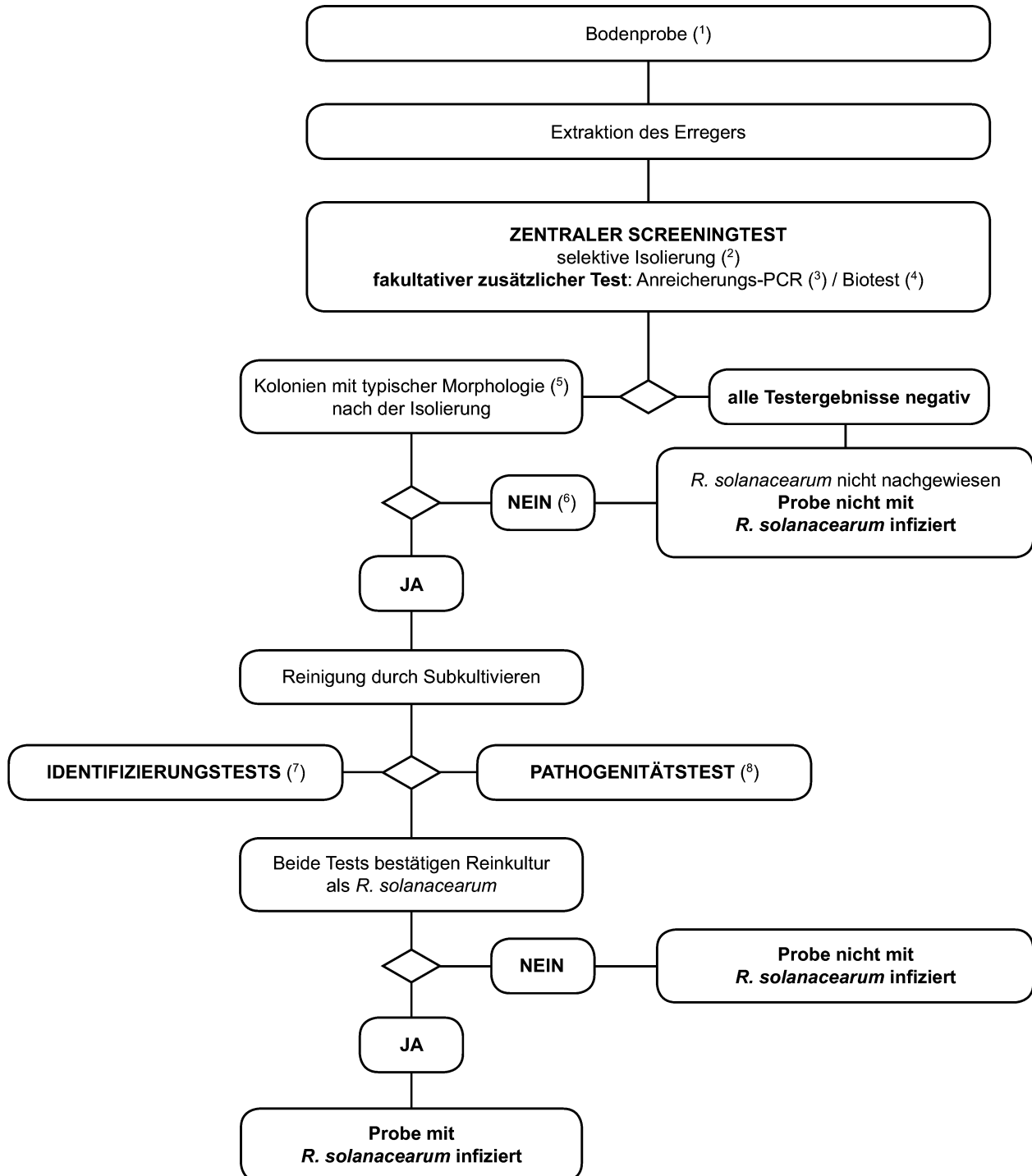
- a) 30-50 ml Unterproben bei 10 000 g für 10 Minuten (oder 7 000 g für 15 Minuten) vorzugsweise bei 4-10 °C zentrifugieren, Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml Pelletpuffer (siehe Anlage 4) resuspendieren.
- b) Membran filtrieren (Mindestporengröße 0,45 µm), anschließend Filter mit 5-10 ml Pelletpuffer waschen und Waschwasser auffangen. Diese Methode ist geeignet für größere Wassermengen mit wenig Saprophyten.

Bei Proben von Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlämmen empfiehlt sich eine Konzentration in der Regel nicht, da ebenfalls angereicherte Populationen konkurrierender saprophytischer Bakterien den Nachweis von *R. solanacearum* hemmen werden.

2.2. Testung

Siehe Flussdiagramm und Beschreibung der Tests in den entsprechenden Anlagen.

ABSCHNITT V

1. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von *R. solanacearum* im Boden

- (¹) Empfohlene Probenahmeverfahren siehe Abschnitt V.2.1.
- (²) Beschreibung des selektiven Isolierungstests in Abschnitt VI.A.4.
- (³) Beschreibung von PCR-Anreicherungsverfahren in den Abschnitten VI.A.4.2 und VI.A.6.
- (⁴) Beschreibung des Biotests in Abschnitt VI.A.9.
- (⁵) Beschreibung der typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt II.3.d.
- (⁶) Das Kultivieren kann aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Besteht der Verdacht, dass die Zuverlässigkeit der Isolierungstests durch hohe Saprophytenpopulationen beeinträchtigt wird, so sind die Isolierungstests nach Verdünnung der Probe mit sterilem Wasser zu wiederholen.
- (⁷) Eine Reinkultur von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten wird durch die Tests gemäß Abschnitt VI.B verlässlich identifiziert.
- (⁸) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt VI.C.

2. Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung von *R. solanacearum* im Boden

Grundsatz

Das in diesem Abschnitt beschriebene validierte Verfahren dient zum Nachweis des Erregers in Bodenproben, kann jedoch auch verwendet werden, um Proben von festen Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlamm zu testen. Allerdings sind diese Methoden nicht sensitiv genug, um den Nachweis von *R. solanacearum* bei geringen und/oder ungleichmäßig verteilten Populationen, die in natürlich befallenen Proben dieser Substrate auftreten können, zu gewährleisten.

Die begrenzte Sensitivität dieses Testschemas ist daher bei der Beurteilung der Zuverlässigkeit von negativen Testergebnissen sowie bei der Verwendung des Schemas zur Feststellung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins des Erregers im Boden oder in Schlämmen zu berücksichtigen. Der Erreger wird im Feldboden am zuverlässigsten ermittelt, indem eine anfällige Wirtspflanze gepflanzt und auf Befallsanzeichen beobachtet wird. Aber auch mit dieser Methode ist ein Nachweis von schwachen Kontaminationen nicht möglich.

2.1. Probenaufbereitung

2.1.1. Die Entnahme der Feldbodenproben sollte den Standards der Probenahme für die Nematodenuntersuchungen folgen. Je Probe 0,5-1 kg Boden aus 60 Einstichen (Entnahmetiefe 10-20 cm) je 0,3 ha (oder in einem Raster von 7×7 m) entnehmen. Besteht der Verdacht, dass sich der Erreger im Feldboden befindet, so ist die Zahl der Einstichstellen auf 120 je 0,3 ha zu erhöhen. Proben vor der Testung bei 12-15 °C aufbewahren. Proben von Kartoffelverarbeitungsabfällen oder Klärschlämmen sind in einer Gesamtmenge von 1 kg und an Stellen zu entnehmen, die für das gesamte zu testende Schlammvolumen repräsentativ sind. Jede Probe vor der Testung gut mischen.

2.1.2. Teilproben von je 10-25 g Boden oder Schlamm durch Schütteln (250 rpm) in 60-150 ml Extraktionspuffer (Anlage 4) bis zu 2 Stunden dispergieren. Die Dispersion kann ggf. durch Zugabe von 0,02 %igem sterilem Tween-20 und 10-20 g sterilem Kies unterstützt werden.

2.1.3. Die Suspension während der Testung bei 4 °C halten.

2.2. Testung

Siehe Flussdiagramm und Beschreibung der Tests in den entsprechenden Anlagen.

ABSCHNITT VI

OPTIMIERTE PROTOKOLLE FÜR DEN NACHWEIS UND DIE IDENTIFIZIERUNG VON *R. SOLANACEARUM*

A. DIAGNOSE- UND NACHWEISTESTS

1. Gefäßbündeltest

Ob in welchen Stängeln von Kartoffeln, Tomaten oder anderen Wirtspflanzen *R. solanacearum* vorhanden ist, kann mit folgendem Test leicht festgestellt werden: Stängel kurz über dem Boden abschneiden und die Schnittfläche in ein Röhrchen mit reinem Wasser halten. Nach einigen Minuten ist zu beobachten, wie aus den durchgeschnittenen Gefäßbündeln spontan typische Bakterien Schleimfäden austreten.

2. Nachweis von Poly- β -hydroxybutyrat-Granula

1. Auf einem Objektträger einen Ausstrich des Bakterienexsudats aus infiziertem Gewebe oder von einer 48-Stunden-Kultur auf YPGA oder SPA (Anlage 2) herstellen.
2. Für Positivkontrollen Ausstriche eines Biovar-2-Stamms von *R. solanacearum* und ggf. für eine Negativkontrolle einen Stamm verwenden, der als PHB-negativ bekannt ist.
3. An der Luft trocknen lassen. Die Unterseite eines jeden Objektträgers schnell über eine Flamme führen, um den Ausstrich zu fixieren.
4. Präparat wie nachstehend beschrieben mit Nilblau oder Sudanschwarz färben und unter dem Mikroskop auswerten.

Nilblautest

- a) Jeden Objektträger mit 1 %iger wässriger Lösung von Nilblau A vollständig bedecken und 10 Minuten bei 55 °C inkubieren.
- b) Färbelösung ablaufen lassen. Kurz unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
- c) Ausstrich mit 8 %iger wässriger Essigsäure vollständig bedecken und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
- d) Kurz unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen. Überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
- e) Mit einem Tropfen Wasser wieder befeuchten und Deckglas auflegen.
- f) Gefärbten Ausstrich unter einem Epifluoreszenzmikroskop bei 450 nm unter Ölimmersion und bei einer Vergrößerung von 600-1 000 (Öl- oder Wasserimmersionsobjektiv) prüfen.
- g) Auf kräftig orangefarbene Fluoreszenz von PHB-Granula achten. Auch bei Normallicht betrachten, um sicherzustellen, dass die Granula intrazellulär sind und die Zellmorphologie typisch für *R. solanacearum* ist.

Sudanschwarztest

- a) Jeden Objektträger mit 0,3 %iger Sudanschwarz-B-Lösung in 70 %igem Ethanol vollständig bedecken und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- b) Färbelösung ablaufen lassen, kurz unter Leitungswasser abwaschen und überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen.
- c) Objektträger kurz in Xylol tauchen und mit Papiertüchern trockentupfen. *Achtung: Xylol ist gesundheitsschädlich! Erforderliche Vorsichtsmaßnahmen treffen und unter dem Abzug arbeiten.*
- d) Objektträger mit 0,5 %igem (w/v) wässrigem Safranin vollständig bedecken und 10 Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren. *Achtung: Safranin ist gesundheitsschädlich! Erforderliche Vorsichtsmaßnahmen treffen und unter dem Abzug arbeiten.*
- e) Unter schwach fließendem Leitungswasser abwaschen, überschüssiges Wasser mit Papiertüchern aufnehmen und Deckglas auflegen.
- f) Gefärbten Ausstrich im Durchlichtmikroskop unter Ölimmersion bei einer Vergrößerung von 1 000 (Ölimmersionsoobjektiv) prüfen.
- g) Auf blau-schwarz gefärbte PHB-Granula in *R.-solanacearum*-Zellen mit rosa gefärbten Zellwänden achten.

3. Serologische Agglutinationstests

Die Agglutination von *R.-solanacearum*-Zellen in Bakterien Schleim oder symptomatischen Gewebeextrakten lässt sich am besten mit validierten Antikörpern (siehe Anlage 3) feststellen, die mit geeigneten Farbmarkierern wie roten *Staphylococcus-aureus*-Zellen oder gefärbten Latex-Partikeln markiert sind. Wird ein handelsübliches Testkit (siehe Anlage 3) verwendet, so sind die Herstelleranweisungen zu befolgen. Ansonsten wie folgt verfahren:

- a) Tropfen einer Suspension aus markiertem Antikörper und Bakterien Schleim (jeweils ca. 5 µl) auf Sichtfeldern von Multiwell-Objektträgern mischen.
- b) Positiv- und Negativkontrollen aus Suspensionen von *R.-solanacearum*-Biovar 2 und einem heterologen Stamm zubereiten.
- c) 15 Sekunden vorsichtig mischen und danach auf Agglutinationsanzeichen in positiven Proben beobachten.

4. Selektive Isolierung

4.1. Selektivausstrich

Hinweis: Bevor diese Methode zum ersten Mal angewandt wird, sind Voruntersuchungen durchzuführen, um sicherzustellen, dass 10^3 bis 10^4 koloniebildende Einheiten von *R. solanacearum* je ml, die Extrakten aus Proben mit vorhergehendem negativen Testergebnis zugegeben wurden, reproduzierbar nachgewiesen werden können.

Ein geeignetes, validiertes Selektivmedium wie SMSA (modifiziert durch Elphinstone *et al.*, 1996; siehe Anlage 2) verwenden.

Dabei muss *R. solanacearum* von anderen Bakterien, die auf dem Medium Kolonien bilden können, sorgfältig differenziert werden. Darüber hinaus können *R. solanacearum*-Kolonien eine atypische Morphologie aufweisen, wenn die Platten überwuchert oder auch antagonistische Bakterien vorhanden sind. Besteht Verdacht auf Bakterienkonkurrenz oder -antagonismus, so ist die Probe nach einer anderen Methode erneut zu testen.

Die höchste Nachweisempfindlichkeit lässt sich bei dieser Methode mit frisch aufbereiteten Probenextrakten erreichen. Allerdings eignet sich die Methode auch für Extrakte, die bei -68 bis -86 °C unter Zugabe von Glycerin gelagert wurden.

Als Positivkontrollen Dezimalverdünnungen einer Suspension von 10^6 cfu je ml eines virulenten Biovar-2-Stammes von *R. solanacearum* (z. B. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) herstellen. Um jegliches Kontaminationsrisiko zu vermeiden, die Positivkontrollen völlig getrennt von den Testproben vorbereiten.

Für jede neu bereitete Charge eines Selektivmediums ist seine Eignung zum Anzüchten des Erregers zu prüfen, bevor es zur Untersuchung von Routineproben verwendet wird.

Kontrollmaterial wie die Probe(n) testen.

4.1.1. Einen geeigneten Verdünnungsausstrich durchführen, um sicherzustellen, dass saprophytische koloniebildende Hintergrundpopulationen ausverdünnung werden. 50-100 µl je Platte und je Verdünnung ausstreichen.

4.1.2. Die Platten bei 28 °C inkubieren. Die Platten nach 48 Stunden und danach täglich bis zu sechs Tage lang auswerten. Auf dem SMSA-Medium erscheinen für *R. solanacearum* typische milchig weiße, flache, unregelmäßige und schleimige Kolonien, die nach drei Tagen Inkubation im Zentrum eine rosa bis blutrote Färbung mit Strichen oder Wirbeln aufweisen (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Hinweis: Mitunter bilden sich auf diesem Medium atypische *R. solanacearum*-Kolonien. Diese können klein, rund, völlig rot und nicht schleimig oder nur teilweise schleimig sein, so dass es schwierig ist, sie von koloniebildenden saprophytischen Bakterien zu unterscheiden.

4.1.3. Die *R. solanacearum*-verdächtigen-Kolonien nach Ausspateln oder Verdünnungsausstrich auf einem Universalmedium reinigen, um einzelne Kolonien zu isolieren (siehe Anlage 2).

4.1.4. Kulturen für kurze Zeit in sterilem Wasser (pH 6-8, chlorfrei) bei Raumtemperatur im Dunkeln und für längere Zeit in einem geeigneten Kälteschutzmedium bei -68 bis -86 °C oder lyophilisiert lagern.

4.1.5. Verdächtige Kulturen identifizieren (siehe Abschnitt VI.B.) und einen Pathogenitätstest durchführen (siehe Abschnitt VI. C).

Auswertung der Ergebnisse des Selektivausstrichtests

Der Selektivausstrichtest ist negativ, wenn nach sechs Tagen keine Bakterienkolonien sichtbar sind oder wenn keine verdächtigen *R. solanacearum*-typischen Kolonien festgestellt werden, vorausgesetzt, dass keine Hemmung durch konkurrierende oder antagonistische Bakterien anzunehmen ist und dass typische *R. solanacearum*-Kolonien bei den Positivkontrollen gefunden wurden.

Der Selektivausstrichtest ist positiv, wenn *R. solanacearum*-verdächtige-Kolonien isoliert werden.

4.2. Anreicherungsverfahren

Ein validiertes Anreicherungsmedium wie den modifizierten Wilbrink-Bouillon verwenden (siehe Anlage 2).

Dieses Verfahren kann zur selektiven Vermehrung von *R. solanacearum*-Populationen in Probenextrakten und Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit verwendet werden. Mit diesem Verfahren lassen sich auch Inhibitoren der PCR-Reaktion wirksam verdünnen (1:100). Die Anreicherung von *R. solanacearum* kann allerdings aufgrund konkurrierender oder antagonistischer saprophytischer Organismen scheitern, die häufig gleichzeitig angereichert werden. Aus diesem Grund kann es schwierig sein, aus angereicherten Bouillon-Kulturen *R. solanacearum* zu isolieren. Da die Populationen von serologisch verwandten Saprophyten zunehmen können, wird empfohlen, für den ELISA-Test spezifische monoklonale statt polyklonale Antikörper zu verwenden.

- 4.2.1. Für Anreicherungs-PCR 100 µl des Probenextrakts in 10 ml Anreicherungsbouillon (Anlage 2) geben, der zuvor in DNA-freie Röhrchen oder Flaschen aliquotiert wurde. Für Anreicherungs-ELISA kann das Verhältnis zwischen Probenextrakt und Anreicherungsbouillon größer sein (z. B. 100 µl Probenextrakt in 1,0 ml Anreicherungsbouillon).
- 4.2.2. Für 72 Stunden bei 27-30 °C in Schüttel- oder Standkultur mit zwecks Belüftung lose aufgesetzten Deckeln inkubieren.
- 4.2.3. Vor Gebrauch für ELISA- oder PCR-Tests gut mischen.
- 4.2.4. Den Anreicherungsbouillon in gleicher Weise behandeln wie die Probe(n) in den oben aufgeführten Tests.

Hinweis: Wird bei der Anreicherung mit einer Hemmung von *R. solanacearum* aufgrund hoher Populationen bestimmter konkurrierender saprophytischer Bakterien gerechnet, so kann eine Anreicherung der Probenextrakte vor dem Zentrifugieren oder anderen Konzentrationsschritten zu besseren Ergebnissen führen.

5. IF-Test

Grundsatz

Der IF-Test wird als Hauptscreeningtest empfohlen, weil er nachweislich stabil genug ist, um die vorgeschriebenen Schwellenwerte zu erreichen.

Wird der IF-Test als Hauptscreeningtest angewandt und fällt der IF-Befund positiv aus, so muss als zweiter Screeningtest der Isolierungs-, der PCR- oder der FISH-Test durchgeführt werden. Wird der IF-Test als zweiter Screeningtest angewandt und fällt der IF-Befund positiv aus, so sind zum Abschluss der Analyse weitere Tests (siehe Flussdiagramm) erforderlich.

Hinweis: Validierte Herkunft von Antikörpern gegen *R. solanacearum* verwenden (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Es wird empfohlen, für jede neue Antikörpercharge den Titer zu bestimmen. Der Titer wird definiert als die höchste Verdünnung, bei der eine optimale Reaktion eintritt, wenn eine Suspension aus 10^5 bis 10^6 Zellen je ml des homologen Stammes von *R. solanacearum* mit einem geeigneten Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Konjugat nach Herstellervorgaben getestet wird. Alle validierten polyklonalen Antiseren hatten einen IF-Titer von mindestens 1:2 000. Beim Test sollten die Antikörper in Arbeitsverdünnung(en) (AV) auf oder nahe am Titerwert verwendet werden.

Der Test ist an frisch aufbereiteten Probenextrakten durchzuführen. Er kann erforderlichenfalls auch an Extrakten vorgenommen werden, die bei - 68 bis - 86 °C unter Glycerinzugabe gelagert haben. Das Glycerin kann durch Zugabe von 1 ml Pelletpuffer (Anlage 4), 15-minütiges Rezentrifugieren bei 7 000 g und Resuspension in gleicher Menge Pelletpuffer entfernt werden. Dieser Arbeitsschritt ist häufig nicht erforderlich, vor allem, wenn die Proben durch Abflammen am Objektträger fixiert werden.

Separate Objektträger mit Positivkontrollen des homologen Stammes oder eines anderen Referenzstammes von *R. solanacearum*, gemäß Anlage 3. B. in Kartoffelextrakt und fakultativ in Puffer suspendiert, vorbereiten.

Als ähnliche Kontrolle auf demselben Objektträger sollte nach Möglichkeit natürlich infiziertes Gewebe (durch Lyophilisierung oder Einfrieren bei - 16 bis - 24 °C gelagert) verwendet werden.

Als Negativkontrollen Aliquots des Probenextrakts verwenden, deren vorheriges Testergebnis negativ war.

Die für diesen Test zur Verfügung stehenden standardisierten Positiv- und Negativ-Kontrollmaterialien sind in Anlage 3 aufgeführt.

Multiwellobjektträger mit vorzugsweise 10 Sichtfeldern von mindestens 6 mm Durchmesser verwenden.

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe(n).

5.1. Die Objektträger nach einem der folgenden Verfahren vorbereiten

- i) Pellets mit relativ wenig Stärkesediment:

Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des 1/100 verdünnten resuspendierten Kartoffel-pellets auf das erste Feld pipettieren. Dieselbe Menge unverdünntes Pellet (1/1) auf die restlichen Felder der Reihe pipettieren. Die zweite Reihe kann, wie in Abbildung 1 dargestellt, als Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

ii) Andere Pellets:

Dezimalverdünnungen (1/10 und 1/100) des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer herstellen. Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf eine Felderreihe pipettieren. Die zweite Reihe kann, wie in Abbildung 2 dargestellt, als Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

- 5.2. Tropfen bei Umgebungstemperatur oder durch Erwärmen auf 40 bis 45 °C trocknen lassen. Bakterienzellen entweder durch 15-minütiges Erhitzen bei 60 °C, Abflammen, mit 95 %igem Ethanol oder nach genauen Anweisungen des Antikörper-Lieferanten am Objektträger fixieren.

Soweit erforderlich, können fixierte Objektträger vor weiteren Tests eingefroren in einem trockenen Behältnis für kurze Zeit (jedoch höchstens drei Monate) gelagert werden.

5.3. IF-Verfahren

- i) Bei Objektträgervorbereitung nach 5.1 Ziffer i:

Einen Satz Zweifachverdünnungen des Antikörpers in IF-Puffer herstellen. Im ersten Feld sollte 1/2 des Titers (T/2), in den anderen Feldern 1/4 des Titers (T/4), 1/2 des Titers (T/2), der Titer (T) und das Doppelte des Titers (2T) enthalten sein.

- ii) Bei Objektträgervorbereitung nach 5.1 Ziffer ii:

Herstellung der Arbeitsverdünnung (AV) des Antikörpers in IF-Puffer. Die Arbeitsverdünnung beeinflusst die Spezifität.

Abb. 1. Vorbereitung des Objektträgers nach 5.1 Ziffer i und 5.3 Ziffer i

		Verdünnungen des resuspendierten Pellets					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Verdünnung des resuspendierten Pellets
		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Zweifachverdünnungen des Antiserums/Antikörpers
Probe 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat von Probe 1 oder Probe 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Abb. 2. Vorbereitung des Objektträgers nach 5.1 Ziffer ii und 5.3 Ziffer ii

		Arbeitsverdünnung des Antiserums/Antikörpers					
		1/1	1/10	1/100	leer	leer	<input type="checkbox"/> Dezimalverdünnungen des resuspendierten Pellets
Probe 1		● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplikat von Probe 1 oder Probe 2		● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

- 5.3.1. Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen. Alle Testfelder mit Antikörperverdünnung(en) bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Antikörpervolumen muss mindestens dem Volumen des aufgetragenen Extraktes entsprechen.

Liegen keine spezifischen Anweisungen des Antikörper-Lieferanten vor, so ist folgendes Verfahren anzuwenden:

- 5.3.2. Objektträger abgedeckt 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf feuchten Papiertüchern inkubieren.
- 5.3.3. Tropfen vom Objektträger abschütteln, und die Objektträger sorgfältig mit IF-Puffer spülen. 5 Minuten mit IF-Puffer-Tween (Anlage 4) und anschließend in IF-Puffer waschen. Kreuzkontaminationen durch Sprüh- oder Tropfenbildung vermeiden. Überschüssige Feuchtigkeit durch Abtupfen sorgfältig entfernen.
- 5.3.4. Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen. Testfelder mit der zur Titer-Bestimmung verwendeten FITC-Konjugatverdünnung bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Konjugatvolumen muss dem Volumen des aufgetragenen Antikörpers entsprechen.
- 5.3.5. Objektträger abgedeckt 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf feuchten Papiertüchern inkubieren.
- 5.3.6. Konjugattropfen vom Objektträger abschütteln. Wie unter 5.3.3 angegeben waschen und spülen.

Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.

- 5.3.7. Auf jedes Feld 5-10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glycerin (Anlage 4) oder eine handelsübliche Antifading-Deckflüssigkeit auftragen und Deckglas auflegen.

5.4. IF-Test-Befund

- 5.4.1. Testobjektträger unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop mit Filtern, die für FITC-Anregung geeignet sind, unter Öl- oder Wasserimmersion bei einer Vergrößerung von 500-1 000 untersuchen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinander stehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen. Bei Proben, die keine oder nur wenige Zellen zeigen, mindestens 40 Mikroskopfelder untersuchen.

Zunächst den Objektträger mit der Positivkontrolle prüfen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und bei dem festgelegten Antikörpertiter oder der festgelegten Arbeitsverdünnung vollständig gefärbt sein. Bei abweichender Färbung zum Normalzustand ist der IF-Test (Abschnitt VI.A.5) zu wiederholen.

- 5.4.2. Auf Anwesenheit hell fluoreszierender Zellen mit charakteristischer *R.-solanacearum*-Morphologie in den Testfeldern auf den Testobjektträgern prüfen (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Die Intensität der Fluoreszenz muss der des positiven Kontrollstammes bei gleicher Antikörperverdünnung entsprechen. Unvollständig gefärbte oder nur schwach fluoreszierende Zellen sind nicht zu berücksichtigen.

Bei jeglichem Verdacht auf eine Kontamination ist der Test zu wiederholen. Dies kann der Fall sein, wenn alle Objektträger in einer Charge wegen Pufferkontamination positive Zellen zeigen oder wenn auf der Objektträgerbeschichtung (außerhalb der Felder) positive Zellen gefunden werden.

- 5.4.3. Der Immunofluoreszenztest hat in Bezug auf die Spezifität verschiedene Probleme. Es ist damit zu rechnen, dass in Pellets aus Kartoffelnabelenden und Stängelstücken Hintergrundpopulationen mit fluoreszierenden Zellen und atypischer Morphologie sowie kreuzreagierende saprophytische Bakterien mit *R.-solanacearum*-ähnlicher Größe und Morphologie auftreten.
- 5.4.4. Nur fluoreszierende Zellen von typischer Größe und Morphologie bei Verwendung des Titers oder der Arbeitsverdünnung der Antikörper (siehe 5.3.) berücksichtigen.

5.4.5. Auswertung des IF-Befundes:

- i) Für jede Probe, bei der stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, sind die mittlere Anzahl typischer Zellen je Mikroskopfeld zu schätzen und die Zahl typischer Zellen je ml resuspendiertes Pellet zu berechnen (Anlage 5).

Der IF-Befund gilt bei Proben mit mindestens 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet als positiv. Die Probe gilt in diesem Falle als potenziell kontaminiert, und es sind weitere Tests erforderlich.

- ii) Der IF-Befund gilt bei Proben mit weniger als 5×10^3 Zellen je ml resuspendiertes Pellet als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.

6. PCR-Tests

Grundsatz

Wird der PCR-Test als Hauptscreentest angewandt und fällt dieser Test positiv aus, so muss obligatorisch als zweiter Screentest der Isolierungstest oder der IF-Test durchgeführt werden. Wird der PCR-Test als zweiter Screentest durchgeführt und fällt der Test positiv aus, so sind zur Sicherung der Diagnose weitere Tests nach dem Flussdiagramm erforderlich.

Dieses Testverfahren wird als Hauptscreentest nur empfohlen, wenn es fachkundig durchgeführt werden kann.

Hinweis: Vorangehende Tests mit diesem Verfahren müssen gewährleisten, mindestens 10^3 bis 10^4 Zellen von *R. solanacearum* je ml, die Probenextrakten mit vorhergehendem negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen. Möglicherweise sind Optimierungsversuche erforderlich, um in allen Laboratorien ein höchstmögliches Niveau an Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten.

Validierte PCR-Reagenzien und -Protokolle (siehe Anlage 6) verwenden. Vorzugsweise eine Methode mit interner Kontrolle wählen.

Alle erforderlichen Vorkehrungen treffen, um eine Kontamination der Probe mit Ziel-DNA zu vermeiden. Der PCR-Test ist von erfahrenen Technikern und in für molekular-biologische Arbeiten vorgesehenen Laboratorien durchzuführen, um das Risiko einer Kontamination mit Ziel-DNA auf ein Mindestmaß zu begrenzen.

Negativkontrollen (für DNA-Extraktions- und PCR-Verfahren) sind stets als letzte Probe zu behandeln, damit nachvollziehbar bleibt, ob eine DNA-Verschleppung stattgefunden hat.

Die folgenden Negativkontrollen sollten in den PCR-Test einbezogen werden:

- Probenextrakt, der zuvor negativ auf *R. solanacearum* getestet wurde;
- Pufferkontrollen, die zum Extrahieren des Bakteriums und der DNA aus der Probe verwendet werden;
- PCR-Reaktionsmischung.

Die folgenden Positivkontrollen sollten in den PCR-Test einbezogen werden:

- Aliquots resuspendierter Pellets, denen *R. solanacearum* zugegeben wurde (Vorbereitung siehe Anlage 3 Abschnitt B);
- eine Suspension aus 10^6 Zellen je ml *R. solanacearum* in Wasser aus einem virulenten Isolat (z. B. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; siehe Anlage 3 Abschnitt B);
- soweit möglich während des PCR-Tests auch DNA aus positiven Kontrollproben verwenden.

Um potenzielle Kontaminationen zu vermeiden, sind Positivkontrollen von den Testproben räumlich getrennt vorzubereiten.

Probenextrakte sollten möglichst frei von Erdresten sein. Daher empfiehlt sich in bestimmten Fällen, Extrakte aus gewaschenen Kartoffeln herzustellen, wenn PCR-Protokolle angewandt werden sollen.

Die für diesen Test zur Verfügung stehenden standardisierten Positiv- und Negativ-Kontrollmaterialien sind in Anlage 3 aufgeführt.

6.1. DNA-Reinigungsmethoden

Positive und negative Kontrollproben wie oben beschrieben verwenden (siehe Anlage 3).

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe(n).

Es stehen diverse Methoden zur Reinigung der Ziel-DNA aus komplexen Probensubstraten zur Verfügung, wodurch PCR-Inhibitoren entfernt und andere enzymatische Reaktionen ausgeschlossen werden und die Ziel-DNA im Probenextrakt konzentriert wird. Die folgende Methode wurde zur Verwendung mit der validierten PCR-Methode (Anlage 6) optimiert.

a) Methode nach Pastrik (2000)

- 1) 220 µl Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen pipettieren.
- 2) 100 µl Probenextrakt zugeben und bei 95 °C für 10 Minuten in einen Thermoblock oder ein Wasserbad stellen.
- 3) Röhrchen 5 Minuten auf Eis kühlen.
- 4) 80 µl Lysozym-Stammlösung (50 mg Lysozym je ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- 5) 220 µl Easy-DNA[®]-Lösung A (Invitrogen) zugeben, durch Vortexen mischen und für 30 Minuten bei 65 °C inkubieren.
- 6) 100 µl Easy-DNA[®]-Lösung B (Invitrogen) zugeben und kräftig vortexen, bis das Präzipitat im Röhrchen frei fließt und die Probe gleichmäßig viskös ist.
- 7) 500 µl Chloroform zugeben und vortexen, bis die Viskosität nachlässt und die Mischung homogen wird.
- 8) Zur Phasentrennung und Ausbildung der Interphase bei 15 000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugieren.
- 9) Oberphase in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen überführen.
- 10) 1 ml 100 %iges Ethanol (– 20 °C) zugeben, kurz vortexen und für 10 Minuten auf Eis inkubieren.
- 11) Bei 15 000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugieren und Ethanol vom Pellet entfernen.
- 12) 500 µl 80 %iges Ethanol (– 20 °C) zugeben und durch Invertieren des Röhrchens mischen.
- 13) Bei 15 000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugieren, das Pellet bewahren und das Ethanol entfernen.
- 14) Pellet an der Luft oder in einer DNA-Speedvac trocknen lassen.
- 15) Pellet in 100 µl sterilem Reinstwasser (UPW) resuspendieren und bei Raumtemperatur mindestens 20 Minuten stehen lassen.
- 16) Bei – 20 °C lagern, bis es für die PCR benötigt wird.
- 17) Etwa vorhandenes weißes Präzipitat abzentrifugieren und 5 µl des DNA-haltigen Überstands für die PCR verwenden.

b) Andere Methoden

Andere Methoden der DNA-Extraktion (z. B. Qiagen DNeasy Plant Kit) sind akzeptabel, sofern sie DNA aus Kontrollproben mit 10^3 bis 10^4 Zellen des Krankheitserregers je ml nachweislich ebenso wirksam reinigen.

6.2. PCR

- 6.2.1. Test- und Kontroll-Templates nach dem validierten Protokoll (Abschnitt VI.A.6) für die PCR vorbereiten. Eine Dezimalverdünnung des Proben-DNA-Extrakts (1:10 in UPW) herstellen.
- 6.2.2. Nach dem vorgegebenen Protokoll (Anlage 6) in einem kontaminationsfreien Umfeld eine geeignete PCR-Reaktionsmischung herstellen. Es wird empfohlen, wenn möglich ein Multiplex-PCR-Protokoll zu verwenden, das auch eine interne PCR-Kontrolle enthält.
- 6.2.3. Nach den vorgegebenen PCR-Protokollen (Anlage 6) 2 bis 5 µl DNA-Extrakt je 25 µl PCR-Reaktion in sterile PCR-Röhrchen geben.
- 6.2.4. Eine negative Kontrollprobe mit ausschließlich PCR-Reaktionsmischung einbeziehen und anstelle der Probe UPW zugeben, das zur Herstellung der PCR-Mischung verwendet wurde.
- 6.2.5. Die Röhrchen in den Thermocycler stellen, der für die vorausgehenden Tests verwendet wurde, und das entsprechend optimierte PCR-Programm (Anlage 6) verwenden.

6.3. Analyse des PCR-Produktes

- 6.3.1. PCR-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen. Dazu mindestens 12 µl amplifizierte DNA-Reaktionsmischung jeder Probe, mit 3 µl Beladungspuffer (Anlage 6) gemischt, in 2,0 % (w/v) Agarose-Gelen in Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer (Anlage 6) bei 5-8 V je cm laufen lassen. Einen geeigneten DNA-Marker, z. B. „100 bp ladder“, verwenden.
- 6.3.2. DNA-Banden durch Anfärben in Ethidiumbromid (0,5 mg je l) für 30-60 Minuten sichtbar machen. Dieses Mutagen vorsichtig handhaben.
- 6.3.3. Das angefärbte Gel unter UV-Transillumination ($\lambda = 302 \text{ nm}$) auf amplifizierte PCR-Produkte der erwarteten Größe (Anlage 6) untersuchen und dokumentieren.
- 6.3.4. Bei neuen Feststellungen/Fällen ist die Authentizität des PCR-Fragments durch Restriktionsenzymanalyse an einer Probe der verbliebenen amplifizierten DNA zu bestätigen, d. h. die Probe bei optimaler Temperatur und Zeitdauer mit einem geeigneten Enzym und Puffer (Anlage 6) zu inkubieren. Die verdauten Fragmente wie zuvor durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen, nach Anfärben mit Ethidiumbromid charakteristische Restriktionsfragmentmuster unter UV-Transillumination prüfen und mit der unverdauten und verdauten Positivkontrolle vergleichen.

Auswertung des PCR-Testergebnisses:

Der PCR-Test ist negativ, wenn das *R.-solanacearum*-spezifische PCR-Produkt der erwarteten Größe nicht für die untersuchte Probe, jedoch für alle positiven Kontrollproben nachgewiesen wird (bei Multiplex-PCR mit pflanzen-spezifischen internen Kontrollprimern muss ein zweites PCR-Produkt der erwarteten Größe in der untersuchten Probe amplifiziert werden).

Der PCR-Test ist positiv, wenn das *R.-solanacearum*-spezifische PCR-Produkt der erwarteten Größe und (soweit erforderlich) des erwarteten Restriktionsmusters nachgewiesen wird, vorausgesetzt, es wird nicht in einer der negativen Kontrollproben amplifiziert. Ein positives Ergebnis kann auch durch Wiederholung des Tests mit einem zweiten PCR-Primerset (Anlage 6) verlässlich bestätigt werden.

Hinweis: Es besteht Verdacht auf PCR-Hemmung, wenn das erwartete Fragment aus der positiven Kontrollprobe stammt, die *R. solanacearum* in Wasser enthält, bei positiven Kontrollproben, die *R. solanacearum* in Kartoffelextrakt enthalten, jedoch negative Ergebnisse erzielt werden. In Multiplex-PCR-Protokollen mit internen PCR-Kontrollen liegt eine Reaktionshemmung vor, wenn keines der beiden Fragmente erhalten wird.

Es besteht Verdacht auf Kontamination, wenn das erwartete Fragment in einer oder mehrerer der Negativkontrollen erhalten wird.

7. FISH-Test

Grundsatz

Wird der FISH-Test als erster Screeningtest angewandt und fällt dieser Test positiv aus, so muss obligatorisch als zweiter Screeningtest der IF-Test durchgeführt werden. Wird der FISH-Test als zweiter Screeningtest durchgeführt und fällt der Test positiv aus, so sind zur Sicherung der Diagnose weitere Tests nach dem Flussdiagramm erforderlich.

Hinweis: Validierte *R. solanacearum*-spezifische Oligo-Sonden (siehe Anlage 7) verwenden. Vorausgehende Tests mit diesem Verfahren müssen gewährleisten, mindestens 10^3 bis 10^4 Zellen von *R. solanacearum* je ml, die Probenextrakten mit zuvor negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen.

Das im Folgenden beschriebene Verfahren ist vorzugsweise an frisch hergestelltem Probenextrakt durchzuführen, kann aber auch bei Probenextrakten angewandt werden, die bei -16 bis -24 °C oder bei -68 bis -86 °C unter Glycerinzugabe gelagert wurden.

Als Negativkontrollen sind Aliquots von Probenextrakten zu verwenden, die zuvor mit negativem Testergebnis auf *R. solanacearum* untersucht wurden.

Als Positivkontrollen aus einer 3-5 Tage alten Kultur Suspensionen mit 10^5 bis 10^6 Zellen von *R. solanacearum* Biovar 2 (z. B. Stamm NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, siehe Anlage 3) je ml in 0,01 M Phosphatpuffer (PB) vorbereiten. Separate Objektträger mit Positivkontrollen des homologen Stammes oder eines anderen Referenzstammes von *R. solanacearum*, in Kartoffelextrakt suspendiert, vorbereiten (siehe Anlage 3 B).

Die FITC-markierte eubakterielle Oligo-Sonde bietet insofern eine Kontrolle für den Hybridisierungsprozess, als sie alle Eubakterien anfärbt, die in der Probe vorhanden sind.

Die für diesen Test zur Verfügung stehenden standardisierten Positiv- und Negativ-Kontrollmaterialien sind in Anlage 3 Abschnitt A aufgeführt.

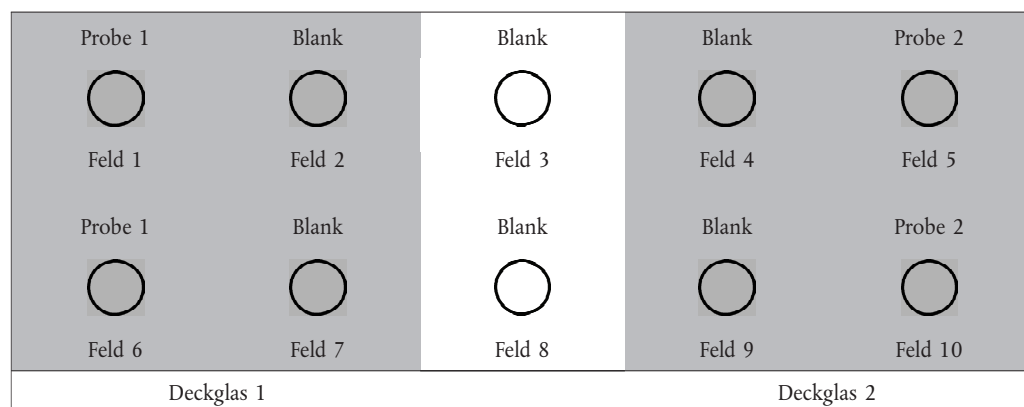
Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe(n).

7.1. Fixierung des Kartoffelextrakts

Das folgende Protokoll basiert auf Wullings *et al.*, (1998):

- 7.1.1. Fixierlösung herstellen (siehe Anlage 7).
- 7.1.2. 100 µl von jedem Probenextrakt in ein Eppendorf-Röhrchen pipettieren und für 7 Minuten bei 7 000 g zentrifugieren.
- 7.1.3. Überstand verwerfen und das Pellet in 200 µl Fixiermittel, das < 24 Stunden zuvor angesetzt wurde, lösen. Vortexen und 1 Stunde lang im Kühlschrank inkubieren.
- 7.1.4. Für 7 Minuten bei 7 000 g zentrifugieren. Überstand verwerfen und das Pellet in 75 µl 0,01 M PB resuspendieren (siehe Anlage 7).
- 7.1.5. 16 µl der fixierten Suspensionen auf einen sauberen Multitest-Objektträger (siehe Abbildung 7.1) auftragen. Zwei verschiedene Proben je Objektträger auftragen, unverdünnt und 10 µl zur Herstellung einer 1/100-Verdünnung (in 0,01 M PB) verwenden. Die restliche Probenlösung (49 µl) kann nach Zugabe von 1 Volumen 96 %igem Ethanol bei -20 °C gelagert werden. Für den Fall, dass der FISH-Test wiederholt werden muss, das Ethanol abzentrifugieren und dasselbe Volumen von 0,01 M PB zugeben (durch Vortexen vermischen).

Abb. 7.1. Layout des FISH-Objektträgers



- 7.1.6. Objektträger an der Luft (oder bei 37 °C auf einer Wärmebank) trocknen lassen und anschließend durch Abflammen fixieren.

In dieser Phase des Verfahrens kann die Hybridisierung unterbrochen und am nächsten Tag fortgesetzt werden. Objektträger sollten staubfrei und trocken bei Raumtemperatur gelagert werden.

7.2. Hybridisierung

- 7.2.1. Die Zellen in aufsteigender Ethanolreihe von 50 %, 80 % und 96 % für jeweils 1 Minute dehydratisieren. Objektträger in einem Objektträgerhalter lufttrocknen lassen.

- 7.2.2. Durch Auslegen des Bodens einer luftdichten Box mit Zellstoff- oder Filterpapier, das in 1x Hybmix (Anlage 7) eingeweicht wurde, eine feuchte Inkubationskammer vorbereiten. Die Box im Hybridisierungsöfen bei 45 °C für mindestens 10 Minuten vorinkubieren.

- 7.2.4. Die ersten und letzten vier Felder ohne Lufteinschluss mit Deckgläsern (24 × 24 mm) abdecken. Objektträger in die vorgewärmte feuchte Kammer geben und für 5 Stunden im Ofen bei 45 °C im Dunkeln hybridisieren.

- 7.2.5. Drei Becher vorbereiten mit 1 l Reinstwasser (UPW), 1 l 1x Hybmix (334 ml 3x Hybmix und 666 ml UPW) und 1 l 1/8x Hybmix (42 ml 3x Hybmix und 958 ml UPW) und jeweils im Wasserbad bei 45 °C vorinkubieren.

- 7.2.6. Deckgläser abnehmen und Objektträger in einen Objektträgerhalter stellen.

- 7.2.7. Auswaschen der überschüssigen Sonde durch 15-minütiges Inkubieren bei 45 °C im Becher mit 1x Hybmix.

- 7.2.8. Objektträgerhalter in 1/8 Hybmix-Waschlösung stellen und für weitere 15 Minuten inkubieren.

- 7.2.9. Objektträger kurz in den Becher mit UPW tauchen und auf Filterpapier setzen. Überschüssige Feuchtigkeit durch leichtes Abdecken der Oberfläche mit Filterpapier aufsaugen. 5-10 µl Antifading-Deckflüssigkeit (z. B. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA o.Ä.) auf jedes Feld geben und den gesamten Objektträger mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm) abdecken.

7.3. FISH-Test-Befund

- 7.3.1. Den Objektträger unverzüglich unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop bei 630- oder 1 000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion untersuchen. Mit einem für die FITC-Markierung (Fluorescein-Isothiocyanat) geeigneten Filter werden eubakterielle Zellen (einschließlich der meisten Gram-negativen Zellen) in der Probe leuchtend grün angefärbt. Mit einem Filter für Tetramethylrhodamin-5-Isothiocyanat leuchten Cy3-angefärbte Zellen von *R. solanacearum* fluoreszierend rot. Die Zellmorphologie mit der der Positivkontrollen vergleichen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und vollständig gefärbt sein. Der FISH-Test (Abschnitt VI.A.7) ist bei abweichender Färbung zum Normalzustand zu wiederholen. Jedes Sichtfeld in zwei rechtwinklig zueinander stehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen. Bei Proben, die keine oder nur wenige Zellen zeigen, mindestens 40 Mikroskopfelder untersuchen.

- 7.3.2. Auf stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie von *R. solanacearum* in den Testfeldern auf den Testobjektträgern untersuchen (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Die Intensität der Fluoreszenz muss der des positiven Kontrollstammes entsprechen oder stärker sein. Unvollständig gefärbte oder schwach fluoreszierende Zellen sind nicht zu berücksichtigen.

- 7.3.3. Bei jeglichem Verdacht auf eine Kontamination ist der Test zu wiederholen. Dies kann der Fall sein, wenn alle Objektträger in einer Charge wegen Pufferkontamination positive Zellen zeigen oder wenn positive Zellen auf der Objektträgerbeschichtung (außerhalb der Felder) gefunden werden.

- 7.3.4. Der FISH-Test hat in Bezug auf die Spezifität verschiedene Probleme. Es ist damit zu rechnen, dass in Pellets aus Kartoffelnabelenden und Stängelstücken Hintergrundpopulationen fluoreszierender Zellen mit atypischer Morphologie und kreuzreagierende saprophytische Bakterien mit *R.-solanacearum*-ähnlicher Größe und Morphologie auftreten, wenn auch weniger häufig als beim IF-Test.
- 7.3.5. Es sind nur fluoreszierende Zellen typischer Größe und Morphologie zu berücksichtigen.
- 7.3.6. Auswertung des FISH-Test-Befundes:
- i) Gültig sind FISH-Test-Ergebnisse, wenn mit Hilfe des FITC-Filters grün fluoreszierende Zellen mit *R.-solanacearum*-typischer Größe und Morphologie und mit Hilfe des Rhodaminfilters rot fluoreszierende Zellen in allen Positivkontrollen, jedoch in keiner einzigen Negativkontrolle festgestellt werden. Werden hellfluoreszierende Zellen einer *R.-solanacearum*-typischen Morphologie beobachtet, für jedes mikroskopische Feld die durchschnittliche Anzahl typischer Zellen schätzen und die Zahl der typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet (Anlage 4) berechnen. Proben mit mindestens 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet gelten als potenziell kontaminiert, und weitere Tests sind erforderlich. Proben mit weniger als 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet gelten als negativ.
 - ii) Der FISH-Test ist negativ, wenn mit dem Rhodaminfilter keine rot fluoreszierenden Zellen mit *R.-solanacearum*-typischer Größe und Morphologie festgestellt werden, vorausgesetzt allerdings, dass sich in den Positivkontrollen bei Verwendung des Rhodaminfilters typische rot fluoreszierende Zellen nachweisen lassen.

8. ELISA-Tests

Grundsatz

Aufgrund seiner relativ geringen Sensitivität kann der ELISA-Test nur als fakultativer Test in Ergänzung zum IF-, PCR- oder FISH-Test durchgeführt werden. Soll DAS-ELISA verwendet werden, so sind Anreicherung und die Verwendung von monoklonalen Antikörpern obligatorisch (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Um die Sensitivität des Tests zu erhöhen, kann es sinnvoll sein, die Proben vor der Durchführung des ELISA-Tests anzureichern, aber das kann aufgrund anderer konkurrierender Organismen in der Probe scheitern.

Hinweis: Validierte Herkünfte von Antikörpern gegen *R. solanacearum* verwenden (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Der Titer ist für jede neue Antikörpercharge zu bestimmen. Der Titer wird definiert als die höchste Verdünnung, bei der eine optimale Reaktion eintritt, wenn eine Suspension aus 10^5 bis 10^6 Zellen je ml des homologen Stammes von *R. solanacearum* mit einem geeigneten sekundären Antikörper-Konjugat nach Herstellervorgaben getestet wird. Für den Test sollten die Antikörper in Arbeitsverdünnungen auf oder sehr nah am Titerwert der handelsüblichen Formulierung verwendet werden.

Den Titer der Antikörper auf einer Suspension aus 10^5 bis 10^6 Zellen je ml des homologen *R.-solanacearum*-Stamms bestimmen.

Probenextrakt, der zuvor mit negativem Ergebnis auf *R. solanacearum* getestet wurde, und die Suspension eines nicht kreuzreagierenden Bakteriums in phosfatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Negativkontrollen einbeziehen.

Als Positivkontrolle Aliquots eines Probenextrakts mit vorhergehendem negativem Testergebnis, mit 10^3 bis 10^4 Zellen je ml von *R. solanacearum* Biovar 2 (z. B. Stamm NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, siehe Anlage 2 Abschnitte A und B) gemischt, verwenden. Zum Vergleich der Ergebnisse auf jeder Platte eine Standardsuspension von 10^5 bis 10^6 Zellen je ml von *R. solanacearum* in PBS verwenden. Darauf achten, dass die Positivkontrollen auf der Mikrotiterplatte von den Testproben deutlich getrennt aufgetragen sind.

Die für diesen Test zur Verfügung stehenden standardisierten Positiv- und Negativ-Kontrollmaterialien sind in Anlage 3 Abschnitt A aufgeführt.

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe(n).

Zwei ELISA-Protokolle wurden validiert:

- a) Indirekter ELISA (Robinson Smith *et al.*, 1995)
 - 1) 100-200 μ l Aliquots des Probenextrakts verwenden (durch Erhitzen für 4 Minuten bei 100 °C im Wasserbad oder im Thermoblock lassen sich unspezifische Ergebnisse in einigen Fällen reduzieren).
 - 2) Gleiches Volumen doppelt konzentrierten Beschichtungspuffer (Anlage 4) zugeben und vortexen.
 - 3) In mindestens zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatte (z. B. Nunc-Polysorp oder gleichwertige Platte) Aliquots von jeweils 100 μ l geben und eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubieren.

- 4) Extrakte aus den Vertiefungen vollständig entfernen. Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 4) waschen; die letzte Waschlösung sollte dabei mindestens 5 Minuten in den Vertiefungen bleiben.
- 5) Die geeignete Verdünnung von *R.-solanacearum*-Antikörpern in Blockierungs-Puffer (Anlage 4) herstellen. Für validierte handelsübliche Antikörper die empfohlenen Verdünnungen (in der Regel doppelte Konzentration des Titors) verwenden.
- 6) 100 µl in jede Vertiefung geben und eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 7) Antikörperlösung aus den Vertiefungen vollständig entfernen und Vertiefungen wie zuvor beschrieben (Nummer 4) waschen.
- 8) Die geeignete Verdünnung des sekundären Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugats in Blockierungs-Puffer herstellen. 100 µl in jede Vertiefung geben und eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 9) Antikörperkonjugat aus den Vertiefungen vollständig entfernen und Vertiefungen wie zuvor beschrieben (Nummer 4) waschen.
- 10) 100 µl Alkalische-Phosphatasesubstratlösung (Anlage 4) in jede Vertiefung geben. Im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren und in regelmäßigen Abständen innerhalb von 90 Minuten Extinktion bei 405 nm messen.

b) DASi ELISA

- 1) Die geeignete Verdünnung von polyklonalen Anti-*R.-solanacearum*-Immunglobulinen in Beschichtungspuffer pH 9,6 (Anlage 4) herstellen. 200 µl in jede Vertiefung geben. 4 bis 5 Stunden bei 37 °C oder 16 Stunden bei 4 °C inkubieren.

- 2) Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 4) waschen.

In mindestens zwei Vertiefungen 190 µl des Probenextrakts geben. In zwei Vertiefungen jeder Platte außerdem Positiv- und Negativkontrollen geben. 16 Stunden bei 4 °C inkubieren.

- 3) Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 4) waschen.
- 4) Eine geeignete Verdünnung von *R.-solanacearum*-spezifischen monoklonalen Antikörpern in PBS (Anlage 4) herstellen, die außerdem 0,5 %iges bovines Serumalbumin (BSA) enthält, und 190 µl in jede Vertiefung geben. 2 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 5) Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 4) waschen.
- 6) Eine geeignete Verdünnung von Anti-Maus-Immunglobulinen konjugiert mit alkalischer Phosphatase in PBS herstellen. 190 µl in jede Vertiefung geben. 2 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 7) Vertiefungen dreimal mit PBS-Tween (Anlage 4) waschen.
- 8) Eine Alkalische-Phosphatase-Substratlösung mit 1 mg p-Nitrophenyl-Phosphat je ml Substratpuffer (Anlage 4) herstellen. 200 µl in jede Vertiefung geben. Im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren und in regelmäßigen Abständen innerhalb von 90 Minuten Extinktion bei 405 nm messen.

Auswertung der ELISA-Testergebnisse

Der ELISA-Test ist negativ, wenn die durchschnittliche optische Dichte (OD) der Vertiefungen der Duplikatprobe < 2x OD der Vertiefung mit dem negativen Probenextrakt beträgt, sofern die OD für die Positivkontrollen alle über 1,0 (nach 90-minütigem Inkubieren mit dem Substrat) betragen und größer als das Doppelte der OD der negativen Probenextrakte sind.

Der ELISA-Test ist positiv, wenn die durchschnittliche optische Dichte (OD) der Vertiefungen der Duplikatprobe > 2x OD der Vertiefung mit dem negativen Probenextrakt beträgt, sofern die abgelesene OD bei allen Vertiefungen mit Negativkontrollen < 2x der Vertiefungen mit den Positivkontrollen beträgt.

Negative ELISA-Ableseergebnisse der Vertiefungen mit den Positivkontrollen weisen darauf hin, dass der Test nicht korrekt durchgeführt wurde oder dass eine Hemmung stattgefunden hat. Positive ELISA-Ableseergebnisse bei Negativkontrollen deuten auf eine Kreuzkontamination oder nichtspezifische Bindung der Antikörper hin.

9. Biotest

Hinweis: Vorausgehende Tests mit diesem Verfahren müssen garantieren, mindestens 10^3 bis 10^4 koloniebildende Einheiten von *R. solanacearum* je ml, die Probenextrakten mit zuvor negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen (für die Vorbereitung siehe Anlage 3).

Optimale Nachweisempfindlichkeit ist unter optimalen Wachstumsbedingungen und bei Verwendung von frisch hergestelltem Probenextrakt gegeben. Die Methode ist jedoch auch für Extrakte geeignet, die bei -68 bis -86 °C unter Glycerinzugabe gelagert wurden.

Protokoll nach Janse (1988):

- 9.1. Für jede Probe sind 10 Testpflanzen anfälliger Tomatensorten (z. B. Moneymaker oder Sorten mit gleichwertiger Anfälligkeit, die durch das Testlabor bestimmt wurde) im Blattstadium 3 zu verwenden. Für Einzelheiten zur Kultivierung siehe Anlage 8. Als Alternative können Auberginen (z. B. Sorte Black Beauty oder Sorten mit gleichwertiger Anfälligkeit) verwendet werden. Nur Pflanzen im Blattstadium 2-3, d. h. bis zur vollen Ausbildung des dritten Blattes, verwenden. Es hat sich gezeigt, dass die Symptome bei Auberginen weniger ausgeprägt sind und sich langsamer entwickeln, so dass empfohlen wird, möglichst Tomatenjungpflanzen zu verwenden.

- 9.2. 100 µl des Probenextrakts auf die Testpflanzen verteilen.

9.2.1. Spritzeninokulation

Die Pflanzenstängel mit einer Spritze, die mit einer hypodermischen Nadel (nicht weniger als 23G) versehen ist, direkt über den Keimblättern beimpfen. Die Probe auf die Testpflanzen verteilen.

9.2.2. Schlitzinokulation

Die Pflanze zwischen zwei Fingern halten, einen Tropfen (etwa 5 bis 10 µl) des suspendierten Pellets zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt auf den Stängel pipettieren.

Mit einem sterilen Skalpell den Stängel vom Pellettropfen aus diagonal ca. 1,0 cm lang und etwa zwei Drittel der Stängeldicke tief einritzen.

Den Schnitt mit steriler Vaseline (Spritze) verschließen.

- 9.3. Nach derselben Inokulationsmethode jeweils fünf Sämlinge mit einer wässrigen Suspension von 10^5 bis 10^6 Zellen je ml aus einer 48-Stunden-Kultur eines virulenten Biovar-2-Stamms von *R. solanacearum* als Positivkontrolle und mit Pelletpuffer (Anlage 4) als Negativkontrolle beimpfen. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sind die positiven und negativen Kontrollpflanzen von den anderen Pflanzen zu trennen.

- 9.4. Die Testpflanzen in Quarantäneeinrichtungen bis zu vier Wochen bei 25-30 °C und hoher relativer Luftfeuchtigkeit weiter wachsen lassen und regelmäßig wässern, um Staunässe oder Welken durch Wassermangel zu verhindern. Um Kontaminationen zu vermeiden, positive und negative Kontrollpflanzen auf getrennten Arbeitstischen in einem Gewächshaus oder einer Wachstumskammer inkubieren oder, bei Platzmangel, sicherstellen, dass die Behandlungen streng getrennt erfolgen. Müssen verschiedene Proben eng nebeneinander inkubiert werden, so sind sie durch geeignete Schutzwände zu trennen. Beim Düngen, Wässern, Untersuchen oder anderen Behandlungen sind alle erforderlichen Vorkehrungen zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Gewächshäuser und Wachstumskammern müssen unbedingt frei von Insekten jeder Art gehalten werden, da diese das Bakterium von Probe zu Probe übertragen können.

Auf Anzeichen von Welke, Epinastie, Chlorosen und/oder Wachstumsstörungen achten.

- 9.5. Von infizierten Pflanzen isolieren (Abschnitt II.3) und gereinigte Kulturen von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten identifizieren (Abschnitt VI.B).
- 9.6. Werden nach drei Wochen keine Symptome festgestellt, den IF-/PCR-/ Isolierungstest an einer Mischprobe von 1 cm langen Stängelstücken jeder Testpflanze, die über der Inokulationsstelle herausgeschnitten werden, durchführen. Bei positivem Testergebnis den Verdünnungsausstrichtest (Abschnitt 4.1) durchführen.
- 9.7. Reinkulturen von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten identifizieren (Abschnitt VI. B).

Auswertung des Biotest-Ergebnisses

Gültig sind Biotestergebnisse, wenn Pflanzen der Positivkontrolle typische Symptome zeigen, das Bakterium von diesen Pflanzen reisoliert werden kann und bei den Negativkontrollen keine Symptome festgestellt werden.

Das Testergebnis ist negativ, wenn die Testpflanzen nicht mit *R. solanacearum* infiziert sind und sofern *R. solanacearum* in Positivkontrollen nachgewiesen wird.

Das Testergebnis ist positiv, wenn die Testpflanzen mit *R. solanacearum* infiziert sind.

B. IDENTIFIZIERUNGSTESTS

Reinkulturen von *R.-solanacearum*-verdächtigen Isolaten mit mindestens zwei der folgenden Testmethoden identifizieren, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen.

Für jeden durchgeführten Test ggf. bekannte Referenzstämme einbeziehen (siehe Anlage 3).

1. Nähr- und enzymatische Tests zur Identifizierung

Die folgenden phänotypischen Eigenschaften, die bei *R. solanacearum* entweder allgemein vorhanden oder nicht vorhanden sind, nach den Methoden von Lelliott and Stead (1987), Klement *et al.* (1990) und Schaad (2001) bestimmen.

Test	Erwartetes Ergebnis
Produktion fluoreszierender Pigmente	–
Poly- β -hydroxybutyrat-Einschlüsse	+
Oxidations-/Fermentationstest (O/F)	O+/F–
Katalaseaktivität	+
Kovac's Oxidase-Test	+
Nitratreduktion	+
Citratverwertung	+
Wachstum bei 40 °C	–
Wachstum in 1 % NaCl	+
Wachstum in 2 % NaCl	–
Arginin-Dihydrolase-Aktivität	–
Gelatineverflüssigung	–
Stärkehydrolyse	–
Aesculinhydrolyse	–
Levanproduktion	–

2. IF-Test

- 2.1. Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in IF-Puffer herstellen (Anlage 4).
- 2.2. Eine 2-fache Verdünnungsreihe eines geeigneten Antikörpers herstellen (siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. IF-Verfahren anwenden (Abschnitt VI.A.5).
- 2.4. Der IF-Test ist positiv, wenn der IF-Titer der Kultur dem der Positivkontrolle entspricht.

3. ELISA-Test

Hinweis: Neben dieser Methode keinen weiteren serologischen Test anwenden, wenn nur zwei Identifizierungstests durchgeführt werden.

- 3.1. Eine Suspension von ca. 10^8 Zellen je ml in 1x PBS (Anlage 4) herstellen.
- 3.2. Ein geeignetes ELISA-Verfahren mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen *R. solanacearum* anwenden.
- 3.3. Der ELISA-Test ist positiv, wenn der ELISA-Wert der Kultur mindestens der Hälfte des Wertes der Positivkontrolle entspricht.

4. PCR-Tests

- 4.1. Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in Reinstwasser (UPW) vorbereiten.
- 4.2. 100 µl der Zellsuspension in geschlossenen Röhrchen in einem Thermoblock oder Siedewasserbad bei 100 °C für 4 Minuten erhitzen. Die Proben können anschließend bis zu ihrer Verwendung bei – 16 bis – 24 °C gelagert werden.
- 4.3. Geeignete PCR-Verfahren anwenden, um *R.-solanacearum*-spezifische Fragmente zu amplifizieren (z. B. Seal *et al.* (1993); Pastrik and Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4. *R. solanacearum* gilt als positiv identifiziert, wenn die PCR-Produkte dieselbe Größe und dieselben Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen aufweisen wie der positive Kontrollstamm.

5. FISH-Test

- 5.1. Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in UPW herstellen.
- 5.2. FISH-Verfahren (Abschnitt VI.A.7) mit mindestens zwei *R.-solanacearum*-spezifischen Oligo-Sonden (Anlage 7) anwenden.
- 5.3. Der FISH-Test ist positiv, wenn die Kultur ebenso reagiert wie die Positivkontrolle.

6. Bestimmung des Fettsäureprofils (FAP)

- 6.1. Die Kultur auf Trypticase-Soja-Agar (Oxoid) für 48 Stunden bei 28 °C anzüchten.
- 6.2. Ein geeignetes FAP-Verfahren anwenden (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3. Ein FAP-Test ist positiv, wenn das Profil der verdächtigen Kultur mit dem der Positivkontrolle identisch ist. Das Vorliegen charakteristischer Fettsäuren (14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH und 18:1 2OH) und das Fehlen von 16:0 3OH deuten mit hoher Sicherheit auf *Ralstonia* sp. hin.

7. Stammcharakterisierungsmethoden

Für jeden neuen Fall, in dem *R. solanacearum* isoliert wurde, wird eine Stammcharakterisierung unter Anwendung einer der folgenden Methoden empfohlen.

Für jeden durchgeführten Test ggf. bekannte Referenzstämmen einbeziehen (siehe Anlage 3).

7.1. Biovarbestimmung

R. solanacearum wird nach der Fähigkeit, drei Disaccharide und drei Zuckeralkohole zu verwerten und/oder zu oxidieren, in Biovars unterteilt (Hayward, 1964, und Hayward *et al.*, 1990). Nährmedien für den Biovar-Test sind in Anlage 2 beschrieben. Der Test kann zuverlässig durch Stichbeimpfung der Medien mit Reinkulturen von *R.-solanacearum*-Isolaten und Inkubieren bei 28 °C durchgeführt werden. Werden die Nährmedien auf sterile 96er-Zellkulturplatten (200 µl pro Vertiefung) verteilt, so wird nach 72 Stunden ein Farbumschlag von olivgrün nach gelb sichtbar, was ein positives Testergebnis anzeigt.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Verwertung von:					
Maltose	–	+	+	–	+
Laktose	–	+	+	–	+
D(+)-Cellobiose	–	+	+	–	+
Mannitol	–	–	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	+	–
Dulcitol	–	–	+	+	–

Durch zusätzliche Tests kann Biovar 2 in Subphänotypen unterteilt werden:

	Biovar 2A (weltweit verbreitet)	Biovar 2A (in Chile und Kolumbien)	Biovar 2T (in tropischen Gebieten)
Verwertung von Trehalose	–	+	+
Verwertung von Meso-Inositol	+	–	+
Verwertung von D-Ribose	–	–	+
Pektolytische Aktivität ⁽¹⁾	gering	gering	hoch

⁽¹⁾ Siehe Lelliott and Stead (1987).

7.2. Genetischer Fingerabdruck

Die molekulare Unterscheidung von Stämmen des *R.-solanacearum*-Komplexes kann durch verschiedene Techniken erfolgen, einschließlich

7.2.1. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2. Repetitive Sequenz PCR mit REP-, BOX- und ERIC-Primern (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3. AFLP-Analyse (Amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

7.3. PCR-Methoden

Spezifische PCR-Primer (Pastrik *et al.*, 2003; siehe Anlage 6) können verwendet werden zur Unterscheidung der Stämme der Gruppe 1 (Biovar 3, 4 und 5) und der Gruppe 2 (Biovar 1, 2A und 2T) von *R. solanacearum*, wie ursprünglich durch RFLP-Analyse (Cook *et al.*, 1989) und 16S-rDNA-Sequenzierung (Taghavi *et al.*, 1996) festgelegt.

C. BESTÄTIGUNGSTEST

Der Pathogenitätstest dient der endgültigen Bestätigung der Diagnose von *R. solanacearum* und der Bewertung der Virulenz von als *R. solanacearum* identifizierten Kulturen.

1) Aus 24-48 Stunden alten zu testenden Kulturen und einem geeigneten positiven Kontrollstamm von *R. solanacearum* (z. B. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; siehe Anlage 3) ein Inokulum mit einer Zelldichte von etwa 10^6 Zellen/ml herstellen.

2) 5-10 anfällige Tomaten- bzw. Auberginensämlinge im Blattstadium 3 beimpfen (siehe Abschnitt VI.A.9).

- 3) Die Pflanzen bis zu zwei Wochen bei 25-28 °C inkubieren. Dabei für hohe relative Luftfeuchtigkeit sorgen und regelmäßig wässern, um Staunässe bzw. Trockenheitsstress zu verhindern. Bei Reinkulturen setzt die typische Welke innerhalb von zwei Wochen ein. Treten nach diesem Zeitraum keine Symptome auf, so kann die Kultur nicht als eine pathogene Form von *R. solanacearum* bestätigt werden.
 - 4) Auf Anzeichen von Welke und/oder Epinastie, Chlorose und Wachstumsstörungen achten.
 - 5) Von Pflanzen mit Symptomen wie folgt isolieren: Ein Stängelstück 2 cm oberhalb der Inokulationsstelle herausschneiden, zerkleinern und in wenig sterilem destilliertem Wasser oder 50 mM Phosphatpuffer (Anlage 4) suspendieren. Aus der Suspension durch Verdünnungsausstrich oder Ausstrich auf ein geeignetes Medium, vorzugsweise ein selektives Medium (Anlage 2), isolieren, 48-72 Stunden bei 28 °C inkubieren und auf Bildung typischer *R. solanacearum*-Kolonien achten.
-

Anlage 1

An der Optimierung und Validierung von Protokollen beteiligte Laboratorien

Labor ⁽¹⁾	Ort	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien und Linz	Österreich
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgien
Plantedirektoratet	Lyngby	Dänemark
Central Science Laboratory	York	England
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Schottland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankreich
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankreich
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Deutschland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Deutschland
State Laboratory	Dublin	Irland
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italien
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italien
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Niederlande
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Niederlande
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spanien
Swedish University of Agricultural Sciences	Uppsala	Schweden

⁽¹⁾ Kontaktperson: siehe Website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Anlage 2

Medien zur Isolierung und Kultivierung von *R. solanacearum***a) Universalnährmedien***Nähragar (NA)*

Nähragar (Difco)	23,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Hefe-Pepton-Glucose-Agar (YPGA)

Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Saccharose-Pepton-Agar (SPA)

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

pH 7,2-7,4

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Kelmans Tetrazolium-Medium

Casaminsäuren (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen und filtersterilisierte Lösung von 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (Sigma) bis zu einer Endkonzentration von 50 mg/l zugeben.

b) Validierte Selektivnährmedien

SMSA-Medium (Englebrecht, 1994, modifiziert von Elphinstone *et al.*, 1996)

Basismedium

Casaminsäuren (Difco)	1,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	10,0 g
Glyzerin	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco) (siehe Hinweis 2)	15,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Auf 50 °C abkühlen und für die angegebenen Endkonzentrationen filtersterilisierte wässrige Lösungen der folgenden Inhaltsstoffe zugeben:

Kristallviolett (Sigma)	5 mg/l
Polymixin-B-Sulfat (Sigma P-1004)	600 000 U (ca. 100 mg)/l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (ca. 25 mg)/l
Chloramphenicol (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (ca. 0,5 mg)/l
2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (Sigma)	50 mg/l

Hinweis:

1. Andere als die oben aufgeführten Reagenzien können das Wachstum von *R. solanacearum* beeinträchtigen.
2. An Stelle von Bacto-Agar (Difco) kann Agar No 1 (Oxoid) verwendet werden. In diesem Fall wächst *R. solanacearum* langsamer, allerdings kann auch das Wachstum konkurrierender Saprophyten verlangsamt sein. Es kann 1-2 Tage länger dauern, bis *R. solanacearum*-typische-Kolonien sichtbar werden, und die Rotfärbung kann heller und diffuser ausfallen als auf Bacto-Agar.
3. Durch Erhöhung der Bacitracin-Konzentration auf 2 500 U je Liter können die Populationen konkurrierender Bakterien verringert werden, ohne dass das Wachstum von *R. solanacearum* beeinträchtigt wird.

Nährmedien und Antibiotika-Stammlösungen im Dunkeln bei 4 °C lagern und innerhalb eines Monats aufbrauchen.

Vor Gebrauch sollten die Platten frei von Oberflächenkondensation sein.

Übermäßiges Trocknen der Platten vermeiden.

Nach der Vorbereitung jeder neuen Mediumcharge sollte eine Qualitätskontrolle vorgenommen werden. Zu diesem Zweck einen Ausstrich der Suspension einer Referenzkultur von *R. solanacearum* (siehe Anlage 3) vornehmen und nach 2-5 Tagen Inkubation bei 28 °C auf typische Kolonien untersuchen.

c) **Validierte Anreicherungsmedien**

SMSA-Bouillon (Elphinstone *et al.*, 1996)

Zubereitung wie für SMSA-Selektivagarmedium, jedoch ohne Bacto-Agar und 2,3,5-Tetrazoliumchlorid.

Wilbrink-Bouillon, modifiziert (Caruso *et al.*, 2002)

Saccharose	10 g
Proteose-Pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Destilliertes Wasser	1 l

Durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren und auf 50 °C abkühlen.

Wie für SMSA-Bouillon Antibiotika-Stammlösung hinzufügen.

Anlage 3

A. Handelsübliches standardisiertes Kontrollmaterial

a) Bakterienisolate

Es wird empfohlen, folgende Bakterienisolate als Standardreferenzmaterial entweder für Positivkontrollen (Tabelle 1) oder bei der Optimierung der Tests zur Vermeidung von Kreuzreaktionen (Tabelle 2) zu verwenden. Im Handel sind alle Stämme aus folgenden Sammlungen erhältlich:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Vereinigtes Königreich,
2. Kulturensammlung des ‚Plantenziektenkundige Dienst‘ (PD), Wageningen, Niederlande,
3. Collection française de bactéries phytopathogènes (CFBP), INRA — Station Phytobactériologie, Angers, Frankreich.

Tabelle 1. SMT-Referenzliste von *R.-solanacearum*-Isolaten

NCPBP-Code	SMT #	Sonstige Codes	Herkunftsland	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Ägypten	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Türkei	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	England	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Zypern	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Schweden	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgien	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Niederlande	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Frankreich	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Spanien	2
NCPBP 4161	76	B3B	Deutschland	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbien	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasilien	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australien	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Philippinen	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	China	5

(*) Als Standard Referenzstamm für *R. solanacearum* Biovar 2 (Rasse 3) verwenden.

Hinweis: Die Authentizität der oben aufgeführten Stämme ist nur gewährleistet, wenn sie aus einer authentischen Kultursammlung stammen.

Tabelle 2. SMT-Referenzliste von serologisch oder genetisch verwandten Bakterien zur Verwendung bei der Optimierung von Nachweistests

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

⁽¹⁾ Bei serologischen Tests (IF- und/oder ELISA-Test) mit polyklonalen Antisera potentiell kreuzreagierender Stamm.

⁽²⁾ Stamm, aus dem in einigen Laboratorien ein PCR-Produkt amplifiziert werden kann, das annähernd der Größe entspricht, die bei Verwendung der spezifischen Primer OLI-1 und Y-2 (siehe Anlage 6) erwartet wird.

⁽³⁾ Kreuzreaktion bei den meisten Tests wahrscheinlich, jedoch nur bei Bananen in Indonesien bekannt.

b) Handelsübliches standardisiertes Kontrollmaterial

Das folgende standardisierte Kontrollmaterial ist aus der NCPPB-Kultursammlung erhältlich.

Gefriergetrocknetes Kartoffelextrakt-Pellet aus 200 gesunden Kartoffelknollen als Negativkontrolle für alle Tests.

Gefriergetrocknetes Kartoffelextrakt-Pellet aus 200 gesunden Kartoffelknollen mit 10^3 bis 10^4 und 10^4 bis 10^6 Zellen der Biovariante 2 von *R. solanacearum* (Stamm NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) als Positivkontrollen für serologische und PCR-Tests. Da das Gefriergetrocknete die Lebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt, eignen sich diese nicht als Standardkontrollen für Isolierungstests oder Biotests.

Formalin-fixierte Suspensionen von *R. solanacearum* Biovar 2 (Stamm NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) mit 10^6 Zellen je ml als Positivkontrollen für serologische Tests.

B. Vorbereitung der Positiv- und Negativkontrollen für die Haupt-Screeningtests (PCR/IF und FISH)

Eine 48 Stunden alte Kultur eines virulenten Stammes von *R. solanacearum* Rasse 3/Biovar 2 (z. B. Stamm NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) auf SMSA-Basismedium anzüchten und in 10 mM Phosphatpuffer suspendieren, um eine Zelldichte von annähernd 2×10^8 cfu je ml zu erhalten. Dieses Ergebnis wird in der Regel erzielt durch eine leicht trübe Suspension mit einer optischen Dichte von 0,15 bei 600 nm.

An den Nabelenden von 200 Knollen einer gelbschaligen Kartoffelsortenpartie, die nachweislich frei von *R. solanacearum* ist, Stückchen aus dem Gefäßbündelring herausschneiden.

Die Nabelenden wie gewöhnlich verarbeiten und das Pellet in 10 ml resuspendieren.

10 sterile 1,5-ml-Mikroröhrchen mit 900 µl des resuspendierten Pellets herstellen.

100 µl der Suspension von *R. solanacearum* in das erste Röhrchen geben und vortexen.

In den nächsten fünf Röhrchen weitere Dezimalverdünnungen anlegen.

Die sechs kontaminierten Röhrchen als Positivkontrollen, die vier nicht kontaminierten Röhrchen als Negativkontrollen verwenden. Die Röhrchen entsprechend beschriften.

100 µl Aliquots in sterilen 1,5-ml-Röhrchen anlegen, um von jeder Kontrollprobe 9 Parallelproben zu erhalten. Bis zur weiteren Verwendung bei – 16 bis – 24 °C lagern.

Das Vorhandensein und die Quantifizierung von *R. solanacearum* in den Kontrollproben sollte zunächst durch den IF-Test bestätigt werden.

Für den PCR-Test bei jeder Testprobenreihe eine DNA-Extraktion aus positiven und negativen Kontrollproben vornehmen.

Für den IF- und FISH-Test bei jeder Testprobenreihe positive und negative Kontrollproben testen.

Beim IF-, FISH- und PCR-Test muss *R. solanacearum* zumindest in den Positivkontrollen mit 10^6 und 10^4 Zellen/ml, darf jedoch in keiner der Negativkontrollen nachgewiesen werden.

Anlage 4

Puffer für Testverfahren

ALLGEMEINE ANMERKUNG: Sterile Puffer können ungeöffnet bis zu einem Jahr lang gelagert werden.

1. Puffer für Extraktionsverfahren

1.1. Extraktionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0)

Dieser Puffer wird für die Extraktion des Bakteriums aus Pflanzengewebe durch Homogenisierung oder Schütteln verwendet.

Na ₂ HPO ₄ (anhydrid)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen lösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Die folgenden zusätzlichen Komponenten können zweckdienlich sein:

	Zweck	Menge (je Liter)
Lubrolflocken	Verflüssigungsmittel (*)	0,5 g
DC-Silicon-Antischaum	Schaumdämpfungsmittel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrophosphat	Antioxidationsmittel	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	Bindung von PCR-Inhibitoren	50 g

(*) Für die Extraktion durch Homogenisierung.

1.2. Pelletpuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2)

Dieser Puffer wird für die Resuspendierung und Verdünnung von Extrakten von Gewebestückchen verwendet, die an den Nabelenden von Kartoffelknollen herausgeschnitten wurden, nachdem sie durch Zentrifugieren zu Pellets konzentriert worden waren.

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

Substanzen auflösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

2. Puffer für den IF-Test

2.1. IF-Puffer (10 mM phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2)

Dieser Puffer wird für die Verdünnung von Antikörpern verwendet.

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

Substanzen auflösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

2.2. IF-Puffer-Tween

Dieser Puffer wird zum Waschen von Objektträgern verwendet.

0,1 % Tween 20 zum IF-Puffer geben.

2.3. Phosphatgepuffertes Glycerin, pH 7,6

Dieser Puffer wird als Einbettungsmittel auf den Feldern der IF-Objektträger zur Verbesserung der Fluoreszenz verwendet.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
Glycerin	50 ml
Destilliertes Wasser	100 ml

Antifading-Eindeckungsmittel sind beispielsweise als Vectashield[®] (Vector Laboratories) oder Citifluor[®] (Leica) im Handel erhältlich.

3. Puffer für den indirekten ELISA-Test

3.1. 2x Carbonat-Beschichtungs-Puffer, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen auflösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Um die Entwicklung von oxidierten aromatischen Verbindungen zu verhindern, kann Natriumsulfit (0,2 %) als Antioxidationsmittel hinzugegeben werden.

3.2. 10x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

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

3.3. PBS-Tween

10x PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilliertes Wasser	895 ml

3.4. (Antikörper)-Blockierungs-Puffer (muss frisch angesetzt werden)

10x PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Milchpulver	0,5 g
Destilliertes Wasser	auf 100 ml auffüllen

3.5. Alkalische-Phosphatase-Substratlösung, pH 9,8

Diethanolamin	97 ml
Destilliertes Wasser	800 ml

Mischen und mit konzentrierter HCl auf pH 9,8 einstellen.

Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

0,2 g $MgCl_2$ zugeben.

Je 15 ml Lösung 2 Phosphatase-Substratabletten (5 mg) (Sigma) auflösen.

4. **Puffer für den DASI-ELISA-Test**

4.1. Beschichtungspuffer, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Destilliertes Wasser	1 000 ml

Substanzen auflösen und pH-Wert auf 9,6 einstellen.

4.2. 10x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 - 7,4

NaCl	80,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	4,0 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	27,0 g
Destilliertes Wasser	1 000 ml

4.3. PBS-Tween

10x PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destilliertes Wasser	950 ml

4.4. Substratpuffer, pH 9,8

Diethanolamin	100 ml
Destilliertes Wasser	900 ml

Mischen und mit konzentrierter HCl auf pH 9,8 einstellen.

Anlage 5

Ermittlung des Kontaminationsgrads im IF- und FISH-Test

1. Mittlere Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je Sichtfeld (c) zählen.
2. Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je Mikroskopfeld des Objektträgers (C) berechnen.

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

wobei S = Fläche eines Feldes eines Multiwell-Objektträgers

und s = Fläche des Objektivfelds

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{wobei } i = \text{Feldkoeffizient (variiert zwischen 8 und 24 je nach Okulartyp)}$$

K = Tubuskoeffizient (1 oder 1,25)

G = Vergrößerung des Objektivs (100fach, 40fach usw.).

3. Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je ml resuspendiertes Pellet (N) berechnen.

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

wobei y = Volumen des resuspendierten Pellets auf jedem Objektträgerfeld

und F = Verdünnungsfaktor des resuspendierten Pellets.

Anlage 6

Validierte PCR-Protokolle und -Reagenzien

Hinweis: Vorausgehende Tests müssen den reproduzierbaren Nachweis von mindestens 10^3 bis 10^4 Zellen von *R. solanacearum* je ml Probenextrakt garantieren.

Vorausgehende Tests dürfen keine falsch-positiven Ergebnisse bei bestimmten ausgewählten Bakterienstämmen zeigen (siehe Anlage 3).

1. PCR-Protokoll von Seal et al. (1993)

1.1. Oligonucleotid-Primer

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

Erwartete Fragmentlänge des *R.-solanacearum*-spezifischen PCR-Produktes = 288 bp.

1.2. PCR-Reaktionsmischung

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	17,65 µl	
10x PCR-Puffer (1) (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-Mix (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq-Polymerase (5U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Probenvolumen	2,0 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

(1) Die Methode wurde validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTaq) und Gibco BRL.

1.3. PCR-Reaktionsbedingungen

Programmablauf:

1 Zyklus: i) 2 Minuten bei 96 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
 35 Zyklen: ii) 20 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
 iii) 20 Sekunden bei 68 °C (Primer-Anlagerung)
 iv) 30 Sekunden bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)
 1 Zyklus: v) 10 Minuten bei 72 °C (Endverlängerung)
 vi) auf 4 °C abkühlen.

Hinweis: Das Programm wurde für den Perkin-Elmer-9600-Thermocycler optimiert. Bei anderen Modellen (Geräten) kann eine Änderung der Dauer der Zyklusschritte ii), iii) und iv) erforderlich sein.

1.4. Restriktionsenzymanalyse des Fragments

PCR-Produkte, die von *R.-solanacearum*-DNA amplifiziert werden, zeigen nach Inkubation bei 37 °C mit dem Enzym Ava II einen erkennbaren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus.

2. PCR-Protokoll von Pastrik und Maiss (2000)

2.1. Oligonucleotid-Primer

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

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

Erwartete Fragmentlänge des *R.-solanacearum*-spezifischen PCR-Produktes = 553 bp.

2.2. PCR-Reaktionsmischung

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	16,025 µl	
10x PCR-Puffer (1)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (Fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-Mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Probenvolumen	5,0 µl	
Gesamtvolumen	25,0 µl	

(1) Die Methode wurde validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTaq) und Gibco BRL.

Hinweis: Ursprünglich für den MJ-Research-PTC-200-Thermocycler mit Gibco Taq-Polymerase optimiert.

Perkin Elmer AmpliTaq und Puffer können in denselben Konzentrationen verwendet werden.

2.3. PCR-Reaktionsbedingungen

Programmablauf:

- 1 Zyklus: i) 5 Minuten bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- 35 Zyklen: ii) 30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- iii) 30 Sekunden bei 68 °C (Primer-Anlagerung)
- iv) 45 Sekunden bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)
- 1 Zyklus: v) 5 Minuten bei 72 °C (Endverlängerung)
- vi) auf 4 °C abkühlen.

Hinweis: Dieses Programm wurde für den MJ-Research-PTC-200-Thermocycler optimiert. Bei anderen Modellen (Geräten) kann eine Änderung der Dauer der Zyklusschritte ii), iii) und iv) erforderlich sein.

2.4. Restriktionsenzymanalyse des Fragments

PCR-Produkte, die von *R.-solanacearum*-DNA amplifiziert werden, zeigen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C mit dem Enzym Taq I einen erkennbaren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Die Restriktionsfragmente der *R.-solanacearum*-spezifischen Fragmente haben eine Größe von 457 bp und 96 bp.

3. Multiplex-PCR-Protokoll mit interner PCR-Kontrolle (Pastrik *et al.*, 2002)

3.1. Oligonucleotid-Primer

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

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

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

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

Erwartete Fragmentlänge des *R.-solanacearum*-spezifischen PCR-Produktes = 718 bp (RS-Primerset).

Erwartete Fragmentlänge der 18S-rRNA-internen PCR-Kontrolle = 310 bp (NS-Primerset).

3.2. PCR-Reaktionsmischung

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	12,625 µl	
10x PCR-Puffer ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (Fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-Mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Probenvolumen	5,0 µl	
Gesamtvolumen	25,0 µl	

⁽¹⁾ Die Methode wurde validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTag) und Gibco BRL.

⁽²⁾ Die Konzentrationen der Primer NS-5-F und NS-6-R wurden optimiert für die Extraktion von Gewebestückchen von Kartoffelabelenden durch Homogenisierung und DNA-Reinigung nach Pastrik (2000) (siehe Abschnitt VI.A.6.1.a). Eine erneute Optimierung der Reagenzkonzentrationen wird erforderlich, wenn die Extraktion durch Schütteln oder nach anderen DNA-Isolierungsmethoden erfolgt.

3.3. PCR-Reaktionsbedingungen

Programmablauf:

- 1 Zyklus: i) 5 Minuten bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- 35 Zyklen: ii) 30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- iii) 30 Sekunden bei 58 °C (Primer-Anlagerung)
- iv) 45 Sekunden bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)
- 1 Zyklus: v) 5 Minuten bei 72 °C (Endverlängerung)
- vi) auf 4 °C abkühlen.

Hinweis: Dieses Programm wurde für den MJ-Research-PTC-200-Thermocycler optimiert. Bei anderen Modellen (Geräten) kann eine Änderung der Dauer der Zyklusschritte ii), iii) und iv) erforderlich sein.

3.4. Restriktionsenzym-Analyse des Fragments

PCR-Produkte, die von *R.-solanacearum*-DNA amplifiziert werden, zeigen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C mit dem Enzym *Bsm* I oder einem Isoschizomer (z. B. *Mva* 1269 I) einen erkennbaren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus.

4. *R.-solanacearum*-Biovar-spezifisches PCR-Protokoll (Pastrik *et al.*, 2001)

4.1. Oligonucleotid-Primer

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

Erwartete Fragmentlänge der *R.-solanacearum*-spezifischen PCR-Produkte:

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

mit Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp.

4.2. PCR-Reaktionsmischung

a) Biovar-1/2-spezifische PCR

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	12,925 µl	
10x PCR-Puffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (Fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-Mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq-Polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Probenvolumen	5,0 µl	
Gesamtvolumen	25,0 µl	

⁽¹⁾ Die Methode wurde validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTaq) und Gibco BRL.

b) Biovar-3/4/5-spezifische PCR

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	14,925 µl	
10x PCR-Puffer ⁽¹⁾	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (Fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-Mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1 U
Probenvolumen	5,0 µl	
Gesamtvolumen	25,0 µl	

⁽¹⁾ Die Methode wurde validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTaq) und Gibco BRL.

4.3. PCR-Reaktionsbedingungen

Programmablauf für Biovar-1/2- und Biovar-3/4/5-spezifische Reaktionen:

- 1 Zyklus: i) 5 Minuten bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- 35 Zyklen: ii) 30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
- iii) 30 Sekunden bei 58 °C (Primer-Anlagerung)
- iv) 45 Sekunden bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)
- 1 Zyklus: v) 5 Minuten bei 72 °C (Endverlängerung)
- vi) auf 4 °C abkühlen.

Hinweis: Dieses Programm wurde für den MJ-Research-PTC-200-Thermocycler optimiert. Bei anderen Modellen (Geräten) kann eine Änderung der Dauer der Zyklusschritte ii), iii) und iv) erforderlich sein.

4.4. Restriktionsenzymanalyse des Fragments

PCR-Produkte, die von *R. solanacearum*-DNA mit den Primern Rs-1-F und Rs-1-R amplifiziert werden, zeigen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C mit dem Enzym *Bsm* I oder einem Isoschizomer (z. B. *Mva* 1269 I) einen erkennbaren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. PCR-Produkte, die von *R. solanacearum*-DNA mit den Primern Rs-1-F und Rs-3-R amplifiziert werden, haben keine Restriktionsstellen.

5. Vorbereitung des Beladungspuffers**5.1. Bromphenolblau (10 %ige Stammlösung)**

Bromphenolblau	5 g
Destilliertes Wasser (bidest)	50 ml

5.2. Beladungspuffer

Glyzerin (86 %)	3,5 ml
Bromphenolblau (5,1)	300 µl
Destilliertes Wasser (bidest)	6,2 ml

6. 10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), pH 8,0

Tris-Puffer	48,40 g
Eisessig	11,42 ml
EDTA (Dinatriumsalz)	3,72 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Vor Gebrauch auf 1x verdünnen.

Auch im Handel erhältlich (z. B. Invitrogen oder gleichwertiges Produkt).

Anlage 7

Validierte Reagenzien für den FISH-Test**1. Oligo-Sonden**

R.-*solanacearum*-spezifische Sonde OLI-1-CY3: 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Eubakterielle Universalsonde EUB-338-FITC: 5'-gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. Fixierlösung

[ACHTUNG! FIXATIV ENTHÄLT TOXISCHES PARAFORMALDEHYD. HANDSCHUHE TRAGEN UND NICHT EIN-ATMEN. ES WIRD EMPFOHLEN, UNTER DEM ABZUG ZU ARBEITEN.]

- i) 9 ml molekular reines Wasser (z. B. Reinstwasser (UPW)) auf ca. 60 °C erhitzen und 0,4 g Paraformaldehyd hinzufügen. Paraformaldehyd mit 5 Tropfen 1N NaOH auflösen und mit einem Magnetrührer rühren.
- ii) pH-Wert durch Hinzufügen von 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB; pH 7,0) und 5 Tropfen 1N HCl auf pH-Wert 7,0 einstellen. pH-Wert mit Indikatorstreifen prüfen und erforderlichenfalls mit HCl oder NaOH justieren. [ACHTUNG! IN PARAFORMALDEHYD-LÖSUNGEN KEIN PH-MESSGERÄT VERWENDEN.]
- iii) Lösung durch 0,22-µm-Membranfilter filtern und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung staubfrei lagern.

3. 3x Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtersterilisiert und autoklaviert)	15 mM

Verdünnen auf 1x Hybmix vor Gebrauch.

4. Hybridisierungslösung

1x Hybmix	
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %
EUB-338-Sonde	5 ng/µl
OLI-1- oder OLI-2-Sonde	5 ng/µl

Zubereitung der Hybridisierungslösung in den nach der Tabelle berechneten Mengen. Für jeden Objektträger (mit 2 duplizierten unterschiedlichen Proben) sind 90 µl Hybridisierungslösung erforderlich. **WICHTIG: FORMAMID IST SEHR TOXISCH! DAHER STETS HANDSCHUHE TRAGEN UND DIE NOTWENDIGEN VORSICHTSMASSNAHMEN TREFFEN!**

Tabelle. Empfohlene Mengen für die Zubereitung der Hybridisierungsmischung

Anzahl der Objektträger	1	4	6	8	10
Steriles Reinstwasser (UPW)	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3x Hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
EUB-338-Sonde(100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
OLI-1- oder OLI-2-Sonde (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Gesamtvolumen (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Hinweis: Alle Lösungen mit den lichtempfindlichen Oligo-Sonden bei -20 °C im Dunkeln lagern. Während des Gebrauchs vor direktem Sonnenlicht und künstlichem Licht schützen.

5. 0,1-M-Phosphatpuffer, pH 7,0

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen auflösen, den pH-Wert prüfen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Anlage 8

Auberginen- und Tomatenkultivierung

Tomatensamen (*Lycopersicon esculentum*) und Auberginensamen (*Solanum melongena*) in pasteurisierte Anzuchterde säen. Sämlinge mit voll entfaltenen Keimblättern (nach 10 bis 14 Tagen) in pasteurisierte Topferde umsetzen.

Auberginen und Tomaten sollten in einem Gewächshaus gezogen werden, das die folgenden Umweltbedingungen erfüllt:

Tageslänge:	14 Stunden oder natürliche Tageslänge, wenn länger;
Temperatur:	tagsüber: 21 bis 24 °C, nachts: 14 bis 18 °C.
Anfällige Tomatensorte:	„Moneymaker“
Anfällige Auberginensorte:	„Black Beauty“
Lieferant:	siehe Website http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

BIBLIOGRAFIE

1. Amann, R.I., L. Krumholz and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
2. Anon. 1998. Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L235, 1-39.
3. Boudazin, G., A.C. Le Roux, K. Josi, P. Labarre and B. Jouan. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *European Journal of Plant Pathology* 105; 373-380.
4. Caruso, P., Gorris, M.T., Cambra, M., Palomo, J.L., Collar, J and Lopez, M.M. 2002. Enrichment Double-Antibody Sandwich Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Uses a Specific Monoclonal Antibody for sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Asymptomatic Potato Tubers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3634-3638.
5. Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1:113-121.
6. Elphinstone, J.G., Hennessy, J., Wilson, J.K. and Stead, D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26; 663-678.
7. Englebrecht, M.C. (1994) Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. In: A.C. Hayward (ed.) *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
8. Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27; 265-277.
9. Hayward, A.C., El-Nashaar, H.M., Nydegger, U. and De Lindo, L. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69; 269-280.
10. Ito, S., Y. Ushijima, T. Fujii, S. Tanaka, M. Kameya-Iwaki, S. Yoshiwara and F. Kishi. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *J. Phytopathology* 146; 379-384.
11. Janse, J.D. (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18, 343-351.
12. Janse, J.D. 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
13. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44; 693-695.
14. Klement Z.; Rudolph, K and D.C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
15. Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell scientific Publications Ltd., Oxford. 216 pp.
16. Lopez, M.M., Gorris, M.T., Llop, P., Cubero, J., Vicedo, B., Cambra, M., 1997. Selective enrichment improves selective isolation, serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: H.W. Dehne *et al.*, (eds). *Klewer Academic Publishers*. pp. 117-121.
17. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
18. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85; 528-536.
19. Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J.-F. Wang, T.-H. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A.C. Hayward, V. Krishnapillai, W.F. Hong, B.W. Holloway, J.N. Timmis. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *As Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5; 19-33.
20. Pstrik, K.H. and Maiss, E. 2000. Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathology* 148; 619-626.
21. Pstrik, K.H., Elphinstone, J.G. and Pukall, R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology* 108, 831-842.
22. Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D. (1995) Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.

23. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota: 373 pp.
 24. Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.
 25. Smith, J.J., Offord, L.C., Holderness, M. and Saddler, G.S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Applied and Environmental Microbiology 61; 4262-4268.
 26. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.
 27. Taghavi, M., Hayward, A.C., Sly, L.I., Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 46; 10-15.
 28. Van Der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C., Saddler, G.S., Trigallet, A., Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* Race 3 in Western Europe as determined by AFLP, RC-PFGE and rep-PCR. In: Prior, P., Allen, C. and Elphinstone, J. (eds.) Bacterial wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. Springer (Berlin) pp. 44-49.
 29. Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N., Stead, D.E. and Boonham, N. 1999. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 5' nuclease TaqMan assay. Applied and Environmental Microbiology 66; 2853-2858.
 30. Wullings, B.A., A.R. van Beuningen, J.D. Janse and A.D.L. Akkermans. 1998. Detection of *R. solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4546-4554.
-

ANHANG III

1. In jedem Verdachtsfall, in dem der/die nach dem Verfahren des Anhangs II durchgeführte(n) Screeningtest(s) für das aufgeführte Pflanzenmaterial und für alle anderen Fälle positiv ausgefallen ist/sind und der bisher nicht nach den genannten Verfahren bestätigt bzw. entkräftet wurde, sollte folgendes Material aufbewahrt und in geeigneter Form konserviert werden:

- alle Knollen der Stichprobe und, falls möglich, alle Pflanzen der Stichprobe,
 - verbleibende Extrakte und weiteres für den (die) Screeningtest(s) vorbereitetes Material, z. B. Objektträger für Immunfluoreszenztest,
- und
- alle sachdienlichen Unterlagen, bis die genannten Verfahren vollständig abgeschlossen sind.

Mit Hilfe der zurückbehaltenen Knollen können gegebenenfalls Sortenprüfungen vorgenommen werden.

2. Bei Bestätigung des Schadorganismus sollte nach Ablauf des Meldeverfahrens gemäß Artikel 5 Absatz 2 folgendes Material für mindestens einen Monat aufbewahrt und in geeigneter Form konserviert werden:

- das in Absatz 1 genannte Material,
 - gegebenenfalls eine mit Knollen- oder Pflanzenextrakt beimpfte Probe infizierten Tomaten- oder Auberginenmaterials,
- und
- die isolierte Schadorganismuskultur.
-

ANHANG IV

Die in Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer i genannte Untersuchung bezieht sich gegebenenfalls auf folgende Parameter:

- i) Produktionsorte,
- an denen Kartoffeln angebaut werden oder wurden, die klonal mit Kartoffeln verbunden sind, die sich als mit dem Schadorganismus befallen erwiesen haben,
 - an denen Tomaten angebaut werden oder wurden, die aus derselben Saatgutpartie erwachsen sind wie die Tomaten, die sich als mit dem Schadorganismus befallen erwiesen haben,
 - an denen Kartoffeln oder Tomaten angebaut werden oder wurden, die wegen Verdachts des Auftretens des Schadorganismus der amtlichen Kontrolle unterstellt wurden,
 - an denen Kartoffeln angebaut werden oder wurden, die klonal mit Kartoffeln verbunden sind, die an mit dem Schadorganismus befallenen Produktionsorten angebaut wurden,
 - an denen Kartoffeln oder Tomaten angebaut werden und die in der Nachbarschaft zu befallenen Produktionsorten liegen, einschließlich solcher, an denen Anbaugeräte und -einrichtungen direkt oder über einen gemeinsamen Vertragspartner gemeinsam genutzt werden,
 - an denen Oberflächengewässer zur Bewässerung oder Beregnung aus Quellen genutzt werden, die sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen haben oder die der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig sind,
 - an denen Oberflächengewässer zur Bewässerung oder Beregnung aus einer Quelle genutzt werden, die gemeinsam mit Produktionsorten benutzt wird, die sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen haben oder die der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig sind,
 - die von Oberflächengewässern überflutet sind oder waren, die sich als mit dem Schadorganismus kontaminiert erwiesen haben oder die der Kontamination mit dem Schadorganismus verdächtig sind,
- und
- ii) Oberflächengewässer, die zur Bewässerung oder Beregnung von Feldern oder Produktionsorten, die sich als mit dem Schadorganismus als kontaminiert erwiesen haben, genutzt werden oder diese überflutet haben.
-

ANHANG V

1. Faktoren, die bei der Bestimmung des Ausmaßes des wahrscheinlichen Befalls gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iii und Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c Ziffer iii zu berücksichtigen sind:
 - das aufgeführte Pflanzenmaterial, das an einem Produktionsort angebaut wurde, der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde,
 - Produktionsorte mit produktionstechnischer Verbindung zu dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, einschließlich solcher, an denen Anbaugeräte und -einrichtungen direkt oder über einen gemeinsamen Vertragspartner gemeinsam genutzt werden,
 - das aufgeführte Pflanzenmaterial, das an den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Produktionsorten angebaut wurde oder an solchen Produktionsorten in dem Zeitraum anwesend war, in dem das aufgeführte Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, an dem im ersten Gedankenstrich genannten Produktionsort anwesend war,
 - Räumlichkeiten, in denen das aufgeführte Pflanzenmaterial von den in den vorstehenden Gedankenstrichen genannten Produktionsorten behandelt wird,
 - Maschinen, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon sowie sonstige Gegenstände, einschließlich Verpackungsmaterial, die mit dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, in Berührung gekommen sein könnten,
 - jegliches aufgeführte Pflanzenmaterial, das in den im vorstehenden Gedankenstrich bezeichneten Einrichtungen oder Berührungsgegenständen vor deren Reinigung oder Desinfizierung gelagert wurde oder damit in Berührung gekommen ist,
 - als Ergebnis der Untersuchungen und Tests gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer i im Falle von Kartoffeln diejenigen Knollen oder Pflanzen mit geschwisterlicher oder elterlicher klonaler Beziehung zu dem aufgeführten Pflanzenmaterial, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, bzw. im Falle von Tomaten diejenigen Pflanzen, die aus dem gleichen Saatgut wie das Pflanzenmaterial erwachsen sind, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, und bei denen, auch wenn sie vielleicht mit negativem Ergebnis auf den Erreger hin untersucht worden sind, ein Befall aufgrund einer klonalen Verbindung wahrscheinlich erscheint; zur Überprüfung der Identität der kontaminierten und klonal verbundenen Knollen bzw. Pflanzen können Sortenprüfungen durchgeführt werden,
 - Produktionsorte des aufgeführten Pflanzenmaterials, auf die im vorhergehenden Gedankenstrich Bezug genommen wird,
 - Produktionsorte des aufgeführten Pflanzenmaterials, die mit Wasser bewässert oder beregnet werden, das gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c Ziffer ii als kontaminiert erklärt wurde,
 - aufgeführtes Pflanzenmaterial, das auf Feldern erzeugt wurde, welche von als kontaminiert bestätigten Oberflächengewässern überflutet wurden.
2. Faktoren, die bei der Bestimmung der möglichen Verbreitung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iv und Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c Ziffer iii zu berücksichtigen sind:
 - i) in den Fällen gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iv:
 - die Nähe anderer Produktionsorte, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial angebaut wird,
 - gemeinsame Erzeugung und Verwendung von Pflanzkartoffelbeständen,
 - Produktionsorte, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial mit Oberflächenwasser bewässert oder beregnet wird und an denen die Gefahr der Abschwemmung oder Überflutung von Produktionsorten besteht, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurden,

- ii) in den Fällen, in denen Oberflächengewässer gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c Ziffer ii als kontaminiert erklärt wurden:
- Produktionsorte, an denen das aufgeführte Pflanzenmaterial unmittelbar neben dem als kontaminiert erklärten Oberflächengewässer angebaut wird oder die von diesem Oberflächengewässer überflutet werden können,
 - jedes einzelne Bewässerungsbecken, das mit dem als kontaminiert erklärten Oberflächengewässer in Verbindung steht,
 - Gewässer, die an das für kontaminiert erklärte Oberflächengewässer angeschlossen sind, wobei Folgendes berücksichtigt wird:
 - Richtung und Fließgeschwindigkeit des für kontaminiert erklärten Gewässers,
 - Vorhandensein von Unkrautwirtspflanzen aus der Familie der Nachtschattengewächse.
3. Die Einzelheiten der Mitteilung gemäß Artikel 5 Absatz 2 Unterabsatz 1 umfassen:
- unmittelbar nach Bestätigung des Auftretens des Schadorganismus durch Laboruntersuchungen nach den Methoden gemäß Anhang II zumindest folgende Angaben:
 - für Kartoffeln:
 - a) Sortenbezeichnung der Kartoffelpartie,
 - b) Kartoffeltyp (Speise-, Wirtschaftskartoffel, Pflanzkartoffel usw.) und ggf. die Pflanzgutkategorie,
 - für Tomatenpflanzen: Sortenbezeichnung der Partie und ggf. der Kategorie.
 - Unbeschadet der Verpflichtung zur Mitteilung von Verdachtsfällen gemäß Artikel 4 Absatz 3 teilt der Mitgliedstaat, in dem der Verdacht bestätigt wurde, sofern die Gefahr der Kontamination von aufgeführtem Pflanzenmaterial aus anderen oder in andere Mitgliedstaaten besteht, den betreffenden Mitgliedstaaten unverzüglich die Angaben mit, die sie zur Erfüllung der Anforderungen von Artikel 5 Absatz 3 benötigen, insbesondere:
 - a) Sortenbezeichnung der Kartoffel- bzw. Tomatenpartie,
 - b) Name und Anschrift von Versender und Empfänger,
 - c) Lieferdatum der Kartoffel- bzw. Tomatenpartie,
 - d) Größe der gelieferten Kartoffel- bzw. Tomatenpartie,
 - e) eine Kopie des Pflanzenpasses oder zumindest die Pflanzenpassnummer oder ggf. die Zulassungsnummer des Kartoffelerzeugers oder Händlers sowie eine Kopie des Lieferscheins.

Die Kommission wird unverzüglich unterrichtet, sobald diese Angaben vorliegen.

4. Die Einzelheiten der zusätzlichen Mitteilung nach Artikel 5 Absatz 2 Unterabsatz 2 umfassen nach Abschluss aller Untersuchungen für jeden einzelnen Fall folgende Angaben:
- a) Datum der Befallsbestätigung,
 - b) kurze Beschreibung der zur Identifizierung des Befallsursprungs und einer etwaigen Verbreitung des Befalls durchgeführten Untersuchungen,
 - c) Informationen über die identifizierte(n) oder vermutete(n) Ursache(n) des Befalls,
 - d) Einzelheiten über das Ausmaß des erklärten Befalls, einschließlich der Zahl der betroffenen Produktionsorte und für Kartoffeln der Anzahl der Partien mit Angabe der Sorte und, falls es sich um Pflanzkartoffeln handelt, der Kategorie,

- e) Einzelheiten über die Abgrenzung der Sicherheitszone, einschließlich der Zahl derjenigen Produktionsorte, die zwar nicht als befallen erklärt, jedoch in die Zone einbezogen wurden,
 - f) Einzelheiten über die Kontaminationserklärung von Gewässern, einschließlich Name und geografische Lage des Gewässers sowie des Geltungsbereichs der Kontaminationserklärung/des Bewässerungsverbots,
 - g) für jede als kontaminiert erklärte Tomatenpflanzensendung oder -partie die Zeugnisse gemäß Artikel 13 Absatz 1 Ziffer ii der Richtlinie 2000/29/EG und die Pflanzenpassnummer gemäß der Auflistung des Anhangs V Teil A Abschnitt I Nummer 2.2 der Richtlinie 2000/29/EG,
 - h) sonstige Informationen zu den bestätigten Ausbrüchen, die die Kommission ggf. anfordert.
-

ANHANG VI

1. Als Maßnahmen im Sinne von Artikel 6 Absatz 1 gelten:
 - die Verwendung als Tierfutter nach einer Hitzebehandlung, die die Gefahr des Überlebens des Schadorganismus ausschließt,
 - oder
 - die Entsorgung in einer amtlich zugelassenen, speziell für diesen Zweck vorgesehenen Abfallentsorgungsanlage, bei der keine erkennbare Gefahr besteht, dass der Schadorganismus in die Umwelt entweicht, z. B. durch Versickerung in Agrarflächen oder Kontakt zu Oberflächengewässern, die zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen genutzt werden könnten,
 - oder
 - das Verbrennen,
 - oder
 - die industrielle Verarbeitung durch direkte, unverzügliche Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit amtlich zugelassenen Abfallentsorgungsanlagen, wobei keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus festgestellt wurde, und mit einem System, das die Reinigung und Desinfizierung zumindest der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge ermöglicht,
 - oder
 - andere Maßnahmen, sofern keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus festgestellt wurde; diese Maßnahmen und ihre Begründung sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen.

Jeder verbleibende Abfall, der sich aus vorstehenden Maßnahmen ergibt oder damit im Zusammenhang steht, wird anhand amtlich zugelassener Verfahren gemäß Anhang VII dieser Richtlinie entsorgt.

2. Die sachgerechte Verwendung bzw. Entsorgung des in Artikel 6 Absatz 2 aufgeführten Pflanzenmaterials erfolgt, wie nachstehend beschrieben, unter Kontrolle der zuständigen amtlichen Stellen der betreffenden Mitgliedstaaten, wobei sich diese Stellen gegenseitig unterrichten, um sicherzustellen, dass die Kontrolle konsequent durchgeführt wird und die im ersten und im zweiten Gedankenstrich genannten Abfallentsorgungsanlagen von den zuständigen amtlichen Stellen des Mitgliedstaats, in dem die Kartoffeln verpackt oder verarbeitet werden sollen, zugelassen sind:
 - i) im Falle von Kartoffelknollen:
 - Verwendung als Speisekartoffeln, die zur unmittelbaren Lieferung und Verwendung so verpackt sind, dass ein Umpacken nicht erforderlich ist, an einem Ort mit geeigneten Abfallentsorgungsanlagen. Kartoffeln, die zum Anpflanzen bestimmt sind, dürfen nur dann am selben Ort gehandhabt werden, wenn sie separat bzw. nach entsprechender Reinigung und Desinfektion der Anlagen behandelt werden,
 - oder
 - Verwendung als Wirtschaftskartoffeln, die zur unmittelbaren und sofortigen Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit geeigneten Abfallentsorgungsanlagen und mit einem System, das die Reinigung und Desinfektion zumindest der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge ermöglicht, bestimmt sind,
 - oder
 - andere Verwendung oder Entsorgung, sofern keine erkennbare Gefahr der Verbreitung des Schadorganismus festgestellt wurde sowie vorbehaltlich der Genehmigung durch die vorgenannten zuständigen amtlichen Stellen;
 - ii) im Falle von anderen Pflanzenteilen einschließlich Stängel und Blattabfall:
 - unschädliche Beseitigung,
 - oder
 - andere Verwendung oder Entsorgung, sofern keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus festgestellt wurde sowie vorbehaltlich der Genehmigung durch die genannten zuständigen Stellen.

3. Die geeigneten Verfahren zur Entseuchung der in Artikel 6 Absatz 3 genannten Berührungsgegenstände umfassen die Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion, damit sichergestellt ist, dass keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind unter Aufsicht der zuständigen amtlichen Behörden der Mitgliedstaaten durchzuführen.
4. In der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iv und Buchstabe c Ziffer iii abgegrenzten und in Artikel 6 Absatz 4 genannten Sicherheitszone treffen die Mitgliedstaaten die folgenden Maßnahmen:
 - 4.1. In Fällen, in denen Produktionsorte gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurden:
 - a) auf einer Anbaufläche oder in einer Einheit für geschützte Pflanzenzucht, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärt wurde, entweder
 - i) mindestens in den vier auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahren:
 - Maßnahmen zur Bekämpfung des Kartoffel- und Tomatendurchwuchses sowie anderer Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse,
 - und
 - Verzicht auf den Anbau von
 - Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder Direktsaat,
 - Tomatenpflanzen und -samen,
 - unter Berücksichtigung der biologischen Eigenart des Schadorganismus:
 - anderen Wirtspflanzen,
 - Brassica-Arten, bei denen nachweislich die Gefahr des Überlebens des Schadorganismus besteht,
 - Kulturen, bei denen nachweislich die Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus besteht;
 - in der ersten auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgenden Kartoffel- oder Tomatenanbausaison und unter der Bedingung, dass die Anbaufläche bei den amtlichen Kontrollen, die zumindest in den zwei vor der Pflanzung liegenden Anbaujahren durchgeführt wurden, als frei von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie von anderen Wirtspflanzen, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, befunden wurde:
 - im Falle von Kartoffeln: Genehmigung nur für die Erzeugung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln,
 - im Falle von Kartoffeln und Tomaten: Testen geernteter Kartoffelknollen bzw. Tomatenpflanzen nach dem Verfahren von Anhang II;
 - in der auf die im vorstehenden Gedankenstrich genannte Anbausaison folgenden Kartoffel- oder Tomatenanbausaison unter Einhaltung einer geeigneten Fruchtfolge, die mindestens zwei Jahre umfasst, wenn Pflanzkartoffeln erzeugt werden sollen, Durchführung einer amtlichen Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1,
 - oder
 - ii) in den fünf auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahren:
 - Maßnahmen zur Bekämpfung des Kartoffel- und Tomatendurchwuchses sowie anderer natürlich vorkommender Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse,
 - und
 - in den ersten drei Jahren dieses Zeitraums entweder Schwarzbrache oder Anbau von Getreide entsprechend dem festgestellten Risiko oder Dauerweide mit häufigem Kurzschnitt oder Intensivbeweidung oder Gräsersamengewinnung sowie in den darauf folgenden beiden Jahren Anbau von Nichtwirtspflanzen, die keine erkennbare Gefahr des Überlebens oder der Verschleppung des Schadorganismus darstellen;

- in der ersten auf den im vorstehenden Gedankenstrich genannten Zeitraum folgenden Kartoffel- oder Tomatenanbausaison und unter der Bedingung, dass die Anbaufläche im Rahmen der amtlichen Kontrollen, die zumindest in den zwei vor der Pflanzung liegenden Anbaujahren durchgeführt wurden, als frei von Kartoffel- und Tomatendurchwuchs sowie von anderen Wirtspflanzen, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, befunden wurde:
 - im Falle von Kartoffeln: Genehmigung für die Erzeugung von Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln,
 - Testen geernteter Kartoffelknollen bzw. Tomatenpflanzen nach dem Verfahren von Anhang II;
- b) auf allen anderen Anbauflächen des befallenen Produktionsortes unter der Bedingung, dass die zuständigen amtlichen Stellen sich vergewissert haben, dass kein Risiko von Kartoffel- oder Tomatenpflanzendurchwuchs und anderen natürlichen Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Unkräutern aus der Familie der Nachtschattengewächse, besteht, werden
 - in dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr
 - entweder keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder Direktsaat oder andere Wirtspflanzen des Schadorganismus angepflanzt bzw. gesät,
 - oder
 - im Falle von Kartoffelknollen nur zertifizierte Pflanzkartoffeln zur ausschließlichen Erzeugung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln angepflanzt,
 - im Falle von Tomatenpflanzen nur Tomatenpflanzen aus Samen, die den Anforderungen der Richtlinie 2000/29/EG entsprechen, zur ausschließlichen Erzeugung von Tomatenfrüchten angepflanzt,
 - im zweiten Anbaujahr nach dem Jahr der Befallserklärung
 - im Falle von Kartoffeln nur zertifizierte Pflanzkartoffeln oder Pflanzkartoffeln, die amtlich auf Freisein von Schleimkrankheit getestet und unter amtlicher Kontrolle an anderen als den unter Nummer 4.1 genannten Produktionsorten angebaut wurden, zur Erzeugung von Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln angebaut,
 - im Falle von Tomaten nur Tomatenpflanzen aus Samen, die den Anforderungen der Richtlinie 2000/29/EG entsprechen, oder bei vegetativer Vermehrung aus Tomatenpflanzen aus solchem Saatgut, die unter amtlicher Kontrolle an anderen als den unter Nummer 4.1 genannten Produktionsorten angebaut wurden, zur Erzeugung von Tomatenpflanzen oder -früchten angebaut;
 - zumindest im dritten auf die Befallserklärung folgenden Anbaujahr:
 - im Falle von Kartoffeln nur zertifizierte Pflanzkartoffeln oder Pflanzkartoffeln, die unter amtlicher Kontrolle aus zertifizierten Pflanzkartoffeln erzeugt wurden, zur Erzeugung von entweder Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln angebaut,
 - im Falle von Tomaten nur Tomatenpflanzen aus Samen, die den Anforderungen der Richtlinie 2000/29/EG entsprechen, oder Tomatenpflanzen, die unter amtlicher Kontrolle aus solchen Pflanzen erzeugt wurden, zur Erzeugung von Tomatenpflanzen oder -früchten angebaut;
 - in jedem der unter den vorstehenden Gedankenstrichen genannten Anbaujahren Maßnahmen getroffen, um Durchwuchs von Kartoffeln und andere natürlich vorkommende Wirtspflanzen des Schadorganismus auszurotten, falls sie vorhanden sind, und auf jeder Kartoffelanbaufläche geerntete Kartoffeln nach dem Verfahren von Anhang II amtlich getestet;
- c) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii und nach dem ersten darauf folgenden Anbaujahr werden
 - alle Geräte und Lagerräume am Produktionsort, die zur Kartoffel- bzw. Tomatenerzeugung genutzt werden, gereinigt und gegebenenfalls nach geeigneten Verfahren gemäß Nummer 3 desinfiziert,
 - gegebenenfalls amtliche Kontrollen von Bewässerungs- und Beregnungsprogrammen, einschließlich entsprechender Verbotsregelungen, durchgeführt, um eine Verschleppung des Schadorganismus zu verhindern;

- d) in einer gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer ii als befallen erklärten Einheit mit geschützter Pflanzenerzeugung, bei der ein vollständiger Austausch des Kultursubstrats möglich ist,
- wird verzichtet auf den Anbau von Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder Direktsaat oder anderen Wirtspflanzen des Schadorganismus, einschließlich Tomatenpflanzen und Samen, bis die Produktionseinheit amtlich überwachten Maßnahmen zur Vernichtung des Schadorganismus und zur Beseitigung sämtlicher Wirtspflanzen, einschließlich zumindest eines vollständigen Austauschs des Kultursubstrats nebst Reinigung und gegebenenfalls Desinfektion der genannten Einheit sowie aller Ausrüstungen, unterzogen und im Anschluss daran von den zuständigen amtlichen Stellen für den Kartoffel- bzw. Tomatenanbau zugelassen wurde;
- hierbei
- werden im Falle der Kartoffelerzeugung zertifizierte Pflanzkartoffeln, Miniknollen oder Mikropflanzen verwendet, die von untersuchtem Ausgangsmaterial abstammen,
 - werden im Falle der Tomatenerzeugung Samen, die den Anforderungen der Richtlinie 2000/29/EG entsprechen, oder, bei vegetativer Vermehrung, Tomatenpflanzen aus solchen Samen verwendet, die unter amtlicher Kontrolle angebaut wurden,
 - erfolgt eine amtliche Kontrolle der Bewässerungs- und Beregnungsprogramme, einschließlich ggf. der Verhängung eines Bewässerungs- und Beregnungsverbots, zur Verhinderung der Ausbreitung des Schadorganismus.

4.2. Unbeschadet der unter Nummer 4.1 aufgeführten Maßnahmen sorgen die Mitgliedstaaten in der abgegrenzten Sicherheitszone dafür, dass

- a) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung in den Betrieben die Maschinen und Lagerräume, die für die Erzeugung von Kartoffeln bzw. Tomaten verwendet wurden, ggf. gemäß den in Absatz 3 genannten Verfahren gereinigt und desinfiziert werden;
- b) sofort und mindestens für die Dauer der auf die Befallserklärung folgenden drei Anbaujahre,
- ba) sofern eine Sicherheitszone gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iv abgegrenzt wurde,
- die Betriebe, die Kartoffelknollen oder Tomaten anbauen, lagern oder umschlagen sowie die Betriebe, die Maschinen für die Kartoffel- und Tomatenerzeugung vertraglich zur Verfügung stellen, von ihren zuständigen amtlichen Stellen überwacht werden;
 - vorgeschrieben ist, dass in dieser Sicherheitszone für alle Kartoffelkulturen ausschließlich zertifiziertes Pflanzgut oder unter amtlicher Überwachung erwachsenes Pflanzgut angepflanzt wird und die Pflanzkartoffeln, die an gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a Ziffer iii als wahrscheinlich befallen eingestuft Produktionsorten angebaut wurden, nach der Ernte getestet werden;
 - vorgeschrieben ist, dass in allen Betrieben der Sicherheitszone der Umgang mit geernteten Pflanzkartoffeln und Speise- sowie Wirtschaftskartoffeln getrennt gehalten wird oder dass zwischen den Arbeitsgängen für Pflanz- sowie Speise- und Wirtschaftskartoffeln Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchgeführt werden;
 - vorgeschrieben ist, dass für alle Tomatenkulturen in der Sicherheitszone ausschließlich Tomatenpflanzen aus Samen, die den Anforderungen der Richtlinie 2000/29/EG entsprechen oder bei vegetativer Vermehrung aus Tomatenpflanzen aus solchem Saatgut, das unter amtlicher Kontrolle angebaut wurde, angepflanzt werden;
 - eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt wird;
- bb) sofern Oberflächenwasser gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c Ziffer ii als kontaminiert erklärt oder als Ausbreitungsmöglichkeit für den Schadorganismus gemäß Anhang V Nummer 2 gilt,
- zu geeigneten Zeitpunkten eine jährliche Untersuchung durchgeführt wird, einschließlich Beprobung des Oberflächengewässers und gegebenenfalls von Wirtspflanzen aus der Familie der Nachtschattengewächse in den betreffenden Wasserquellen sowie eine Untersuchung nach den maßgeblichen Verfahren des Anhangs II für das aufgeführte Pflanzenmaterial und für andere Fälle;

- amtliche Kontrollen der Bewässerungs- und Beregnungsprogramme eingeführt werden, einschließlich der Verhängung eines Verbots der Bewässerung und Beregnung des aufgeführten Pflanzenmaterials und gegebenenfalls anderer Wirtspflanzen mit als kontaminiert erklärtem Wasser zwecks Verhinderung der Ausbreitung des Schadorganismus. Dieses Verbot kann auf der Grundlage der Ergebnisse der genannten jährlichen Untersuchung überprüft, und Kontaminationserklärungen können widerrufen werden, wenn sich die zuständigen amtlichen Stellen vergewissert haben, dass das Oberflächenwasser nicht mehr kontaminiert ist. Die Verwendung von Wasser, für das eine Verbotsregelung gilt, kann vorbehaltlich der amtlichen Kontrolle zu Zwecken der Bewässerung und Beregnung von Wirtspflanzen gestattet werden, soweit amtlich zugelassene Verfahren angewandt werden, die die Eliminierung des Schadorganismus gewährleisten und seine Verschleppung verhüten,
 - bei Kontamination von Abwässern amtliche Kontrollen der Entsorgung des Abfalls und der Abwässer industrieller Verarbeitungs- oder Verpackungsbetriebe, die mit dem aufgeführten Pflanzenmaterial umgehen, eingeführt werden;
- c) gegebenenfalls ein Programm aufstellen, um alle Pflanzkartoffelbestände in angemessener Zeit auszutauschen.
-

ANHANG VII

Die amtlich zugelassenen Abfallentsorgungsverfahren gemäß Anhang VI Nummer 1 müssen nachstehende Bedingungen erfüllen, um jede erkennbare Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus auszuschalten:

- i) Kartoffel- und Tomatenabfälle (einschließlich verworfener Kartoffeln und Tomaten und Kartoffelschalen) sowie andere feste Abfälle im Zusammenhang mit den Kartoffeln und Tomaten (einschließlich Erde, Steinen und anderem Material) sind wie folgt zu entsorgen:
- entweder durch Entsorgung in einer amtlich zugelassenen, speziell für diesen Zweck vorgesehenen Abfallentsorgungsanlage, bei der keine erkennbare Gefahr besteht, dass der Schadorganismus zum Beispiel durch Versickerung in Agrarflächen oder Kontakt zu Oberflächengewässern, die zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen genutzt werden könnten, in die Umwelt entweicht. Der Abfall muss direkt zur Anlage verbracht werden und dabei so verpackt sein, dass keine Gefahr des Abfallverlustes besteht,
 - oder
 - durch Verbrennen,
 - oder
 - durch andere Maßnahmen, sofern nachweislich keine erkennbare Gefahr der Ausbreitung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen.
- ii) Abwässer: vor der Entsorgung sind Abwässer, die Schwimmstoffe enthalten, Filtern oder Absetzbecken zuzuleiten, um sie von diesen Schwimmstoffen zu reinigen. Die dabei anfallenden Feststoffe sind gemäß Ziffer i zu entsorgen.

Anschließend sind die Abwässer wie folgt zu behandeln:

- vor der Entsorgung mindestens dreißigminütige Erhitzung auf eine Kerntemperatur von mindestens 60 °C,
- oder
- anderweitige amtlich zugelassene und überwachte Entsorgung, sodass keine erkennbare Gefahr besteht, dass die Abwässer mit landwirtschaftlichen Nutzflächen oder Wasserquellen, die zur Bewässerung landwirtschaftlicher Nutzflächen genutzt werden könnten, in Berührung kommen könnten. Die diesbezüglichen Einzelheiten sind den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.

Die in diesem Anhang beschriebenen Möglichkeiten gelten auch für Abfälle im Zusammenhang mit der Bearbeitung, Beseitigung und Verarbeitung kontaminierter Partien.“
