

## I

(Säädökset, jotka on julkaistava)

**KOMISSION DIREKTIIVI 2006/56/EY,****annettu 12 päivänä kesäkuuta 2006,****perunan vaalean rengasmädän torjunnasta annetun neuvoston direktiivin 93/85/ETY liitteiden muuttamisesta**

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon perunan vaalean rengasmädän torjunnasta 4 päivänä lokakuuta 1993 annetun neuvoston direktiivin 93/85/ETY<sup>(1)</sup> ja erityisesti sen 12 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Yksi perunan kannalta tärkeistä haitallisista organismeista on *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, perunan vaalean rengasmädän aiheuttaja, jäljempänä "kasvintuhooja".
- (2) Tätä kasvintuhoojaa esiintyy edelleen joillakin alueilla yhteisössä.
- (3) Neuvoston direktiivissä 93/85/ETY vahvistetaan yksityiskohtaiset toimenpiteet, joita jäsenvaltioissa on toteutettava tämän kasvintuhoojan paikallistamiseksi ja sen levinneisyyden määrittämiseksi, sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi, ja jos tuhoojaa löydetään, sen leviämisen estämiseksi ja torjumiseksi tarkoituksena hävittää se.
- (4) Tämän kasvintuhoojan biologian ja toteamis- ja tunnistamismenettelyjen tuntemus on huomattavasti lisääntynyt direktiivin antamisen jälkeen. Lisäksi kasvintuhoojan torjunnasta saatu käytännön kokemus vaatii useiden torjuntatoimenpiteisiin liittyvien teknisten säännösten tarkistamista.
- (5) Tällaisen kehityksen seurauksena näyttäisi olevan välttämätöntä tarkistaa ja päivittää direktiivin 93/85/ETY liitteisiin sisältyvät toimenpiteet.

- (6) Toteamis- ja tunnistamismenettelyjen osalta direktiiviin lisätään vastikään kehitetyt menettelyt, kuten FISH-menetelmä (*in situ* -hybridisaatiomenetelmä, jossa tulokset saatetaan näkyviksi fluoresenssilla) ja PCR-menetelmä (polymeraasiketjureaktio), samoin kuin nykyisten toteamis- ja tunnistamismenettelyjen lukuisiin eri teknisiin elementteihin tehdyt parannukset.
- (7) Torjuntatoimenpiteiden teknisiä elementtejä on parannettu seuraavilta osin: testinäytteiden säilyttämistapa kasvintuhoojan jäljittämisen varmistamiseksi, todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämiseksi tarvittavat elementit, kasvintuhoojan varmistetun esiintymisen ja saastuneen alueen ilmoittamista koskevat tiedot sekä saastuneiksi ilmoitetuilla tuotantopaikoilla ja rajoitetuilla alueilla toteutettavat toimenpiteet.
- (8) Tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän kasvinsuojelukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

**1 artikla**

Korvataan direktiivin 93/85/ETY liitteet tämän direktiivin liitteessä olevilla vastaavilla teksteillä.

**2 artikla**

1. Jäsenvaltioiden on annettava ja julkaistava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset viimeistään 31 päivänä maaliskuuta 2007. Niiden on toimitettava komissiolle kirjallisina nämä säännökset sekä kyseisiä säännöksiä ja tätä direktiiviä koskeva vastaavuustaulukko viipymättä.

Jäsenvaltioiden on sovellettava näitä säädöksiä 1 päivästä huhtikuuta 2007.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

(<sup>1</sup>) EYVL L 259, 18.10.1993, s. 2.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitettuja kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset kirjallisina komissiolle viipymättä.

*3 artikla*

Tämä direktiivi tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

*4 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 12 päivänä kesäkuuta 2006.

*Komission puolesta*  
Markos KYPRIANOU  
*Komission jäsen*

## LIITE I

**TUTKIMUSMENETELMÄ PERUNAN VAALEAA RENGASMÄTÄÄ AIHEUTTAVAN *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.* -BAKTEERIN DIAGNOSOIMISEKSI, TOTEAMISEKSI JA TUNNISTAMISEKSI****TUTKIMUSMENETELMÄN SOVELTAMISALA**

Esitetty menetelmä kuvaa eri menettelyjä, jotka koskevat

- i) vaalean rengasmädän diagnosoimista perunan mukuloista ja kasveista;
- ii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* -kasvintuhoojan toteamista perunan mukuloista ja kasveista otetuista näytteistä;
- iii) *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*) -kasvintuhoojan tunnistamista.

## YLEISET PERIAATTEET

Lisäyksissä esitetään optimaaliset testausprotokollat eri menetelmien ja validoitujen reagenssien osalta sekä testi- ja kontrollimateriaalien valmistusta koskevat tiedot. Lisäyksessä 1 annetaan niiden laboratorioden luettelo, jotka olivat mukana testausprotokollien optimoinnissa ja validoinnissa.

Koska testausprotokollat liittyvät karanteenin alaisten organismien toteamiseen ja niissä käytetään *C. m.* subsp. *sepedonicus* -kasvintuhoojan elinkykyisiä viljelmiä kontrollimateriaaleina, menettelyt on ehdottomasti toteutettava sopivissa karanteenioloissa siten, että käytössä on riittävät jätteidenhävitystilat ja -laitteet ja toiminta tapahtuu kasvikaranteenista vastaavien viranomaisten myöntämän asianmukaisen luvan mukaisissa olosuhteissa.

Testausparametreilla on varmistettava *C. m.* subsp. *sepedonicus* -kasvintuhoojan määrien johdonmukainen ja toistettavissa oleva toteaminen valittuja menetelmiä varten asetetuilla kynnsarvoilla.

Positiivisten kontrollinäytteiden huolellinen valmistaminen on ehdottoman tärkeää.

Testauksen tekeminen vaadituilla kynnsarvoilla edellyttää myös laitteiden asianmukaisia asetuksia sekä niiden asianmukaista huoltoa ja vakaamista, reagenssien huolellista käsittelyä ja säilyttämistä sekä kaikkien sellaisten toimenpiteiden toteuttamista, joilla ehkäistään näytteiden välinen kontaminaatio, esim. positiivisten kontrollien pitäminen erillään testinäytteistä. Laadunvalvontastandardeja on sovellettava hallinnollisten ja muiden virheiden välttämiseksi, erityisesti pakkausmerkintöjen ja dokumentaation osalta.

Direktiivin 93/85/ETY 4 artiklan 2 kohdassa tarkoitettu epäily esiintyminen tarkoittaa positiivista tulosta näytteelle tehdyissä diagnostisissa tai seulontatesteissä, jotka esitetään vuokaaviossa.

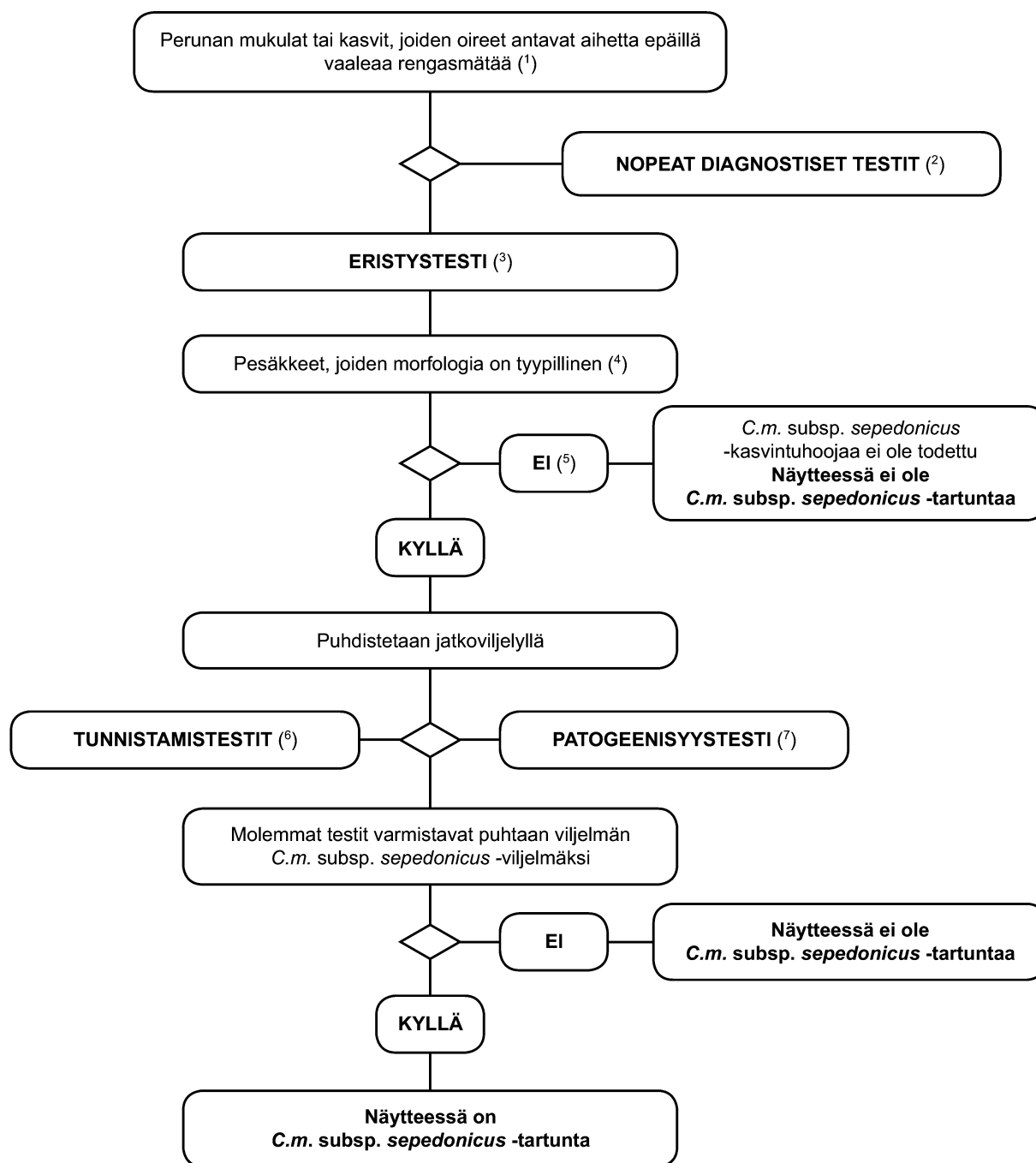
Jos ensimmäisestä seulontatestistä (IF- tai PCR/FISH-testi) saadaan positiivinen tulos, näytteen epäillä olevan bakteerin saastuttama ja sille on tehtävä toinen seulontatesti. Jos toisesta seulontatestistä saadaan positiivinen tulos, epäily varmistuu (epäily esiintyminen) ja tutkimusmenetelmän mukaista testausta on jatkettava. Jos toisesta seulontatestistä saadaan negatiivinen tulos, näytteen katsotaan olevan puhdas.

Näin ollen 4 artiklan 2 kohdassa tarkoitettu positiivinen reaktio IF-testissä määritellään positiiviseksi tulokseksi IF-testissä, joka varmistetaan toisella seulontatestillä (PCR/FISH-testi).

Direktiivin 93/85/ETY 5 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu varmistettu esiintyminen tarkoittaa puhtaan *C. m.* subsp. *sepedonicus* -viljelmän eristämistä ja tunnistamista siten, että sen patogeenisuus on varmistettu.

**1. VUOKAAVIOESITYS****1.1 Toteamismenetelmä perunan vaalean rengasmädän diagnosoimiseksi perunoiden mukuloista ja kasveista, joissa on vaalean rengasmädän oireita**

Testimenetelmä on tarkoitettu perunan mukuloille ja kasveille, joiden oireet ovat tyypillisiä vaalealle rengasmädälle tai antavat aiheutta epäillä tätä tautia. Siihen kuuluu nopea seulontatesti, taudinaiheuttajan eristäminen infektoituneesta johtosolukosta diagnostiseen elatusaineeseen ja, jos tulos on positiivinen, viljelmän tunnistaminen *C. m.* subsp. *sepedonicus* -kasvintuhoojaksi.



(1) Oireiden kuvaus esitetään 2 jaksossa.

(2) Tarkoituksenmukaiset testit ovat:  
— IF-testi (4 jakso),  
— PCR-testi (6 jakso),  
— FISH-testi (5 jakso).

(3) Vaikka taudinaiheuttajan eristäminen tyypillisten oireiden perusteella laimennussarjalla on yksinkertaista, viljely voi epäonnistua, jos tartunta on edennyt pitkälle. Taudin saastuttamissa solukoissa elävät saprofyttiset bakteerit voivat ohittaa kasvussa taudinaiheuttajan tai estää taudinaiheuttajan kasvua eristysalustalla. Tämän vuoksi on suositeltavaa käyttää sekä ei-valikoivaa että valikoivaa alustaa, mieluiten MTNA-alustaa (8 jakso) tai biologista määrittystä (7 jakso).

(4) Tyypillinen pesäkemorfologia esitetään 8 jaksossa.

(5) Jos eristystestin tulos on negatiivinen, mutta taudin oireet tyypilliset, eristäminen on toistettava.

(6) *C.m. subsp. sepedonicus* -kasvintuhoojan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu käyttämällä 9 jaksossa lueteltuja testejä.

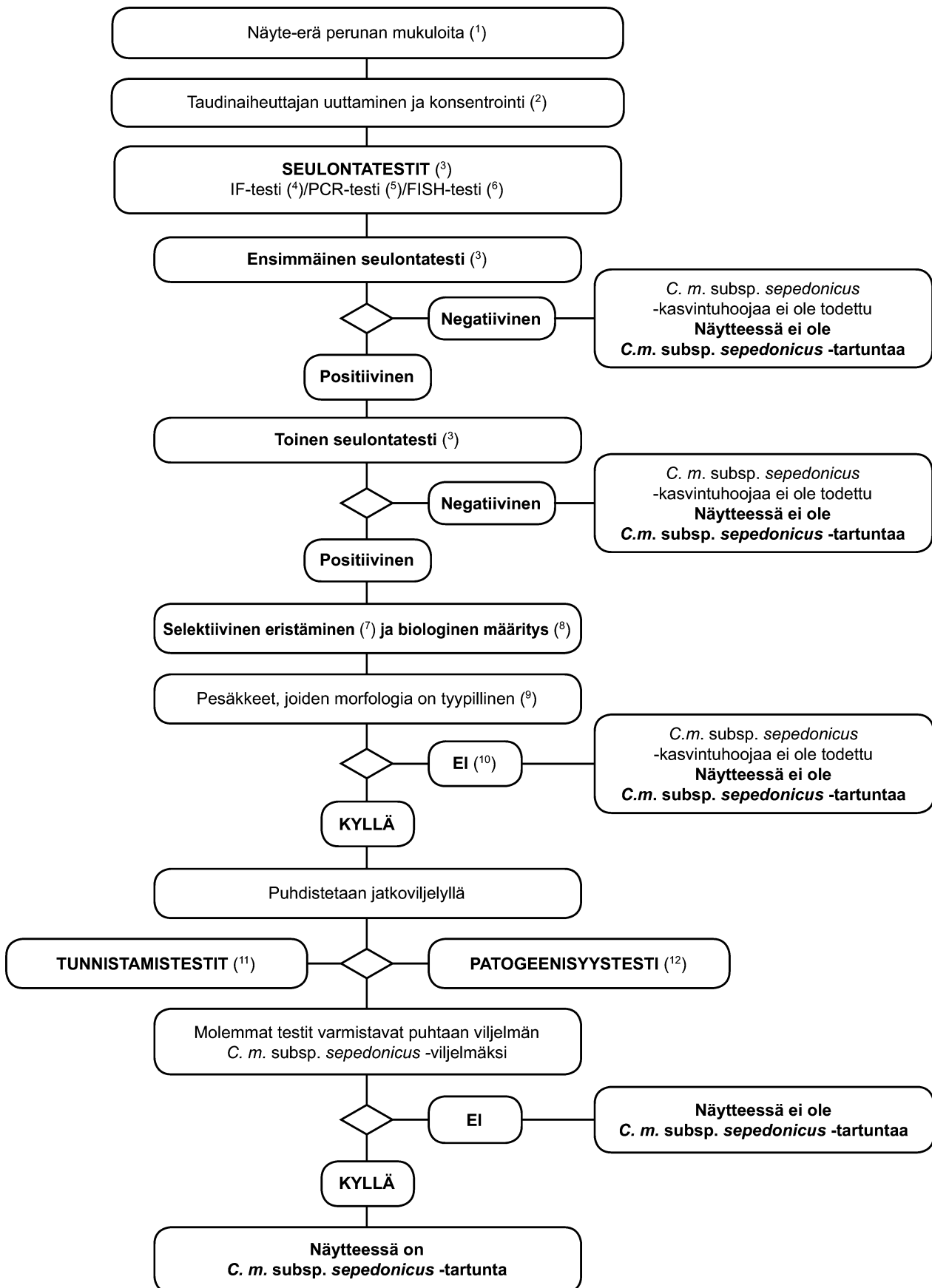
(7) Patogeenisyystesti kuvataan 10 jaksossa.

1.2 **Menetelmä *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista mukulanäytteistä**

*Periaate*

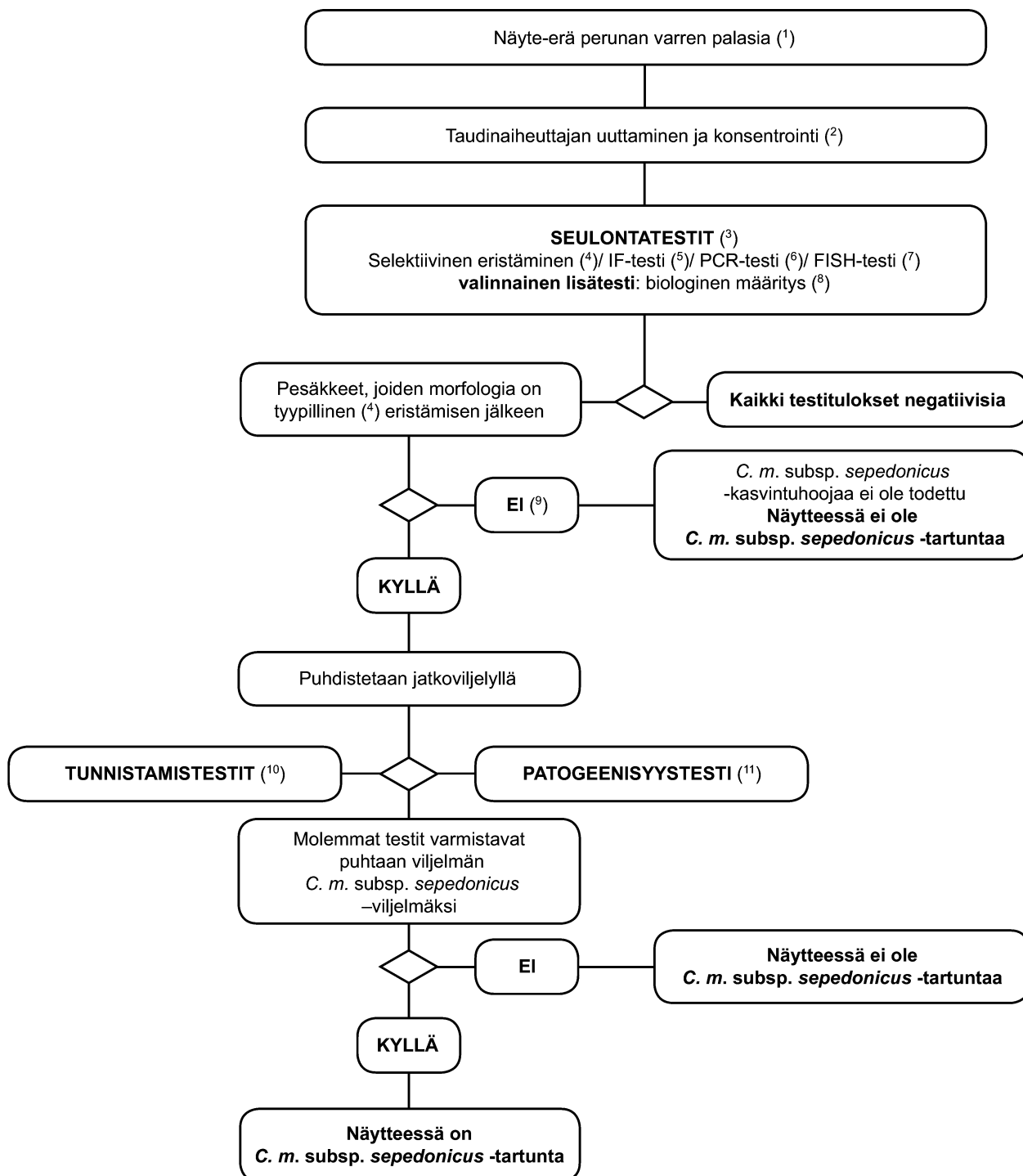
Menettely on tarkoitettu piilevien tartuntojen toteamiseen perunan mukuloissa. Jos erilaisiin biologisiin periaatteisiin perustuvista vähintään kahdesta seulontakokeesta saadaan positiivinen tutkimustulos, sitä täydennetään eristämällä taudinaiheuttaja. Jos eristyskokeen tuloksena saadaan tyyppillisiä pesäkkeitä, vuorossa on puhtaan viljelmän varmistaminen *C. m. subsp. sepedonicus* -kasvintuhoojaksi. Positiivinen tulos ainoastaan yhdestä seulontatestistä ei riitä pitämään näytettä epäilyttävänä.

Seulonta- ja eristystestien on mahdollistettava toteamisrajaksi  $10^3$ – $10^4$  solua uudelleen suspendoidun sakan yhtä millilitraa kohden; sakka sisältyy positiivisena kontrollina kuhunkin testisarjaan.



- (<sup>1</sup>) Standardi näytekoko on 200 mukulaa. Menetelmä soveltuu käytettäväksi myös alle 200 mukulan näytteille, jos 200:aa mukulaa ei ole käytettävissä.
- (<sup>2</sup>) Taudinaiheuttajan uuttamis- ja konsentroitimenetelmät kuvataan 3.1 jaksossa.
- (<sup>3</sup>) Jos vähintään kahdesta erilaisiin biologisiin periaatteisiin pohjautuvasta testistä saadaan positiivinen tulos, eristäminen ja varmistaminen on tehtävä. Tehdään vähintään yksi seulontatesti. Jos tästä testistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Jos testituloksena on positiivinen, on tehtävä toinen tai useampia seulontatestejä eri biologisten periaatteiden pohjalta, jotta ensimmäinen positiivinen tulos voidaan vahvistaa. Jos toisesta testistä tai muista testeistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Tällöin ei tarvita lisätestejä.
- (<sup>4</sup>) Immunofluoresenssi (IF) -testi.  
IF-seulonnassa on aina käytettävä polyklonaalisia vasta-aineita; lisäksi käytettävät monoklonaaliset vasta-aineet voivat lisätä spesifisyyttä (ks. 4 jakso).
- (<sup>5</sup>) PCR-testi.  
Käytettävä asianmukaisesti validoituja PCR-reagensseja ja -testausprotokollia (ks. 6 jakso).
- (<sup>6</sup>) Fish-testi.  
Käytettävä validoituja reagensseja ja testausprotokollia (ks. 5 jakso).
- (<sup>7</sup>) Selektiivinen eristäminen.  
Kun käytetään MTNA-alustaa tai NCP-88-alustaa ja kun uudelleen suspendoitu sakka on laimennettu suhteessa 1:100, tämä menetelmä soveltuu monissa tapauksissa *C. m. subsp. sepedonicus* -taudinaiheuttajan suoraan eristämiseen. Tyypillisiä pesäkkeitä voidaan saada 3–10 päivää uuden viljelmän aloittamisen jälkeen. Taudinaiheuttaja voidaan sitten puhdistaa ja tunnistaa. Jotta testistä saataisiin täysi hyöty, testissä käytettävät mukuloiden napapää on käsiteltävä huolellisesti, jotta voidaan eliminoida toissijaiset bakteerit, jotka ovat alustalla *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kilpailijoita ja voivat estää taudinaiheuttajan kehittymisen. Jos tämä maljaustesti epäonnistuu, eristäminen on tehtävä biologiseen määritykseen käytettävistä kasveista (ks. 8 jakso).
- (<sup>8</sup>) Biologista määritysmenetelmää käytetään *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin eristämiseen perunan sakkauutteesta käyttäen valikoivaa rikastusta munakoisoissa (*Solanum melongena*). Testi edellyttää optimaalisia menetelmässä tarkennettuja inkubointiolosuhteita. Bakteerit, jotka inhiboivat *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria MTNA- tai NCP-88-alustalla, eivät todennäköisesti häiritse tätä testiä (ks. 7 jakso).
- (<sup>9</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu 8 jaksossa.
- (<sup>10</sup>) Viljelytestit tai biologiset määritykset saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos seulontatesteistä saadaan positiiviset mutta eristystesteistä negatiiviset tulokset, toistetaan eristystestit samasta sakasta tai otetaan lisää johtosolukkoa samaan näytteeseen kuuluvien halkaistujen mukuloiden napapään läheltä ja testataan tarvittaessa lisänäytteitä.
- (<sup>11</sup>) Oletetun *C. m. subsp. sepedonicus* -kasvintuhoojan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu käyttämällä 9 jaksossa kuvattuja testejä.
- (<sup>12</sup>) Patogeenisyydesti kuvataan 10 jaksossa.

1.3 Menetelmä *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista kasvinäytteistä





- (<sup>1</sup>) Ks. jaksosta 3.2 suositellut näytekoot.
- (<sup>2</sup>) Taudinaiheuttajan uuttamis- ja konsentroidintimenetelmät kuvataan 3.2 jaksossa.
- (<sup>3</sup>) Jos vähintään kahdesta erilaisiin biologisiin periaatteisiin pohjautuvasta testistä saadaan positiivinen tulos, eristäminen ja varmistaminen on tehtävä.  
Tehdään vähintään yksi seulontatesti. Jos tästä testistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Jos testituloksella on positiivinen, on tehtävä toinen tai useampia seulontatestejä eri biologisten periaatteiden pohjalta, jotta ensimmäinen positiivinen tulos voidaan vahvistaa. Jos toisesta testistä tai muista testeistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Tällöin ei tarvita lisätestejä.
- (<sup>4</sup>) Selektiivinen eristäminen ja tyypillinen pesäkemorfologia kuvataan 8 jaksossa.
- (<sup>5</sup>) IF-testi kuvataan 4 jaksossa.
- (<sup>6</sup>) PCR-testit kuvataan 6 jaksossa.
- (<sup>7</sup>) FISH-testi kuvataan 5 jaksossa.
- (<sup>8</sup>) Biologinen määrittely kuvataan 7 jaksossa.
- (<sup>9</sup>) Viljelystestit tai biologiset määrittelyt saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos seulontatesteistä saadaan positiiviset mutta eristystesteistä negatiiviset tulokset, eristystestit toistetaan ja tarvittaessa testataan lisänäytteitä.
- (<sup>10</sup>) Oletetun *C. m. subsp. sepedonicus* -kasvintuhoojan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu käyttämällä 9 jaksossa kuvattuja testejä.
- (<sup>11</sup>) Patogeenisyydesti kuvataan 10 jaksossa.

## 2. SILMÄMÄÄRÄINEN PERUNAN VALEAN RENGASMÄDÄN OIREIDEN TARKASTELU

### 2.1 Perunakasvit

Euroopan ilmasto-oloissa oireet eivät yleensä näy pellossa ja, jos niitä näkyy, tämä tapahtuu usein vasta kasvukauden lopulla. Lisäksi toiset taudit, vanheneminen tai mekaaniset vauriot peittävät usein oireet tai oireet voidaan sekoittaa niihin. Oireet saattavat siten helposti jäädä huomaamatta pellolla tehtävissä tarkastuksissa. Lakastumisoireet poikkeavat suuresti tumman rengasmädän aiheuttamista oireista; lakastuminen on yleensä hidasta ja rajoittuu aluksi lehtien reunoihin. Tartunnan saaneet nuoret lehdet jatkavat usein kasvuaan, vaikkakin kasvu on hitaampaa tartunnan saaneilla alueilla. Seurauksena on oudonmuotoisia lehtiä. Jos varren johtosolukko tukkeutuu, lehtisuonten välinen alue lehdessä muuttuu usein kellertäväksi tai oranssiksi. Tartunnan saaneet lehdykät, lehdet ja jopa varret saattavat kuolla. Usein seurauksena on vain lehtien ja mukuloiden koon pieneneminen. Toisinaan kasvusta tulee kitukasvuinen. Värikuvia erilaisista oireista löytyy seuraavilta www-sivuilta: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

### 2.2 Perunan mukulat

Ensimmäiset oireet ovat erityisesti napapään lähellä olevan solukon lievä lasimaisuus tai läpikuultavuus ilman että suoniston ympäryys olisi pehmennyt. Napapäässä oleva johtosolukkorengas voi olla väriltään hieman tavanomaista tummempi. Ensimmäiset oireet, jotka voidaan selvästi tunnistaa, ovat johtosolukkorengaan kellertävä väri ja se, että mukulaa kevyesti painettaessa suonista tulee ulos juustomaista ainetta. Tämä tihkuva erite sisältää miljoonia bakteereita. Johtosolukko voi tummua, ja mukuloiden oireet ovat tässä vaiheessa samanlaiset kuin tummaa rengasmätää aiheuttavan *Ralstonia solanacearum* -bakteerin aiheuttamat oireet. Ensi vaiheessa näiden oireiden esiintyminen voi rajoittua ainoastaan osaan rengasta, eikä välttämättä lähimpänä napapäästä olevaan osaan, ennen kuin ne leviävät asteittain koko renkaaseen. Saastunnan leviämisen myötä suonisolukot tuhoutuvat. Ulkokuori voi erottua sisäkuoresta. Saastunnan myöhemmissä vaiheissa mukulan pintaan ilmestyy reunoiltaan usein punaisenruskeita halkeamia. Euroopassa on vastikään esiintynyt useita tapauksia, joissa kuoren keskiosa mätäneee samaan aikaan kuin johtosolukkorengas, mistä aiheutuu sekundäärinen invaasio, joka johtaa sisuksen muuttumiseen ontoksi ja nekroosiin. Jonkin toisen taudinaiheuttajan, sienen tai bakteerin, aiheuttama samanaikainen saastunta voi peittää oireet, jolloin voi olla vaikeaa, jollei mahdotonta, erottaa perunan vaalean rengasmädän myöhempiä oireita muista perunan pilaaajista. Epätyypilliset oireet ovat mahdollisia. Värikuvia erilaisista oireista löytyy seuraavilta [www-sivuilta](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main): <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>

## 3. NÄYTTEIDEN VALMISTAMINEN

### 3.1 Perunan mukulat

*Huom.*

- Standardinäyttekoko on 200 mukulaa testiä kohden. Laajempi näytteenotto edellyttää useampia testejä tämänkokoisille näytteille. Jos näytteessä on enemmän kuin 200 mukulaa, tulokset saattavat jäädä saamatta tai niitä on vaikea tulkita. Menettelyä voidaan kuitenkin hyvin käyttää alle 200 mukulan näytteisiin, jos 200:aa mukulaa ei ole käytettävissä.
- Kaikkien jäljempänä kuvattujen toteamismenetelmien validointi perustuu 200 mukulan suuruisen näytteen testaamiseen.
- Jäljempänä kuvattua perunautetta voidaan käyttää myös perunan tummaa rengasmätää aiheuttavan *Ralstonia solanacearum* -bakteerin toteamiseen.

Näytteiden valmistamista edeltävä vapaavalintainen esikäsittely:

Pestään mukulat. Kunkin näytteen jälkeen käytetään tarkoituksenmukaisia desinfiointiaineita (tehtaässä PCR-testi on käytettävä klooriyhdisteitä mahdollisen patogeenisen DNA:n poistamiseksi) ja puhdistusaineita. Ilmakuivataan mukulat. Pesumenetelmästä on erityistä hyötyä (vaikkakaan sitä ei vaadita), jos näytteissä on paljon ylimääräistä multaa ja jos PCR-testi tai suora eristysmenettely toteutetaan.

- 3.1.1 Poistetaan puhtaalla ja desinfioidulla leikkausveitsellä tai vihannesveitsellä kuori mukulan napapäästä siten, että johtosolukko tulee näkyviin. Leikataan varovasti pieni kartionmuotoinen kappale johtosolukosta kunkin mukulan napapäästä ja yritetään pitää muun solukon kuin johtosolukon osuus mahdollisimman pienenä (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)).

*Huom.*

Laitetaan sivuun jokainen mukula, jossa epäillään olevan rengasmätää, ja testataan yksittäin.

Jos napapään irrottamisen aikana havaitaan rengasmädäksi epäiltyjä oireita, mukula olisi tutkittava silmämääräisesti sen jälkeen, kun napapään läheltä on lohkaistu pala. Lohkaistuja mukuloita, joissa on epäilyttäviä oireita, olisi korkkiutettava huoneenlämmössä 2 vuorokautta ja säilytettävä karanteenissa (4–10 °C:ssa), kunnes kaikki testit on saatu tehtyä. Kaikki mukulanäytteet (myös ne, joissa on epäilyttäviä oireita) olisi säilytettävä liitteen II mukaisesti.

3.1.2 Kerätään napapääkappaleet käyttämättömiin kertakäyttöisiin säilytysastioihin, jotka voidaan sulkea ja/tai sinetöidä (jos astioita käytetään uudelleen, ne olisi puhdistettava perusteellisesti ja desinfioitava klooriyhdisteillä). Kappaleet olisi mieluiten käsiteltävä viipymättä. Jos tämä ei ole mahdollista, niitä voidaan säilyttää astiassa – lisäämättä pussuriliuosta – jäähdytettyinä enintään 72 tunnin ajan tai huoneenlämmössä enintään 24 tunnin ajan. Rengasmätäbakteerin toteamista saattavat haitata kappaleiden kuivuminen ja korkkiutumisen sekä saprofyttien kasvu varastoinnin aikana.

3.1.3 Käsitellään napapääkappaleet yhtä seuraavista menettelyistä noudattaen: joko

a) peitetään kappaleet riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuriä (lisäys 3) ja sekoitetaan tasoravistimella (50–100 rpm:n kierrosnopeudella) neljän tunnin ajan alle 24 °C:ssa tai 16–24 tunnin ajan jäähdytettyinä;

tai

b) homogenoidaan kappaleet riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuriä (lisäys 3) joko sekoittimella (esim. Waring tai Ultra Turrax) tai murskaamalla suljetussa kertakäyttöisessä pussissa (esim. luja Stomacher- tai Bioreba-polyeteenipussi, jonka mitat ovat 150 mm x 250 mm, säteilysteriili) käyttäen kumivasaraa tai sopivaa murskaamisvälinettä (esim. Homex).

*Huom.*

Näytteiden ristikontaminaation riski on suuri silloin, kun näytteet homogenoidaan sekoittimella. On ryhdyttävä varotoimiin roiskumisen tai läikkymisen välttämiseksi uuttamisprosessin aikana. On varmistettava, että jokaista näytettä varten käytetään vasta steriloituja sekoittimen teriä ja astioita. Jos aiotaan tehdä PCR-testi, on vältettävä DNA:n siirtyminen astioihin tai murskaamislaitteisiin. Tehtäessä PCR-testi on suositeltavaa murskata kappaleet kertakäyttöisissä pusseissa ja käyttää kertakäyttöisiä putkia.

3.1.4 Dekantoidaan supernatantti. Jos liuos on liian sameaa, sitä kirkastetaan joko hitaasti sentrifugoiden (enintään 180 x g kymmenen minuutin ajan 4–10 °C:n lämpötilassa) tai suodatetaan liuos (40–100 µm:n huokoskoon vakuumisuodatusjärjestelmällä) ja pestään suodatin vielä uuttopuskurilla (10 ml) (lisäys 3).

3.1.5 Konsentroidaan bakteerifraktio sentrifugoimalla 7 000 x g 15 minuutin ajan (tai 10 000 x g 10 minuutin ajan) 4–10 °C:n lämpötilassa ja poistetaan supernatantti sakkaa sekoittamatta.

3.1.6 Suspendoidaan sakka uudelleen 1,5 ml:aan sakkapuskuriä (lisäys 3). Käytetään 500 µl *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin testaamiseksi, 500 µl *Ralstonia solanacearum* -bakteerin testaamiseksi ja 500 µl vertailutarkoituksiin. Lisätään steriiliä glyserolia vertailuaineena käytettävään näytteeseen (500 µl) ja jäljellä olevaan testinäytteeseen 10–25 % (v/v) loppupitoisuuden saavuttamiseksi, sekoitetaan vorteksilla ja varastoidaan – 16 ja – 24 °C:n väliseen lämpötilaan (viikoksi) tai – 68 ja – 86 °C:n väliseen lämpötilaan (kuukausiksi). Säilytetään testinäytteet 4–10 °C:ssa testauksen ajan.

Toistuva jäädytys ja sulatus ei ole suositeltavaa.

Jos uutetta joudutaan kuljettamaan, toimitus on tehtävä kylmälaukussa 24–48 tunnin kuluessa.

3.1.7 Kontaminaation välttämiseksi on ehdottoman tärkeää käsitellä kaikki *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin positiiviset kontrollit ja näytteet toisistaan erillään. Tämä koskee sekä immunofluoresenssitestiä että kaikkia muitakin testejä.

## 3.2 Perunakasvit

*Huom.*

Piilevien *C. m. subsp. sepedonicus* -kantojen toteamiseksi on suositeltavaa käyttää kokoomanäytteitä. Menettelyä voidaan vaivatta käyttää jopa 200:n varresta otetun osan muodostamiin kokoomanäytteisiin. (Jos tehdään tutkimuksia, niiden olisi perustuttava tilastollisesti edustavaan otokseen tutkittavana olevasta kasvipopulaatiosta.)

3.2.1 Poistetaan desinfioidulla leikkausveitsellä tai desinfioiduilla oksaksaksilla 1–2 cm:n palanen kunkin varren alaosa juuri maanpinnan yläpuolelta.

Desinfioidaan varren osat pikaisesti 70 % etanolilla ja kuivataan välittömästi kasvopaperiin taputtamalla.

Kerätään varren palaset suljettavaan steriiliin astiaan seuraavien näytteenottomenetelmien mukaisesti:

3.2.2 Käsitellään varren palaset yhtä seuraavista menettelyistä noudattaen: joko

a) peitetään palaset riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuria (lisäys 3) ja sekoitetaan tasoravistimella (50–100 rpm:n kierrosnopeudella) neljän tunnin ajan alle 24 °C:ssa tai 16–24 tunnin ajan jäähdetytynä;

tai

b) käsitellään välittömästi murskaamalla palaset lujassa pussissa (esim. Stomacher tai Bioreba) siten, että siinä on sopiva määrä uuttopuskuria (lisäys 3), käyttäen kumivasaraa tai sopivaa murskaamisvälinettä (esim. Homex). Jos tämä ei ole mahdollista, varastoidaan varren palaset jäähdetytynä enintään 72 tunnin ajan tai huoneenlämmössä enintään 24 tunnin ajan.

3.2.3 Dekantoidaan supernatantti, kun seos on saanut seistä 15 minuuttia.

3.2.4 Uutteen lisäkirkastaminen tai bakteerifraktion konsentroidi ei yleensä ole tarpeen mutta voidaan tehdä suodattamalla ja/tai sentrifugoimalla, kuten 3.1.4–3.1.6 kohdassa kuvataan.

3.2.5 Jaetaan laimentamaton tai konsentroidu näyteuute kahteen yhtä suureen osaan. Pidetään yhtä osaa 4–10 °C:n lämpötilassa testauksen ajan ja varastoidaan toinen puolisko 10–25 %:ssa (v/v) steriilissä glyserolissa – 16 ja – 24 °C:n väliseen lämpötilaan (viikoiksi) tai – 68 ja – 86 °C:n väliseen lämpötilaan (kuukausiksi), mikäli lisätestaus on tarpeen.

#### 4. IMMUNOFLUORESENSSITESTI (IF)

##### Periaate

IF-testin käyttö pääasiallisena seulontatestinä on suositeltavaa, koska se on todistetusti riittävän herkkä vaadittavien kynnsarvojen saavuttamiseksi.

Kun IF-testiä käytetään pääasiallisena seulontatestinä ja IF-testin tulos on positiivinen, toisena seulontatestinä on tehtävä PCR- tai FISH-testi. Jos IF-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja IF-testin tulos on positiivinen, vuokaavion mukainen lisätestaus on tarpeen analyysin suorittamiseksi.

##### Huom.

Aina kun IF-testiä käytetään pääasiallisena seulontatestinä, on käytettävä polyklonaalista vasta-ainetta. Jos polyklonaalisella vasta-aineella tehdystä IF-testistä saadaan positiivinen tulos, monoklonaalisella vasta-aineella tehtävä näytteen lisäseulonta saattaa lisätä testin spesifisyyttä mutta heikentää herkkyyttä.

Käytetään *C. m. subsp. sepedonicus* -vertailukannan vasta-aineita. On suositeltavaa määrittää titteri kullekin uudelle vasta-aine-erälle. Titteri määritellään korkeimmaksi laimennokseksi, jolla optimaalinen reaktio tapahtuu, kun testataan suspensiota, joka sisältää *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin homologisesta kannasta saatuja soluja ( $10^5$ – $10^6$ /ml), sopivalla fluoreseiini-isotiosyanaattikonjugaatilla (FITC) valmistajan suositusten mukaisesti. Puhdistamattomien polyklonaalisten tai monoklonaalisten vasta-aineiden IF-titterin olisi oltava vähintään 1:2 000. Vasta-aineita olisi testeissä käytettävä lähellä titteriä olevassa tai titterin suuruudessa työskentelylaimennoksessa (tai -laimennoksissa). Käytetään validoituja vasta-aineita (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)).

Testi olisi tehtävä vasta valmistetuista näyteuuteista. Testi voidaan tarvittaessa tehdä uuteista, joita on säilytetty – 68 ja – 86 °C:n välisessä lämpötilassa glyserolissa. Glyseroli voidaan poistaa näytteestä lisäämällä 1 ml sakkapuskuria (lisäys 4), sentrifugoimalla uudelleen 15 minuutin ajan 7 000 x g ja suspendoimalla uudelleen yhtä suureen tilavuuteen sakkapuskuria. Tämä ei ole useinkaan välttämätöntä erityisesti, jos näytteet kiinnitetään objektilevyihin liekittämällä (ks. 2.2).

Valmistetaan erilliset positiiviset kontrollilevyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin homologisesta kannasta tai mistä tahansa muusta vertailukannasta, joka on suspendoitu perunauutteeseen, kuten lisäyksessä 2 täsmennetään, tai vaihtoehtoisesti puskuriliuokseen.

Luonnollisesti saastunutta solukkoa (jäädystyskuivaamalla tai pakastamalla – 16 ja – 24 °C:n välisessä lämpötilassa säilytettyä) olisi mahdollisuuksien mukaan käytettävä vertailua varten samalla objektilevyllä.

Negatiivisina kontrolleina käytetään sellaisia näyteuutteen määräosia, jotka on aiemmin testattu negatiivisiksi.

Käytetään kuoppalevyjä, joissa on mieluiten 10 halkaisijaltaan vähintään 6 mm:n syvennystä.

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

#### 4.1 Käsitellään testilevyt yhdellä seuraavista menettelyistä:

##### i) Pelletit, joissa on suhteellisen vähän tärkkelystä:

Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen – lisätään määrää samassa suhteessa suuremmille syvennyksille) suhteessa 1:100 laimennettua, uudelleen suspendoitua sakkaa ensimmäiseen syvennykseen. Pipetoidaan samanlainen määrä laimentamatonta sakkaa (1:1) rivin muihin syvennyksiin. Jäljellä olevaa riviä voidaan käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuvassa 1 on esitetty.

##### ii) Muut pelletit:

Valmistetaan kymmenkertaisia laimennoksia (1:10 ja 1:100) uudelleen suspendoidusta sakasta sakkapuskuriin. Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen – lisätään määrää samassa suhteessa suuremmille syvennyksille) uudelleen suspendoitua sakkaa ja kutakin laimennosta riville syvennyksiä. Jäljellä olevaa riviä voidaan käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuvassa 2 on esitetty.

#### 4.2 Annetaan pisaroiden kuivua huoneenlämmössä tai lämmittämällä 40–45 °C:n lämpötilassa. Kiinnitetään bakteerisolut objektilevyille joko kuumentamalla (15 minuuttia 60 °C:n lämpötilassa), liekittämällä tai 95 % etanolilla tai vasta-aineiden toimittajien nimenomaisten ohjeiden mukaisesti.

Kiinnitettyjä objektilevyjä voidaan tarvittaessa säilyttää jäädytettynä kuivatusainetta sisältävässä laatikossa mahdollisimman lyhyen aikaa (enintään 3 kuukautta) ennen lisätestejä.

#### 4.3 IF-menettely:



##### i) Testilevyn valmistaminen 4 kohdan 1 alakohdan i alakohdan mukaisesti:

Valmistetaan sarja kaksinkertaisia vasta-aineen laimennoksia IF-puskuriin. Ensimmäisen syvennyksen olisi oltava 1/2 titteriä (T/2), ja muiden 1/4 titteriä (T/4), 1/2 titteriä (T/2), titteri (T) ja titteri kaksinkertaisena (2T).

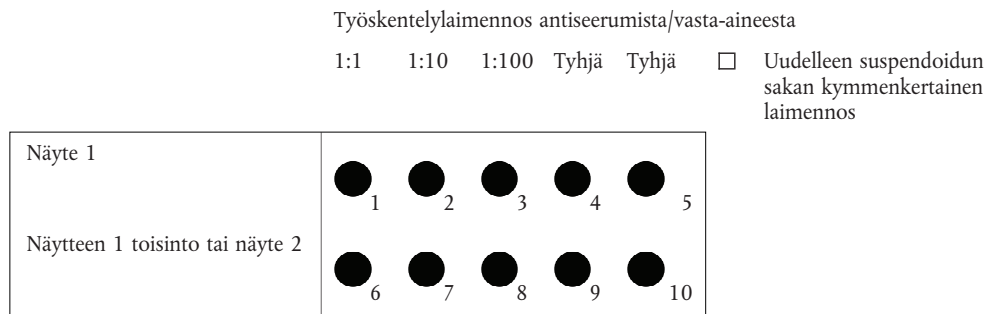
##### ii) Testilevyn valmistaminen 4 kohdan 1 alakohdan ii alakohdan mukaisesti:

Valmistetaan työskentelylaimennos vasta-aineesta IF-puskuriin. Työskentelylaimennos vaikuttaa spesifisyyteen.

Kuva 1. Testilevyn valmistaminen 4 kohdan 1 alakohdan i alakohdan ja 4 kohdan 3 alakohdan i alakohdan mukaisesti

		Laimennokset uudelleen suspendoidusta sakasta						
		1:100	1:1	1:1	1:1	1:1	<input type="checkbox"/>	Uudelleen suspendoidun sakan laimennos
(T = titteri)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/>	Antiseerumin/vasta-aineen kaksinkertaiset laimennokset
Näyte 1		1	2	3	4	5		
Näytteen 1 toisinto tai näyte 2		6	7	8	9	10		

Kuva 2. Testilevyn valmistaminen 4 kohdan 1 alakohdan ii alakohdan ja 4 kohdan 3 alakohdan ii alakohdan mukaisesti



4.3.1 Järjestetään objektilevyt kostean paperin päälle. Täytetään testisyvennykset kokonaisuudessaan vasta-aineen laimennoksella tai laimennoksilla. Syvennyksiin lisättävän vasta-aineen tilavuuden on vastattava levitetyn uutteen tilavuutta.

Seuraava menettely olisi toteutettava, jos vasta-aineiden toimittajilta ei ole saatu nimenomaisia ohjeita:

4.3.2 Objektilevyjä inkuboidaan kannen alla kostean paperin päällä 30 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C).

4.3.3 Ravistetaan pisarat pois kaikilta objektilevyiltä ja huuhdellaan levyt varovasti IF-puskurilla. Pestään 5 minuutin ajan IF-puskuri-Tweenillä (lisäys 3) ja sen jälkeen 5 minuutin ajan IF-puskurissa. Vältetään roiskeita tai pisaroiden kulkeutumista, joista saattaa olla seurauksena ristikontaminaatio. Poistetaan ylimääräinen kosteus varovasti paperipyyhkeellä.

4.3.4 Järjestetään objektilevyt kostean paperin päälle. Täytetään testisyvennykset FITC-konjugaatin laimennoksella, jota on käytetty titterin määrittämiseen. Syvennyksiin lisätyn konjugaatin määrän on vastattava lisätyn vasta-aineen määrää.

4.3.5 Objektilevyjä inkuboidaan kannen alla kostean paperin päällä 30 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C).

4.3.6 Ravistetaan konjugaattipisarat pois levyiltä. Huuhdellaan ja pestään kuten edellä (4.3.3).

Poistetaan varovasti ylimääräinen kosteus paperipyyhkeellä.

4.3.7 Pipetoidaan 5–10 µl:ä 0,1 M fosfaattipuskuroitua glyserolia (lisäys 3) tai vastaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa haalistumiselta suojaavaa peittäusainetta kuhunkin syvennykseen ja asetetaan peitelasi.

4.4 IF-testin lukeminen:

4.4.1 Tutkitaan testilevyjä mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä ja FITC:n eksitaatioon sopivilla suodattimilla öljy- tai vesi-immersio-objektiivin 500–1 000-kertaisella suurennoksella. Tarkastellaan objektikenttää laidasta laitaan pystysuoraan ja vaakasuoraan ja kiertämällä ulkoreunaa pitkin. Näytteistä, joissa ei näy yhtään tai vain hyvin vähän soluja, tarkastellaan vähintään 40 mikroskooppikenttää.

Tutkitaan ensin positiiviset kontrollilevyt. Solujen on oltava kirkkaasti fluoresoivia ja täydellisesti värjäytyneitä määritellyllä vasta-ainetitterillä tai työskentelylaimennoksella. IF-testi (4 jakso) on uusittava, jos värjäytyminen ei ole täydellistä.

4.4.2 Tarkoituksena on löytää kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille (ks. www-sivusto osoitteessa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluoresenssin intensiteetin on vastattava vähintään positiivisen kontrollikannan fluoresenssin intensiteettiä samassa vasta-ainelaimennoksessa. Sellaisia soluja, joiden värjäytyminen on epätäydellistä tai joiden fluoresenssi on heikko, ei oteta huomioon.

Jos epäillään kontaminaatiota, testi on toistettava. Näin saattaa käydä, jos kaikilla erän objektilevyillä on positiivisia soluja puskurin kontaminaation vuoksi tai jos positiivisia soluja löytyy (levyn syvennyksen ulkopuolelta) levyn pinnoitteelta.

4.4.3 Immunofluoresenssitestien spesifisyyteen liittyy useita ongelmia. Perunan napapäiden ja varren palasten sakassa esiintyy todennäköisesti morfologisesti epätyypillisiä fluoresoivien solujen ja *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kanssa kooltaan ja morfologialtaan samanlaisten ristiin reagoivien saprofyttisten bakteerien populaatioita.

4.4.4 Tarkastellaan ainoastaan fluoresoivia soluja, joilla on tyypillinen koko ja morfologia vasta-ainetitterissa tai -työskentelylaimennoksessa, kuten 4.3 kohdassa kuvattiin.

4.4.5 IF-testin tulosten tulkinta:

- i) Jos näytteestä löytyy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, tyypillisten solujen keskimääräinen lukumäärä arvioidaan mikroskooppikenttää kohden ja lasketaan näiden solujen lukumäärä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden (lisäys 4).

IF-testin tulos on positiivinen, jos näytteissä on vähintään  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden. Näytettä pidetään mahdollisesti saastuneena, ja lisätestaus on tarpeen.

- ii) IF-testin tulos on negatiivinen, jos näytteissä on vähemmän kuin  $5 \times 10^3$  solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, ja näytettä pidetään negatiivisena. Lisätestausta ei vaadita.

## 5. FISH-TESTI

### Periaate

Kun FISH-testiä käytetään ensimmäisenä seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, toisena pakollisena seulontatestinä on tehtävä IF-testi. Kun FISH-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, vuokaavion mukainen lisätestaus on tarpeen diagnoosin tekemiseksi.

### Huom.

Käytetään validoituja *C. m. subsp. sepedonicus* -spesifisiä oligokoettimia (lisäys 7). Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteuutteisiin lisätyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solut (vähintään  $10^3$ – $10^4$ /ml). Testi on voitava toistaa.

Seuraava menettely olisi mielellään tehtävä vasta valmistetuille näyteuutteille. Menettely voidaan tarvittaessa kuitenkin tehdä näyteuutteille, joita on säilytetty glyserolissa  $-16$  ja  $-24$  °C:n välisessä lämpötilassa tai  $-68$  ja  $-86$  °C:n välisessä lämpötilassa.

Negatiivisina kontrolleina käytetään sellaisia näyteuutteen osia, jotka on aiemmin testattu *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin osalta negatiivisiksi.

Positiivisiksi kontrolleiksi valmistetaan suspensioita, jotka sisältävät  $10^5$ – $10^6$  solua/ml *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerista (esim. kanta NCPPB 4053 tai PD 406), 0,01 M fosfaattipuskurissa (PB) 3–5 vuorokauden viljelmästä (valmistus ks. lisäys 2). Valmistetaan erilliset positiiviset kontrollilevyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin homologisesta kannasta tai mistä tahansa muusta vertailukannasta, joka on suspendoitu perunauutteeseen, kuten lisäyksessä 2 täsmennetään.

FITC-leimatus eubakteriaalisen oligokoettimen käyttö toimii kontrollina hybridisaatioprosessia varten, sillä se värjää kaikki näytteessä olevat eubakteerit.

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

### 5.1 Perunauutteen fiksointi

Seuraava testausprotokolla on peräisin lähteestä Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1 Valmistetaan kiinniteliuos (ks. lisäys 7).

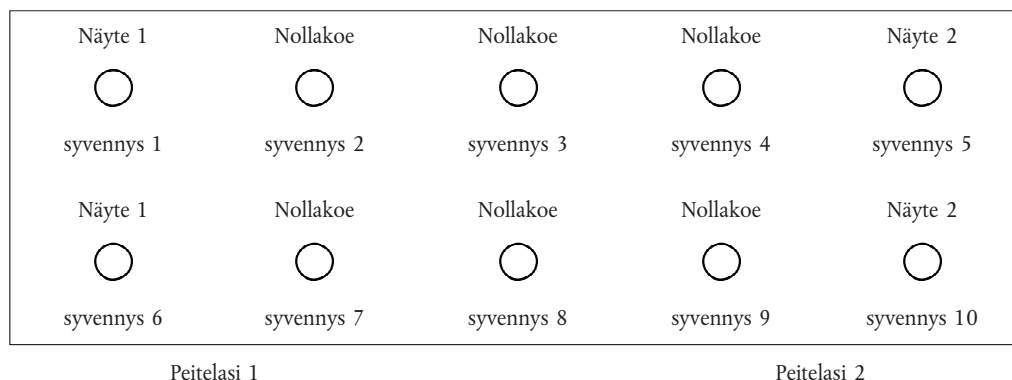
5.1.2 Pipetoidaan 100 µl kustakin näyteuutteesta Eppendorf-putkeen ja sentrifugoidaan 8 minuuttia 7 000 x g.

5.1.3 Poistetaan supernatanti ja liuotetaan sakka 500 µl:aan kiinniteliuosta, joka on valmistettu < 24 tuntia aiemmin. Sekoitetaan vorteksilla ja inkuboidaan yön yli 4 °C:ssa.

Vaihtoehtoisena kiinniteliuoksena voidaan käyttää 96 % etanolia. Sitä käytettäessä liuotetaan sakka vaiheesta 5.1.2 50 µl:aan 0,01 M fosfaattipuskuria ja 50 µl:aan 96 % etanolia. Sekoitetaan vorteksilla ja inkuboidaan 4 °C:ssa 30–60 minuutin ajan.

- 5.1.4 Sentrifugoidaan 8 minuutin ajan 7 000 x g, poistetaan supernatantti ja suspendoidaan sakka uudelleen 75 µl:aan 0,01 M fosfaattipuskuria (ks. lisäys 3).
- 5.1.5 Tiputetaan 16 µl kiinnitettyjä suspensioita kuvassa 3 esitetylle puhtaalle kuoppalevyille. Laitetaan kullekin levyille 2 laimentamatonta näytettä ja käytetään 10 µl:aa 1:100-laimennoksen (0,01 M fosfaattipuskuriin) tekemiseksi. Jäljellä oleva näyteliuos (49 µl) voidaan varastoida – 20 °C:ssa, kun siihen on lisätty 1 tilavuus 96 % etanolia. Jos FISH-testi on toistettava, poistetaan etanoli sentrifugimalla ja lisätään yhtä suuri tilavuus 0,01 M fosfaattipuskuria (sekoitetaan vorteksilla).

Kuva 3. Piiirros FISH-levystä



- 5.1.6 Ilmakuivataan objektilevyt (tai kuivataan ne levyn kuivaajalla 37 °C:ssa) ja kiinnitetään ne liekittämällä.

Tässä vaiheessa menettely voidaan keskeyttää, ja hybridisaatiota voidaan jatkaa seuraavana päivänä. Levyt olisi säilytettävä pölyltä suojassa ja kuivassa paikassa huoneenlämmössä.

## 5.2 Pre-hybridisaatio ja hybridisaatio

- 5.2.1 Valmistetaan lysotsyymiliuos, joka sisältää 10 mg lysotsyymia (Sigma L-6876) 10 ml:ssa puskuria (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Liuos voidaan varastoida, mutta sitä ei saisi jäädyttää ja sulattaa yhtä kertaa useammin. Peitetään jokainen näytesyvennys noin 50 µl:lla lysotsyymiliuosta ja inkuboidaan 10 minuutin ajan huoneenlämmössä. Kastetaan objektilevyt sitten demineralisoituun veteen yhden kerran ja kuivataan suodatinpaperilla.

Lysotsyymiin sijasta voidaan vaihtoehtoisesti lisätä 50 µl 40–400 µg ml<sup>-1</sup> proteinaasi-K:ta puskurissa (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) kuhunkin syvennykseen ja inkuboida 37 °C:ssa 30 minuutin ajan.

- 5.2.2 Poistetaan soluista vesi vaiheittain 50, 80 ja 96 % etanolissa minuutin ajan kussakin. Ilmakuivataan objektilevyt levytelineessä.
- 5.2.3 Valmistellaan kostea inkubaatiokammio peittämällä ilmatiiviin laatikon pohja kasvopaperilla tai suodatinpaperilla, joka on kastettu 1x hybmix-seokseen (lisäys 7). Esi-inkuboidaan laatikko hybridisaatiouunissa 55 °C:ssa vähintään 10 minuutin ajan.
- 5.2.4 Valmistetaan hybridisaatioliuos (lisäys 7) siten, että joka objektilevyille tulee 45 µl, ja esi-inkuboidaan 5 minuutin ajan 55 °C:ssa.
- 5.2.5 Sijoitetaan objektilevyt lämpölevylle (45 °C) ja 10 µl hybridisaatioliuosta pipetoidaan levyn (levyjen) kuhunkin neljään syvennykseen.
- 5.2.6 Asetetaan 2 peitelasia (24 x 24 mm) kullekin objektilevyille siten, että väliin ei jää ilmaa. Laitetaan levyt esilämmitettyyn kosteaan kammioon ja hybridisoidaan yön yli pimeässä uunissa 55 °C:ssa.
- 5.2.7 Valmistetaan 3 dekantterilasista seuraavasti: 1 l ultrapuhdasta vettä (UPW), 1 l 1x hybmix-seosta (334 ml 3x hybmix-seosta ja 666 ml UPW) ja 1 l 1/2x hybmix-seosta (167 ml 3x hybmix-seosta ja 833 ml UPW). Esi-inkuboidaan kukin vesihauteessa 55 °C:ssa.
- 5.2.8 Poistetaan peitelasit objektilevyiltä ja asetetaan levyt levytelineeseen.
- 5.2.9 Poistetaan ylimääräinen koetin inkuboimalla 15 minuutin ajan 55 °C:ssa dekantterilasissa, jossa on 1x hybmix-seosta.



- 5.2.10 Siirretään levyteline 1/2 hybmix-seos -pesuliukseen ja inkuboidaan vielä 15 minuutin ajan.
- 5.2.11 Kastetaan objektilevyt pikaisesti ultrapuhtaaseen veteen ja asetetaan ne suodatinpaperille. Poistetaan liiallinen kosteus peittämällä pinta kevyesti suodatinpaperilla. Pipetoidaan 5–10 µl haalistumiselta suojaavaa peittäusainetta (esim. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA tai vastaavaa) jokaiseen syvennykseen ja asetetaan iso peitelasi (24 x 60 mm) koko levyn päälle.

### 5.3 FISH-testin lukeminen

- 5.3.1 Tutkitaan objektilevyt välittömästi mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä öljyimmissio-objektiivin 630–1 000-kertaisella suurennoksella. FITC:hen sopivilla suodattimilla näytteen eubakteerisolut (mukaan luettuina useimmat gram-negatiiviset solut) fluoresoivat vihreinä. Kun käytetään tetrametyylirodamiini-5-isotiosyanaatille tarkoitettua suodatinta, Cy3-värjätyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solut näkyvät fluoresoivan punaisina. Verrataan solujen morfologiaa positiivisten kontrollien morfologiaan. Solujen on oltava kirkkaasti fluoresoivia ja täysin värjäytyneitä. FISH-testi (9.4 jakso) on toistettava, jos värjäytyminen ei ole täydellistä. Tarkastellaan objektikenttää laidasta laitaan pystysuoraan ja vaakasuoraan ja kiertämällä ulkoreunaa pitkin. Näytteistä, joissa ei näy yhtään tai vain hyvin vähän soluja, tarkastellaan vähintään 40 mikroskooppikenttää.
- 5.3.2 Tarkoituksena on löytää kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)). Fluoresenssin intensiteetin on vastattava vähintään positiivisen kontrollikannan fluoresenssin intensiteettiä. Sellaisia soluja, joiden värjäytyminen on epätäydellistä tai joiden fluoresenssi on heikko, ei oteta huomioon.
- 5.3.3 Jos epäillään kontaminaatiota, testi on toistettava. Näin saattaa käydä, jos kaikilla erän objektilevyillä on positiivisia soluja puskurin kontaminaation vuoksi tai jos positiivisia soluja löytyy (levyn syvennyksen ulkopuolelta) levyn pinnoitteelta.
- 5.3.4 FISH-testin spesifisyyteen liittyy useita ongelmia. Perunan napapäiden ja varren palasten sakassa saattaa esiintyä morfologisesti epätyypillisiä fluoresoivien solujen ja *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kanssa kooltaan ja morfologialtaan samanlaisten ristiin reagoivien saprofyttisten bakteerien populaatioita vaikkakin huomattavasti harvemmin kuin IF-testissä.
- 5.3.5 Tarkastellaan ainoastaan fluoresoivia soluja, joilla on tyypillinen koko ja morfologia, ks. 5.3.2 kohta.
- 5.3.6 FISH-testin tulosten tulkinta:
- i) FISH-testistä saadaan validit tulokset, jos FITC-suodatinta käyttäen havaitaan kirkkaan vihreitä fluoresoivia soluja, joiden koko ja morfologia on *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille tyypillinen, ja jos rodamiinisuo-datinta käyttäen havaitaan kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja kaikissa positiivisissa kontrolleissa muttei yhdessäkään negatiivisissa kontrolloissa. Jos näytteestä löytyy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, tyypillisten solujen keskimääräinen lukumäärä arvioidaan mikroskooppikenttää kohden ja lasketaan näiden solujen lukumäärä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden (lisäys 4). Näytteitä, joissa on vähintään  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, pidetään mahdollisesti saastuneina. Lisättestaus on tarpeen. Näytteitä, joissa on vähemmän kuin  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, pidetään negatiivisina.
  - ii) FISH-testin tulos on negatiivinen, jos rodamiinisuo-datinta käyttäen ei havaita kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja, joiden koko ja morfologia on *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille tyypillinen edellyttäen, että tyypillisiä kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja havaitaan positiivisissa kontrollivalmisteissa silloin, kun käytetään rodamiinisuo-datinta.

## 6. PCR-TESTI

### Periaatteet

Kun PCR-testiä käytetään pääasiallisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, toisena pakollisena seulontatestinä on tehtävä IF-testi. Kun PCR-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, vuokaavion mukainen lisättestaus on tarpeen diagnoosin tekemiseksi.

Tätä menetelmää on suositeltavaa käyttää pääasiallisena seulontatestinä ainoastaan, jos käytettävissä on sen tekemiseen vaadittavaa erityisasiantuntemusta.

**Huom.**

Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteutettiin lisätyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solut ( $10^3$ – $10^4$ /ml). Testi on voitava toistaa. Optimointikokeet saattavat olla tarpeen herkkyyden ja spesifisyyden maksimoimiseksi kaikissa laboratorioissa.

Käytetään validoituja PCR-reagensseja ja -testausprotokollia. Olisi mielellään valittava menetelmä, johon kuuluu sisäinen kontrolli.

On toteutettava tarkoituksenmukaisia varotoimia, jotta vältetään näytteen kontaminaatio kohde-DNA:lla. PCR-testi olisi annettava kokeneiden teknikoiden toteutettavaksi erikoistuneissa molekyylibiologian laboratorioissa, jotta minimoidaan näytteen mahdollinen kontaminaatio kohde-DNA:lla.

Negatiivisia kontrolleja (DNA:n uuttamis- ja PCR-menettelyjen osalta) olisi aina käsiteltävä menettelyn lopullisina näytteinä, jotta voitaisiin osoittaa selvästi, onko DNA:n siirtymistä tapahtunut.

PCR-testiin olisi sisällytettävä seuraavat negatiiviset kontrollit:

- näyteute, joka on aiemmin testattu *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin suhteen negatiiviseksi,
- kontrollipuskurit, joita käytetään bakteerin ja DNA:n uuttamiseksi näytteestä,
- PCR-reaktioseos.

Testissä olisi käytettävä seuraavia positiivisia kontrolleja:

- uudelleen suspendoitujen sakkujen määräosat, joihin *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri on lisätty (valmistus ks. lisäys 2),
- vesisuspensio *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin virulentista isolaatista (esim. NCPPB 2140 tai NCPPB 4053) saaduista soluista ( $10^6$ /ml),
- jos mahdollista, PCR-testissä käytetään myös positiivisista kontrollinäytteistä saatua DNA:ta.

*Mahdollisen kontaminaation välttämiseksi positiiviset kontrollit valmistetaan erillään testinäytteistä.*

Näyteutteidien olisi oltava mahdollisimman puhtaita mullasta. Joissakin tapauksissa saattaisi siksi olla suositeltavaa valmistaa uutteet pestyistä perunoista, mikäli aiotaan käyttää PCR-testausprotokollia.

## 6.1 DNA:n puhdistusmenetelmät

Käytetään edellä kuvattuja negatiivisia ja positiivisia kontrollinäytteitä.

Valmistetaan kontrollimateriaali samalla tavalla kuin näyte (näytteet).

Kohde-DNA:n eristämiseksi kompleksisista näytemateriaaleista on käytettävissä useita eri menetelmiä, joilla voidaan poistaa PCR:n ja muiden entsyymireaktioiden inhibiittorit ja konsentroida kohde-DNA näyteutteen.

Seuraava DNA:n puhdistusmenetelmä on optimoitu käytettäväksi lisäyksessä 6 kuvatun validoidun PCR-menetelmän yhteydessä.

### 6.1. a) Pastrikin menetelmä (2000)

1. Pipetoidaan 220 µl lyysipuskuria (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen.
2. Lisätään 100 µl näyteutetta ja asetetaan kuumentimelle tai vesihauteeseen 95 °C:ssa 10 minuutin ajaksi.
3. Siirretään putki jäihin 5 minuutiksi.
4. Lisätään 80 µl lysosyymikantaliuosta (50 mg lysosyymia/ml 10 mM Tris HCl:ssa, pH 8,0) ja inkuboidaan 37 °C:ssa 30 minuutin ajan.
5. Lisätään 220 µl Easy DNA<sup>®</sup> -liuosta A (Invitrogen), sekoitetaan hyvin vorteksoimalla ja inkuboidaan 65 °C:ssa 30 minuutin ajan.

6. Lisätään 100 µl Easy DNA<sup>®</sup> -liuosta B (Invitrogen), vorteksoidaan voimakkaasti, kunnes sakka valuu putkessa vapaasti ja näyte on kauttaaltaan yhtäläisen viskoosi.
7. Lisätään 500 µl kloroformia ja vorteksoidaan, kunnes viskositeetti vähenee ja seos on homogeeninen.
8. Sentrifugoidaan 15 000 x g 20 minuutin ajan 4 °C:ssa faasien erottamiseksi ja interfaasin muodostamiseksi.
9. Siirretään yläfaasi puhtaaseen Eppendorf-putkeen.
10. Lisätään 1 ml 100 % etanolia (– 20 °C), vorteksoidaan pikaisesti ja inkuboidaan jäissä 10 minuutin ajan.
11. Sentrifugoidaan 15 000 x g 20 minuutin ajan 4 °C:ssa ja poistetaan etanoli pelletistä.
12. Lisätään 500 µl 80 % etanolia (– 20 °C) ja sekoitetaan kääntelemällä putkea.
13. Sentrifugoidaan 15 000 x g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa, säästetään pelletti ja poistetaan etanoli.
14. Annetaan pelletin kuivua ilmassa tai DNA Speed Vac -laitteessa.
15. Suspendoidaan pelletti uudelleen 100 µl:aan steriiliä ultrapuhdasta vettä ja jätetään seisomaan huoneenlämpöön vähintään 20 minuutin ajaksi.
16. Varastoidaan – 20 °C:ssa, kunnes näytettä tarvitaan PCR-testissä.
17. Erotetaan mahdollinen valkea sakka sentrifugoimalla, ja PCR-määrittelyyn käytetään 5 µl DNA:ta sisältävää liuosta.

#### 6.1. b) Muut menetelmät

Muita DNA:n uuttamismenetelmiä (esim. Qiagen Dneasy Plant Kit) voidaan käyttää, mikäli niiden on osoitettu olevan yhtä tehokkaita DNA:n puhdistamisessa kontrollinäytteistä, jotka sisältävät  $10^3$ – $10^4$  taudinaiheuttajasolua/ml.

#### 6.2 PCR-testi

- 6.2.1 Valmistetaan PCR-testin testi- ja kontrollitemplaattit validoidun testausprotokollan mukaisesti (lisäys 6). Valmistetaan kymmenkertainen laimennos DNA-näyteutetta (1:10 ultrapuhtaaseen veteen).
- 6.2.2 Valmistetaan tarkoituksenmukainen PCR-reaktioseos julkaistun testausprotokollan mukaisesti (lisäys 6) kontaminaatiolta vapaassa ympäristössä. Validoidussa PCR-testausprotokollassa määrittely perustuu moninkertaiseen, jatkuvasti toistettavaan reaktioon, ja siinä on mukana myös sisäinen PCR-kontrolli.
- 6.2.3 Lisätään 5 µl DNA-utetta 25 µl:aa PCR-reaktioseosta kohden steriileihin PCR-putkiin.
- 6.2.4 Otetaan ainoastaan PCR-reaktioseosta sisältävä negatiivinen kontrollinäyte ja lisätään näytteen paikalle ultrapuhdasta vettä samasta lähteestä, jota käytettiin PCR-seoksessa.
- 6.2.5 Asetetaan putket samaan lämpösyklilaitteeseen, jota käytettiin esitestauksessa, ja ajetaan asianmukaisesti optimoitu PCR-ohjelma (lisäys 6).

#### 6.3 PCR-tuotteen määrittäminen

- 6.3.1 Erotetaan PCR-amplikonit agarosigelelektroforeesilla. Lisätään vähintään 12 µl monistettua DNA-reaktioseosta kustakin näytteestä 3 µl:aan latauspuskuriin (lisäys 6) 2,0 % (w/v) agarosigeelissä trisetaatti-EDTA-puskurissa (TAE) (lisäys 6) ja ajetaan geelissä 5–8 V/cm. Käytetään tarkoituksenmukaista DNA-markkeria, esim. 100 emäsparia.
- 6.3.2 Saatetaan DNA-fragmentit näkyviin värjäämällä näyte etidiumbromidiliuoksessa (0,5 mg/L) 30–45 minuutin ajan huolehtien asianmukaisista varotoimista tämän mutageenin käsittelyssä.
- 6.3.3 Tarkastellaan värjäytynyttä geeliä UV-läpivalaisulla (esim.  $\lambda = 302$  nm) odotetunkokoisten monistettujen PCR-tuotteiden (lisäys 6) löytämiseksi ja dokumentoidaan tiedot.

- 6.3.4 Kaikkien uusien löydösten/tapausten osalta varmistetaan PCR-amplikonin autenttisuus tekemällä restriktioentsyymianalyysi jäljellä olevan monistetun DNA:n näytteelle inkuboimalla optimilämpötilassa ja -ajassa tarkoituksenmukaisella entsyymillä ja puskurilla (ks. lisäys 6). Erotetaan pilkotut fragmentit agarosigelelektrofereesillä kuten edellä ja tarkkaillaan tyypillistä restriktiofragmenttikuviota UV-läpivalaisulla etidiumbromidivärjäyksen jälkeen ja verrataan pilkkoutumattomiin ja pilkottuihin positiivisiin kontrolleihin.

PCR-testin tulosten tulkinta:

PCR-testin tulos on negatiivinen, jos odotetunkokoista *C. m. subsp. sepedonicus* -spesifistä PCR-amplikonkia ei todeta kyseisestä näytteestä, mutta se todetaan kaikista positiivisista kontrollinäytteistä (kun on kyse moninkertaisista PCR-tuotteista, joilla on kasveille spesifiset sisäiset kontrollialukkeet: toinen odotetunkokoinen PCR-tuote on monistettava kyseisellä näytteellä).

PCR-testin tulos on positiivinen, jos odotetunkokoinen *C. m. subsp. sepedonicus* -spesifinen PCR-amplikoni ja odotettu restriktiokuvio (jos sellaista vaaditaan) todetaan edellyttäen, että sitä ei ole monistettu mistään negatiivisesta kontrollinäytteestä. Positiivisen tuloksen luotettava varmistus voidaan saada myös toistamalla testi toisilla PCR-alukkeilla (9.3 jakso).

Huom.

PCR:n inhibitiota voidaan epäillä, jos odotettu amplikoni saadaan positiivisesta kontrollinäytteestä, joka sisältää *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria vedessä, mutta negatiiviset tulokset saadaan positiivisista kontrolleista, jotka sisältävät *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria perunauutteessa. Moninkertaisten reaktioiden määrittämiseen perustuvissa PCR-testausprotokollissa, joissa on mukana sisäinen PCR-kontrolli, reaktion inhibitiota näyttää olevan kyseessä silloin, jos ei saada kumpaakaan näistä kahdesta amplikonista.

Saastunutta voidaan epäillä, jos odotettua amplikonkia ei saada yhdestä tai useammasta negatiivisesta kontrollista.

## 7. BIOLOGINEN MÄÄRITYS

Huom.

Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteuutteisiin lisätyt *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin pesäkkeitä muodostavat yksiköt ( $10^3$ – $10^4$ /ml) (valmistus ks. lisäys 2). Testi on voitava toistaa.

Suurinta toteamisherkkyyttä voidaan odottaa, kun käytetään vasta valmistettua näyteuutetta optimaalisissa kasvuolosuhteissa. Menetelmää voidaan kuitenkin käyttää menestyksekkäästi myös sellaisiin uutteisiin, joita on varastoitu glyserolissa – 68 ja – 86 °C:n välisessä lämpötilassa.

Jotkin munakoisolajikkeet tarjoavat erinomaisen valikoivan rikastusalustan *C. m. subsp. sepedonicus* -viljelmälle silloinkin, kun oireita ei esiinny, ja niitä isäntäkasvina käyttäen voidaan myös toteuttaa erinomainen varmistustesti.

Kasvatusolosuhteiden olisi oltava optimaaliset väärin negatiivisten testitulosten riskin pienentämiseksi.

Viljelyn yksityiskohdista tarkemmin ks. lisäys 8.

- 7.1 Jaetaan koko 3.1.6 tai 3.2.5 jaksosta jäljellä oleva uudelleen suspendoidun sakan testattava osa munakoisokasvien kesken yhdellä jäljempänä kuvatuista menetelmistä (7.3 tai 7.4). Käytetään ainoastaan 2–3-lehtiasteella aina kolmannen aitolehden täyteen kasvuvaiheeseen olevia kasveja. Jotta varmistetaan uudelleen suspendoidun sakan käyttö kokonaisuudessaan ja tehokas inokulointi, jäljempänä kuvattuihin menettelyihin on käytettävä 15–25 munakoisoa näyttää kohden.
- 7.2 Munakoisoja ei kastella inokulointia edeltävien 1–2 vuorokauden aikana, jotta nestejännitys vähenisi.
- 7.3 Inokulointi viiltämällä
- 7.3.1 Pidellään kasvia kahden sormen välissä ja tiputetaan pipetillä pisara (noin 5–10 µl) suspendoitua sakkaa varren päälle sirkkalehtien ja ensimmäisen kasvulehden väliin.
- 7.3.2 Tehdään steriilillä leikkausveitsellä sakan pisarasta lähtien vinosti poikittainen noin 1 cm:n viilto, jonka syvyys on noin kaksi kolmannesta varren paksuudesta.
- 7.3.3 Suljetaan viilto steriilillä vaseliinilla ruiskua käyttäen.

## 7.4 Inokulointi injektoimalla

Inokulointi tehdään ruiskulla, joka on varustettu hypodermisellä neulalla (vähintään 23G), munakoison varsiin juuri sirkkalehtien yläpuolelle. Näyte levitetään munakoisojen väliin.

7.5 Positiivisina kontrolleina inokuloidaan samalla tekniikalla (7.3 tai 7.4) 5 kasvia vesisuspensiolla, jossa on  $10^5$ – $10^6$  solua/ml tunnetusta *C. m. subsp. sepedonicus* -viljelmästä, ja mahdollisuuksien mukaan luonnollisesti saastuneella mukulasolukolla (ks. 4 jakso).

7.6 Negatiivisena kontrollina inokuloidaan samalla tekniikalla (7.3 tai 7.4) 5 kasvia steriilillä sakkapuskurilla.

7.7 Inkuboidaan kasveja karanteenitiloissa enintään 4 viikon ajan 18–24 °C:ssa. Inkuboidaan kasveja riittävässä valossa ja korkeassa kosteuspitoisuudessa (70–80 %), ja annetaan niille vettä siten, että estetään vettäytymisen tai veden puutteesta johtuva lakastuminen. *C. m. subsp. sepedonicus* -solut kuolevat 30 °C:ta korkeammissa lämpötiloissa, ja optimaalinen lämpötila on 21 °C. Saastunnan välttämiseksi inkuboidaan positiiviset ja negatiiviset kontrollikasvit selkeästi toisistaan erotettuihin penkkeihin kasvihuoneessa tai kasvatuskammioissa tai, jos tilaa on rajoitetusti, huolehditaan siitä, että käsittelyt tehdään tiukasti toisistaan erillään. Jos eri näytteisiin kuuluvat kasvit on inkuboitava lähelle toisiaan, ne on eroteltava asianmukaisilla suojilla. Lannoitettaessa, kasteltaessa tai tutkimuksia ja muita toimenpiteitä tehtäessä on huolellisesti vältettävä ristikontaminaatio. Kasvihuoneisiin ja kasvatuskammioihin ei ehdottomasti saa päästä mitään hyönteistuholaisia, sillä ne saattavat siirtää bakteeria näytteestä toiseen.

7.8 Viikon kuluttua on säännöllisesti alettava tutkia oireita. Lasketaan, kuinka monessa kasvissa esiintyy oireita. *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri aiheuttaa munakoisolla lehtien lakastumista, joka voi alkaa lehtenreunojen tai lehtisuonien välisen osan velttoutuena. Aluksi lakastunut solukko voi muuttua tummanvihreäksi tai täplikkääksi, mutta se vaalenee ennen kuin se muuttuu nekroottiseksi. Lehtisuonien välinen lakastuminen näyttää usein rasvaiselta ja turvonneelta. Nekroottisissa solukossa on usein kirkkaan keltainen reuna. Kasvit eivät välttämättä kuole. Mitä pitemmälle oireiden esiintyminen viivästyy, sitä suurempi mahdollisuus kasveilla on jäädä henkiin. Kasvit voivat selvitä tartunnasta. Nuoret munakoisot reagoivat paljon voimakkaammin heikkoihin *C. m. subsp. sepedonicus* -populaatioihin kuin vanhemmat kasvit, mikä selittää sen, että on tarpeen käyttää kolmilehtiasteella olevia tai sen lähes saavuttaneita kasveja.

Lakastuminen voi myös olla muiden mukulasolukon sakassa esiintyvien bakteerien tai sienten populaatioiden aiheuttamaa. Näitä ovat *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ja *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata* sekä saprofytyttisten bakteerien suuret populaatiot. Erityisesti *Erwinia chrysanthemi* voi aiheuttaa *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin aiheuttamien oireiden kaltaisia oireita lehdissä ja lakastumista. Ainoa ero on se, että *Erwinia chrysanthemi* -tartunta aiheuttaa varren mustumisen. Muut lakastumiset erotuvat *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin aiheuttamista lakastumisista, koska niissä kokonaiset lehdet tai kasvit kuihtuvat nopeasti. On myös mahdollista tehdä Gram-värjäys: tällä testillä voidaan erottaa *C. m. subsp. sepedonicus* ja *Erwinia* spp.

7.9 Heti kun munakoisoissa havaitaan oireita, eristäminen olisi tehtävä uudelleen käyttäen osia lakastuneesta lehtisolukosta tai kasvien varsisolukosta (ks. 3.1.3 solukon murskaaminen). Desinfioidaan munakoisojen lehtien ja varsien pinta pyyhkimällä ne 70 % etanolilla. Tehdään IF- tai PCR-testi munakoison nesteelle ja eristetään sopivalle (valikoivalle) alustalle (ks. 8 jakso). Lisäksi voidaan tehdä Gram-värjäys (lisäys 9). Tunnistetaan oletetun *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin puhdistetut viljelmät ja varmistetaan patogeneisyys (ks. 9 ja 10 jakso).

7.10 Tietyissä olosuhteissa erityisesti, jos kasvuolosuhteet eivät ole optimaaliset, *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria voi esiintyä piilevänä tartuntana munakoisoissa jopa 4 viikon mittaisen inkubaatiojakson jälkeen. Jos 4 viikon jälkeen ei havaita oireita, tehdään IF- tai PCR-testi kokoomanäytteelle, jossa on kustakin testikasvista 1 cm:n mittaisia varren palasia, jotka on otettu inokulointipaikan yläpuolelta. Jos testituloksella on positiivinen, eristäminen olisi tehtävä uudelleen sopivalle (valikoivalle) alustalle 8 jaksossa kuvatun menetelyn mukaisesti. Tunnistetaan oletetun *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin puhdistetut viljelmät ja varmistetaan patogeneisyys (ks. 9 ja 10 jakso).

## Biologisen määrittelyn tulosten tulkinta

Biologisesta määrittämisestä saadaan validit tulokset, jos positiivisen kontrollin kasveissa näkyy tyypillisiä oireita, bakteerit voidaan eristää uudelleen näistä kasveista ja negatiivisista kontrolleista ei löydy oireita.

Biologisen määrittämismenetelmän tulos on negatiivinen, jos testikasveissa ei ole *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin aiheuttamaa tartuntaa edellyttäen, että *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri todetaan positiivisista kontrolleista.

Biologisen määrittämismenetelmän tulos on positiivinen, jos testikasveissa on *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin aiheuttama tartunta.

8. C. M. SUBSP. *SEPEDONICUS* -BAKTEERIN ERISTÄMINEN

*Huom.*

Diagnoosi voidaan tehdä ainoastaan eristämällä ja tunnistamalla *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri (ks. 9 jakso) ja varmistamalla tämä patogeenisyydestillä (10 jakso). Vaikka on kyse vaikeasti eristettävästä organismista, se on mahdollista eristää solukosta, jossa esiintyy saastunnan oireita.

Nopeasti kasvavat saprofyttiset bakteerit saattavat kuitenkin tukahduttaa bakteerin, ja tämän vuoksi eristäminen suoraan mukulan tai varren solukon sakasta (3.1.6 tai 3.2.5 jakso) on vaikeaa. Jos käytetään valikoivaa alustaa ja tarkoituksenmukaista perunoiden napapäistä tai varsista saadun uudelleen suspendoidun sakan laimennosta, *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin suora eristäminen saattaa olla mahdollista.

Eristäminen tehdään kaikista perunan mukuloista tai varren palasista, joissa on oireita, ja munakoisoista, joissa ei havaita oireita mutta joiden kokoomänäytteelle tehdystä IF- tai PCR-testistä on saatu positiivinen tulos (ks. 7.10 jakso). Tarvittaessa munakoisojen varret on murskattava 3.1.3 kohdassa kuvattua menetelmää noudattaen.

Positiivisiksi kontrolleiksi valmistetaan kymmenkertaiset laimennokset suspensiosta, jossa on  $10^6$  PMY/ml *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeria (esim. NCPPB 4053 tai PD 406). Mahdollisen kontaminaation välttämiseksi positiiviset kontrollit on valmistettava täysin erillään testinäytteistä.

Ennen kuin vasta valmistettua valikoivan alustan erää käytetään rutiinäytteiden testaamiseen, olisi testattava sen soveltuvuus taudinaiheuttajan kasvattamiseen.

Kontrollimateriaali testataan samalla tavalla kuin näyte (näytteet).

8.1 **Valikoiva maljaus**

8.1.1 Valmistetaan kymmenkertaisia laimennoksia uudelleen suspendoidun perunasakkanäytteen tai munakoisonesteen määräosasta (100 µl) sakkapuskuriin (lisäys 3).

8.1.2 Eristäminen laimentamattomasta perunasakasta tavallisesti epäonnistuu, koska *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kasvatus on vaikeaa ja koska saprofyytit kilpailevat sen kanssa. Koska bakteeria esiintyy tavallisesti suurina populaatioina tartunnan saaneissa solukoissa, saprofyytit voidaan tavallisesti laimentaa pois siten, että taudinaiheuttaja jää jäljelle. Tämän vuoksi on suositeltavaa levittää 100 µl kustakin näytteestä (1:100–1:10 000-kertaisina laimennoksina) MTNA-alustalle tai NCP-88-alustalle (lisäys 5) (jos käytetään halkaisijaltaan 90 mm:n suuruista petrimaljaa, tilavuutta on mukautettava maljan koon mukaan) käyttäen levittämiä ja pintalevitystekniikkaa.

*Huom.*

Vaihtoehtoisesti voidaan levittää alkuperäinen perunasakka (100 µl) ensimmäiselle agar-alustalle levittimellä ja siirtää sitten levitin toiselle agar-alustalle sivelemällä sille levittimeen jäänyt osa; lopuksi sama toistetaan kolmannella alustalla. Näin levittimellä saadaan aikaan laimennusvaikutus.

8.1.3 Inkuboidaan maljoja pimeässä 21–23 °C:ssa.

8.1.4 Maljojen alustava tarkastelu, kontrollimaljoihin verrattuna, tehdään laskemalla *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin kaltaiset pesäkkeet 3 päivän kuluttua. Lisäksi ne lasketaan 5 ja 7 ja lopuksi 10 päivän kuluttua.

8.2 **Epäilyttävien pesäkkeiden puhdistaminen**

*Huom.*

*C. m. subsp. sepedonicus* -kaltaisten pesäkkeiden jatkoviljely olisi tehtävä YGM-alustalle munakoisoinokulaatiota ja/tai myöhempää tunnistamista varten; tämä olisi tehtävä ennen kuin maljoihin syntyy liikaa kasvustoa eli mielellään 3–5 päivän kuluttua.

8.2.1 Sivellään *C. m. subsp. sepedonicus* -kaltaisia pesäkkeitä yhdelle seuraavista alustoista (kaavat esitetään lisäyksessä 5):

dekstroosiravintoagar (ainoastaan jatkoviljelyyn),

hiiva-peptoni-glukoosiagar,

hiivauute- ja mineraalisuola-agar.

Annetaan inkuboitua enintään 10 päivää 21–24 °C:ssa.

*C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri kasvaa hitaasti ja tuottaa tavallisesti 10 päivässä neulanpään kokoisia ja muotoisia, kermanvärisiä, kuperia pesäkkeitä. (Valokuvia *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin tyypillisistä pesäkkeistä, ks. www-sivusto osoitteessa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

#### 8.2.2 Levitetään uudelleen juovina puhtaiden viljelmien saamiseksi.

Kasvu nopeutuu jatkoviljelyllä. Tyypilliset pesäkkeet ovat väriltään kermanvalkoisia tai norsunluunvärisiä, toisinaan keltaisia, pyöreitä, sileitä, kohoavia, kuperia, rakenteeltaan limaisesta nestemäiseen, reunoiltaan säännöllisen muotoisia ja halkaisijaltaan yleensä 1–3 mm.

Yksinkertainen Gram-värjäys (lisäys 9) saattaa auttaa valitsemaan pesäkkeet lisätesteihin.

#### 8.2.3 Tunnistetaan oletetut viljelmät (ks. 9 jakso) ja tehdään patogeenisyydesti (ks. 10 jakso).

### 9. TUNNISTAMINEN

Tunnistetaan oletettujen *C. m. subsp. sepedonicus* -isolaattien puhtaat viljelmät käyttäen ainakin kahta seuraavista eri biologisiin periaatteisiin perustuvista testeistä.

Sisällytetään tarvittaessa tunnetut vertailukannat kuhunkin testiin.

#### 9.1 Ravintokokeet ja entsyymaattiset tunnistustestit

Määritetään seuraavat fenotyypiset ominaisuudet, jotka yleisesti joko esiintyvät *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerissa tai puuttuvat siitä. Käytetään seuraavissa lähteissä kuvattuja menetelmiä: Lelliott ja Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), nimetön (1987).

Kaikki alustat olisi inkuboitava 21 °C:ssa ja tutkittava 6 päivän jälkeen. Jos minkäänlaista kasvua ei havaita, annetaan inkuboitua 20 päivään saakka.

Kuhunkin testiin on kuuluttava tunnettu *C. m. subsp. sepedonicus* -kanta vertailua varten. Ravintokokeet ja fysiologiset kokeet on tehtävä inokulaatilla, joka on lähtöisin ravintoagarliukseen uudelleen istutetuista viljelmistä. Morfologiset vertailut on tehtävä dekstroosiravintoagarissa kasvatetuista viljelmistä.

Testit	Tavoiteltavat tulokset
hapettumis-/käymistesti (O/F)	Inerti tai heikosti hapettava
oksidaasiaktiivisuus	–
kasvu 37 °C:ssa	–
ureaasiaktiivisuus	–
eskuliinin hydrolyysi	+
tärkkelyshydrolyysi	– tai heikko
7 % natriumkloridiliuoksen sietokyky	–
indolituotanto	–
katalaasiaktiivisuus	+
H <sub>2</sub> S:n tuotanto	–
sitraatin käyttö	–
gelatiinin nesteytyminen	–
hapan glyseroli	–
hapon muodostus laktoosista	– tai heikko
hapon muodostus ramnoosista	–
hapon muodostus salisiinista	–
Gram-värjäys (lisäys 9)	+

## 9.2 Immunofluoresenssitesti (IF)

- a) Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) IF-puskuriin (lisäys 3).
- b) Valmistetaan kaksinkertaisia laimennoksia tarkoituksenmukaisesta antiseerumista.
- c) Tehdään IF-testi (4 jakso).
- d) IF-testistä saadaan positiivinen tulos, jos viljelmän IF-titteri vastaa positiivisen kontrollin titteriä.

## 9.3 PCR-testi

- a) Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) ultrapuhtaaseen veteen.
- b) Kuumennetaan 100 µl solususpensiota suljetuissa putkissa kuumentimessa tai kiehvassa vesihautteessa 100 °C:ssa 4 minuutin ajan. Tarvittaessa solujen hajoamista voidaan auttaa lisäämällä vasta valmistettua NaOH:ta 0,05 M:n loppupitoisuuden saavuttamiseksi. Näytteet voidaan varastoida – 16 ja – 24 °C:n välisessä lämpötilassa, kunnes niitä tarvitaan.
- c) Sovelletaan tarkoituksenmukaisia PCR-menettelyjä *C. m. subsp. sepedonicus* -spesifisten amplikonien monistamiseksi (esim. Pastrok, 2000; ks. lisäys 4; Li ja de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrok ja Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
- d) *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin positiivinen tunnistus toteutuu, jos PCR-amplikonit ovat samankokoisia kuin positiivisen kontrollikannan amplikonit ja niillä esiintyy samaa restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa.

## 9.4 FISH-testi

- a) Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) ultrapuhtaaseen veteen.
- b) Tehdään FISH-testi (5 jakso).
- c) FISH-testistä saadaan positiivinen tulos, jos viljelmästä ja positiivisesta kontrollista saadaan samat reaktiot.

## 9.5 Rasvahappoprofilointi (FAP)

- a) Kasvatetaan viljelmä tryptikaasi-soija-agarissa (Oxoid) 72 tunnin ajan 21 °C:ssa (+/– 1°).
- b) Tehdään tarkoituksenmukainen FAP-testi (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) FAP-testistä saadaan positiivinen tulos, jos oletetun viljelmän profiili on identtinen positiivisen kontrollin profiilin kanssa. Tyypillisten rasvahappojen esiintyminen on seuraavanlainen: 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 ja 17:0 Anteiso. Tällainen profiili on erittäin vahva osoitus *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerista. Muillakin suvuilla, joista esimerkiksi *Curtobacterium*, *Arthrobacter* ja *Micrococcus*, on joitakin näistä hapoista. 15:1 Anteiso A on kuitenkin harvinainen happo näissä bakteereissa mutta esiintyy kaikissa *Clavibacter* spp. -bakteereissa 1–5 prosentin pitoisuuksina. *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerissa tämä arvo on tavallisesti noin 5 prosenttia.

## 9.6 BOX-PCR-testi

- a) Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) ultrapuhtaaseen veteen.
- b) Tehdään menettelyn mukainen testi (Smith *et al.*, 2001).

## 10. VARMISTUSTESTI

Patogeenisyystesti on tehtävä *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin diagnosoinnin lopulliseksi varmistamiseksi ja *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeriksi tunnistettujen viljelmien virulenssin arvioimiseksi.

- 10.1 Valmistetaan inokulaatti (noin  $10^6$  solua/ml) testattavan isolaatin 3 päivän viljelmistä ja *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin asianmukaisesta positiivisesta kontrollikannasta.



- 10.2 Inkuloidaan 5–10 kolmilehtiasteella olevaa nuoren munakoisosokasvin vartta (7.3 tai 7.4 jakso).
- 10.3 Inkuboidaan 18–24 °C:ssa riittävässä valossa ja korkeassa suhteellisessa kosteuspitoisuudessa ja annetaan asianmukaisesti vettä vettymisen tai kuivuusstressin estämiseksi (7.7 jakso). Puhtailla viljelmillä tyypillisen lakastumisen olisi ilmaannuttava 2 viikossa, mutta niillä kasveilla, joilla ei esiinny oireita tämän ajanjakson päätyttyä (ks. 7.8 jakso), tulisi jatkaa inkubointia 3 viikkoon saakka lämpötiloissa, jotka ovat suotuisat munakoison kasvulle mutta eivät ylitä 25 °C:ta (lisäys 8). Jos oireita ei ole ilmaantunut 3 viikon jälkeen, ei voida vakuuttua siitä, että olisi kyse *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin patogeenisen muodon viljelmästä.
- 10.4 Näyte eristetään kasveista, joilla esiintyy oireita, poistamalla pätkä varresta 2 cm inokulaatiokohdan yläpuolelta. Näyte pilkotaan ja suspendoidaan pieneen määrään steriiliä tislattua vettä tai 50 mM fosfaattipuskuria (lisäys 3). Eristetään suspensiosta levittämällä laimennos tai sivelemällä MTNA- tai YPGA-alustalle (lisäys 5), inkuboidaan 3–5 päivän ajan 21–23 °C:ssa ja tutkitaan, muodostuuko siihen *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä.

## Lisäys 1

## Testausprotokollien optimoinnissa ja validoinnissa mukana olevat laboratoriot

Laboratorio <sup>(1)</sup>	Paikka	Maa
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien ja Linz	Itävalta
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Tanska
Central Science Laboratory	York	Englanti
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotlanti
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Ranska
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Ranska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Saksa
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Saksa
State Laboratory	Dublin	Irlanti
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Alankomaat
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norja
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugali
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenia
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Espanja

<sup>(1)</sup> Tiedemiesten yhteystiedot: ks. [www.sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

## Lisäys 2

**Positiivisten ja negatiivisten kontrollien valmistaminen napapäiden seulontatestejä PCR/IF ja FISH varten**

Tuotetaan 72 tunnin viljelmä virulentista *C. m. subsp. sepedonicus* -kannasta [NCPBP 4053 tai PD 406] MTNA-kasvualustalle ja suspendoidaan 10 mM fosfaattipuskuriin, jotta saataisiin solutiheydeksi noin  $1-2 \times 10^8$  PMY/ml. Tämä saadaan tavallisesti hieman samealla suspensiolla, joka vastaa 0,20:n optista tiheyttä 600 nanometrissä.

Poistetaan 200 mukulan napapäästä kappaleet, jotka on otettu valkokuorisesta osasta, jonka tiedetään olevan *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerista vapaa.

Käsitellään napapäät tavalliseen tapaan ja suspendoidaan sakka uudelleen 10 ml:aan.

Valmistetaan 10 steriiliä 1,5 ml:n mikroampullia, joissa on 900 µl uudelleen suspendoitua sakkaa.

Siirretään 100 µl *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin suspensiosta ensimmäiseen mikroampulliin. Sekoitetaan vorteksilla.

Saastumisaste määritetään laimennussarjan (seuraavat 5 ampullia) avulla.

Kuutta mikroampullia, jotka sisältävät bakteerinäytettä, käytetään positiivisina kontrolleina. Neljää mikroampullia, jotka eivät sisällä bakteerinäytettä, käytetään negatiivisina kontrolleina. Ampullit merkitään vastaavasti.

Valmistetaan 100 µl:an osanäytteitä steriileihin 1,5 ml:n mikroampulleihin, jolloin saadaan 9 toisintoa kustakin kontrollinäytteestä. Varastoidaan  $-16$  ja  $-24$  °C:n välisessä lämpötilassa käyttöön saakka.

*C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin esiintyminen ja määrä kontrollinäytteissä olisi ensin varmistettava IF-testillä.

PCR-testiä varten uutetaan DNA positiivisista ja negatiivisista kontrollinäytteistä kunkin testisarjan yhteydessä.

IF- ja FISH-testejä varten tehdään määritykset positiivisista ja negatiivisista kontrollinäytteistä kullakin testinäytesarjalla.

IF-, FISH- ja PCR-määrityksissä *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteeri on osoitettava ainakin niistä positiivisista kontrolleista, joissa on  $10^6$  ja  $10^4$  solua/ml, eikä sitä saa esiintyä yhdessäkään negatiivisessa kontrollissa.

## Lisäys 3

**Puskuriliuokset testimenettelyihin**

YLEISTÄ: Avaamattomia steriloituja puskuriliuoksia voidaan säilyttää jopa vuoden ajan.

**1. Puskurit uuttamisenentelyä varten****1.1 Uuttopuskuri (50 mM fosfaattipuskuri, pH 7,0)**

Tätä puskuriliuosta käytetään bakteerin uuttamiseen kasvisolukoista homogenoimalla tai ravistamalla.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (vedetön)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Tislattua vettä	1,00 L

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Muita aineksia voidaan lisätä seuraavasti:

	Tavoite	Määrä (litraa kohden)
Lubrol-hiutaleita	Höytelöitymisenestoaine (*)	0,5 g
DC-silikoni-vaahdonesto	Vaahdonestoaine (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfaatti	Hapettumisenestoaine	1,0 g
Polyvinyylipyrrolidoni-40 000 (PVP-40)	PCR:n inhibiittorien sitomisaine	50 g

(\*) Käytetään homogenoimalla tapahtuvassa uuttamisenentelyssä.

**1.2 (Sakkapuskuri (10 mM fosfaattipuskuri, pH 7,2)**

Tätä puskuria käytetään perunan mukulan napapääuutteiden uudelleen suspendointiin ja laimentamiseen, kun ne on ensin konsentroidu sakaksi sentrifugoimalla.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Tislattua vettä	1,00 L

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

**2. Puskurit IF-testiä varten****2.1 IF-puskuri (10 mM fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,2)**

Tätä puskuria käytetään vasta-aineiden laimentamiseen.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Tislattua vettä	1,00 L

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

## 2.2 IF-puskuri-Tween

Tätä puskuria käytetään objektilevyjen pesuun.

Lisätään 0,1 % Tween 20:tä IF-puskuriin.

## 2.3 Fosfaattipuskuroitu glyseroli, pH 7,6

Tätä puskuria käytetään peittausliuoksena IF-levyjen syvennyksissä fluoresenssin tehostamiseksi.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glyseroli	50 ml
Tislattua vettä	100 ml

Haalistumiselta suojaavia peittausaineita on saatavana kaupallisesti, esim. Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories) tai Citifluor<sup>®</sup> (Leica).

## Lisäys 4

**Bakteerien määrän arvioiminen IF- ja FISH-testeillä**

1. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä kenttää kohden (c).
2. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä kuoppaa kohden (C).

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

jossa S = monikuoppatestilevyn yhden kuopan pinta ala

s = objektikentän pinta ala

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{jossa} \quad i = \text{kentän kerroin (8–24 okulaarin tyyppin mukaan)}$$

K = putken kerroin (1 tai 1,25)

G = objektiivin suurennos (100-kertainen, 40-kertainen jne.).

3. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohti (N):

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

jossa y = uudelleen suspendoidun sakan tilavuus kuopassa, ja

F = uudelleen suspendoidun sakan laimennuskerroin.

## Lisäys 5

**Kasvatusalustat *C. m. subsp. sepedonicus* -kasvintuhoojan eristämistä ja viljelyä varten**a) *Yleinen kasvatusalusta*

Ravinneagar (NA)

Ravinneagar (Difco)	23,0 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Dekstroosiravintoagar (NDA)

Difco Bacto -ravintoagar, joka sisältää 1 % d-glukoosia (monohydraatti). Steriloidaan autoklavoimalla 115 °C:ssa 20 minuutin ajan.

Hiiva-peptoni-glukoosiagar (YPGA)

Hiivauute (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptoni (Difco)	5,0 g
D(+)-glukoosi (monohydraatti)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Hiivauute- ja mineraalisuolakasvatusalusta (YGM)

Difco Bacton hiivauute	2,0 g
D(+)-glukoosi (monohydraatti)	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Bacto-Agar (Difco)	18 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan kasvatusalustaa 0,5 litran tilavuuksina autoklavoimalla 115 °C:ssa 20 minuutin ajan.

b) *Validoitu valikoiva kasvatusalusta*

MTNA-alusta

Ellei toisin mainita, kaikki alustan ainesosat ovat BDH:sta.

Hiivauute (Difco)	2,0 g
Mannitoli	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,015 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005 g
Agar (Oxoid nro 1)	16,0 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuetetaan ainesosat, säädetään pH arvoon 7,2. Autoklavoinnin (121 °C:ssa 15 minuutin ajan) ja 50 °C:een jäädyttämisen jälkeen, lisätään antibiootit: trimetopriimiä 0,06 g, nalidiksiinihappoa 0,002 g, amfoterisiini B:tä 0,01 g.

Antibioottikantaliuokset: trimetopriimi (Sigma) ja nalidiksiinihappo (Sigma) (molemmat 5 mg/ml) 96 % metanolissa, amfoterisiini B (Sigma) (1 mg/ml) dimetyylisulfoksidissa. Kantaliuokset suodatinsterialoidaan.

*Huom.*

Kasvatusalustan säilyvyys on 3 kuukautta. Antibioottien lisäämisen jälkeen säilyvyys on 1 kuukausi, kun alusta säilytetään kylmässä.

NCP-88 -alusta

Ravinneagar (Difco)	23 g
Hiiuvauute (Difco)	2 g
D-mannitoli	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuetetaan ainesosat, säädetään pH arvoon 7,2. Autoklavoinnin ja 50 °C:een jäädyttämisen jälkeen, lisätään seuraavat antibiootit: polymyksiini-B-sulfaatti (Sigma) 0,003 g, nalidiksiinihappo (Sigma) 0,008 g, sykloheksimidi (Sigma) 0,2 g.

Liuetetaan antibiootit kantaliuoksiin seuraavasti: nalidiksiinihappo 0,01 M NaOH:hon, sykloheksimidi 50 % etanoliin, polymyksiini-B-sulfaatti tislattuun veteen. Kantaliuokset suodatinsterialoidaan.

*Huom.*

Kasvatusalustan säilyvyys on 3 kuukautta. Antibioottien lisäämisen jälkeen säilyvyys on 1 kuukausi, kun alusta säilytetään kylmässä.

## Lisäys 6

## Validoitu PCR-testausprotokolla ja -reagenssit

## Huom.

Alustavan testauksen pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta vähintään  $10^3$ – $10^4$  *C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin solua näyteuutteen millilitraa kohden. Testi on voitava toistaa.

Alustavassa testauksessa ei myöskään pitäisi näkyä vääriä positiivisia tuloksia valikoiduilla bakteerikannoilla.

1. **Moninkertaiseen reaktioon perustuva PCR-testausprotokolla, johon kuuluu sisäinen PCR-kontrolli (Patrik, 2000)**

## 1.1 Oligonukleotidialukkeet

Koodaavan suunnan aluke PSA-1	5'- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3'
Vastakkaisen suunnan aluke PSA-R	5'- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3'
Koodaavan suunnan aluke NS-7-F	5'- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3'
Vastakkaisen suunnan aluke NS-8-R	5'- tcc gca ggt tca cct acg ga -3'

*C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin templaatti-DNA:sta odotettu amplikonikoko = 502 emäsparia (PSA-alukesarja).

18S rRNA sisäisestä PCR-kontrollista odotettu amplikonikoko = 377 emäsparia (NS-alukesarja).

## 1.2 PCR-reaktioseos

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	15,725 µl	
10x PCR-puskuri <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fraktio V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP-seos (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Aluke PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Aluke PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Aluke NS-7-F (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Aluke NS-8-R (10 µM) <sup>(2)</sup>	0,1 µl	0,04 µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Näytteen tilavuus:	5,0 µl	
<b>Kokonaistilavuus:</b>	<b>25,0 µl</b>	

<sup>(1)</sup> Menetelmät validoitiin käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliQ tai Gold) ja Gibco BRL:tä.

<sup>(2)</sup> Alukkeiden NS-7-F ja NS-8-R konsentraatio optimoitiin perunan napapääuutteelle käyttäen homogointimenettelyä ja DNA:n puhdistusta Patrikin mukaan (2000) (ks. 6.1.a ja 6.2 jakso). Reagenssien konsentraatiot on optimoitava uudelleen, jos käytetään ravistamalla tapahtuvaa uuttamismenetelmää tai muuta DNA:n eristämismenetelmää.

## 1.3 PCR-reaktion olosuhteet

Ajetaan seuraava ohjelma:

1 sykli:	i)	3 minuuttia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi)
10 sykliä:	ii)	1 minuutti 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi)
	iii)	1 minuutti 64 °C:ssa (alukkeiden pariutuminen)
	iv)	1 minuutti 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)

25 sykliä:	v)	30 sekuntia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi)
	vi)	30 sekuntia 62 °C:ssa (alukkeiden pariutuminen)
	vii)	1 minuutti 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)
1 sykli:	viii)	5 minuuttia 72 °C:ssa (lisääminen edelleen)
	ix)	pidetään 4 °C:ssa.

*Huom.*

Tämä ohjelma on optimoitu käytettäväksi MJ Research PTC 200 -lämpösyklilaitteella. Muut mallit saattavat vaatia syklien ii), iii) iv), v), vi) ja vii) keston muuttamisen.

#### 1.4 *Amplikonin restriktioentsyymianalyysi*

*C. m. subsp. sepedonicus* -bakteerin DNA:sta monistetut PCR-tuotteet tuottavat entsyymillä *Bgl* II tyypillistä restriktio-fragmenttien pituuspolymorfiaa, kun niitä on inkuboitu 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. *C. m. subsp. sepedonicus* -spesifisestä fragmentista saadut restriktiofragmentit ovat kooltaan 282 ja 220 emäsparia.

## 2. **Latauspuskurin valmistaminen**

### 2.1 *Bromifenolisinen (10 % kantaliuos)*

Bromifenolisinen	5 g
Kahteen kertaan tislattua vettä	50 ml

### 2.2 *Latauspuskuri*

Glyseroli (86 %)	3,5 ml
Bromifenolisinen (5.1)	300 µl
Kahteen kertaan tislattua vettä	6,2 ml

## 3. **10X Trisasetaatti-EDTA-puskuri (TAE), pH 8,0**

Tris-puskuri	48,4 g
Jäätikka	11,42 ml
EDTA (dinatriumsuola)	3,72 g
Tislattua vettä	1,0 L

Laimennetaan 1X:ään ennen käyttöä.

Saatavana myös kaupallisesti (esim. Invitrogen tai vastaava).

---



## Lisäys 7

## Validoidut reagenssit FISH-testiä varten

## 1. Oligokoettimet

Cms-spesifinen koetin CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'  
 Ei-spesifinen eubakteriaalinen koetin EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

## 2. Kiinniteliuos

[VAROITUS! KIINNITE SISÄLTÄÄ PARAFORMALDEHYDIÄ, JOKA ON TOKSISTA. SITÄ EI SAA HENGITTÄÄ, JA ON KÄYTETTÄVÄ KÄSINEITÄ. ON SUOSITELTAVAA TYÖSKENNELLÄ VETOKAAPISSA.]

- i) Kuumennetaan 9 ml:ä molekyyliuodattimilla puhdistettua vettä (esim. ultrapuhdasta vettä (UPW)) noin 60 °C:een ja lisätään 0,4 g paraformaldehydiä. Paraformaldehydi liukenee, kun on lisätty 5 tippaa 1 N NaOH:ta ja sekoitettu magneettisekoittimella.
- ii) Säädetään pH arvoon 7,0 lisäämällä 1 ml 0,1 M fosfaattipuskuria (PB; pH 7,0) ja 5 tippaa 1 N HCl:ää. Tarkistetaan pH indikaattoriliuskillä ja säädetään tarvittaessa HCl:llä tai NaOH:lla.

[VAROITUS! PARAFORMALDEHYDILIUOKSISSA EI SAA KÄYTTÄÄ PH-MITTARIA.]

- iii) Suodatetaan liuos 0,22 µm:n kalvosuodattimen läpi ja pidetään pölyltä suojassa 4 °C:ssa, kunnes sitä tarvitaan.
- iv) *Huom.*

Vaihtoehtoinen kiinniteliuos: 96 % etanoli.

## 3. 3X hybmix-seos

NaCl 2,7 M  
 Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)  
 EDTA (suodatinsteroitu ja autoklavoitu) 15 mM

Laimennetaan 1X:ään tarpeen mukaan.

## 4. Hybridisaatioliuos

1X hybmix-seos

Natriumdodekyylisulfaatti (SDS) 0,01 %  
 Koetin EUB 338 5 ng/µl  
 Koetin CMSCY301 5 ng/µl

Valmistetaan taulukossa esitettyjen laskelmien mukaisia määriä hybridisaatioliuosta. Kutakin objektilevyä (jotka sisältävät 2 eri näytettä kahteen kertaan) varten tarvitaan 90 µl hybridisaatioliuosta.

Taulukko Hybridisaatiioseoksen valmistamiseen ehdotetut määrät

	2 objektilevyä	8 objektilevyä
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	50,1	200,4
3x hybmix-seos	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Koetin EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Koetin CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Kokonaismäärä (µl)	90,0	360,0

*Huom.* Varastoidaan kaikki valolle herkkiä oligokoettimia sisältävät liuokset pimeässä – 20 °C:ssa. Suojataan käytön aikana suoralta auringonvalolta tai sähkövalolta.

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

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 g
Tislattua vettä	1,00 L

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

---

Lisäys 8

**Munakoisojen viljely**

Kylvetään munakoisojen (*Solanum melongena*) siemeniä pastöroidulle kylvöalustalle. Istutetaan kylvötaimet uudelleen pastöroituu istutusalueeseen, kun sirkkalehdet ovat täysin kehittyneet (10–14 päivää).

Munakoiso on viljeltävä kasvihuoneessa seuraavissa olosuhteissa:

päivän pituus:	14 tuntia tai luonnollinen päivän pituus, jos se on tätä pitempi,
päivälämpötila:	21–24 °C,
yölämpötila:	15 °C.

Sopivia munakoisolajikkeita:	"Black Beauty",
	"Long Tom",
	"Rima",
	"Balsas"

Munakoisojen toimittaja: ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

---

## Lisäys 9

**Gram-värjäyksen menettely (Huckerin muunnos) (Doetsch, 1981) <sup>(1)</sup>***Kristalliviolettiliuos*

Liutetaan 2 g kristalliviolettiä 20 ml:aan 95 % etanolia.

Liutetaan 0,8 g ammoniumoksaattia 80 ml:aan tislattua vettä.

Sekoitetaan nämä kaksi liuosta.

*Lugolin jodi*

Jodi	1 g
Kaliumjodidi	2 g
Tislattua vettä	300 ml

Jauhetaan kiinteät aineet huhmaressa. Lisätään vesi ja sekoitetaan aineiden liuottamiseksi suljetussa astiassa.

*Safraniini-vastaväriiliuos*

## Kantaliuos:

Safraniini O	2,5 g
95 % etanoli	100 ml

Sekoitetaan ja varastoidaan.

Laimennetaan suhteessa 1:10 työskentelyliuoksen saamiseksi.

*Värjäysmenettely*

1. Tehdään sivelynäyte, kuivataan ilmassa ja kiinnitetään lämmöllä.
2. Upotetaan objektilevy kristalliviolettiliuokseen 1 minuutiksi.
3. Pestään nopeasti juoksevalla vedellä.
4. Upotetaan Lugolin jodi-jodidiliuokseen 1 minuutiksi.
5. Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.
6. Poistetaan väri lisäämällä pisara kerrallaan 95 % etanolia, kunnes väri ei enää muutu, tai upottamalla etanoliin 30 sekunniksi kevyesti ravistaen.
7. Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.
8. Upotetaan safraniini-vastaväriiliuokseen 10 sekunniksi.
9. Pestään juoksevalla vedellä ja kuivataan imupaperilla.

Gram-positiiviset bakteerit ovat väriltään sinivioletteja; gram-negatiiviset bakteerit värjäytyvät ruusunpunaisesta punaiseen.

(<sup>1</sup>) Voidaan käyttää myös kaupallisesti saatavana olevia liuoksia ja värjäyspakkauksia.

## VIITTEET

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Euroopan yhteisöjen komissio, Luxemburg. Publ EUR 11 288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213–218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147–152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21–23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24–26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335–345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1–10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590–601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114–118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470–489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101–106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837–842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853–861.
16. Pastrok, K. -H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687–693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155–165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.
20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1/*Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739–748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481–527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281–295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546–4554.

## LIITE II

1. Kaikissa epäillyissä esiintymistapauksissa, joissa on liitteessä I kuvattujen menetelmien mukaisesti suoritetu(i)ssa seulontatetest(e)issä todettu positiivinen tulos, jota ei ole varmistettu tai kumottu täydentävillä testeillä, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa

- kaikki mukulat, joista on otettu näyte, ja jos se on mahdollista, kaikki kasvit, joista on otettu näyte,
- jäljellä oleva uute ja seulontatestejä varten valmistettu lisämateriaali, esim. immunofluoresenssilevyt, sekä
- kaikki asian kannalta merkityksellinen dokumentaatio,

kyseisten menetelmien loppuun saattamiseen asti.

Mukuloiden säilyttämisen ansiosta voidaan tarvittaessa tehdä lajiketestaus.

2. Niissä tapauksissa, joissa organismin esiintyminen on varmistunut, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa

- 1 kohdassa tarkoitettu aineisto,  
munakoisonäyte, joka on saastutettu inokuloimalla mukula- tai kasviuutetta,
- ja  
organismien eristetty viljelmä,

vähintään yhden kuukauden ajan 5 artiklan 2 kohdassa säädetyn ilmoitusmenettelyn jälkeen.

—

## LIITE III

1. Edellä 5 artiklan 1 kohdan b alakohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnon laajuuden määrittämiseksi olisi otettava huomioon seuraavat tekijät:
    - mukulat tai kasvit, jotka on viljelty 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla tuotantopaikalla,
    - tuotantopaikka (-paikat), jonka (joiden) tuotanto on jossain yhteydessä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettuihin mukuloihin tai kasveihin, mukaan lukien sellaiset tuotantopaikat, jotka joutuvat tekemisiin samojen tuotantovälineiden ja -laitteiden kanssa välittömästi tai yhteisen sopimustoimittajan välityksellä,
    - mukulat tai kasvit, jotka on tuotettu edellisessä luettelamakohdassa tarkoitettulla tuotantopaikalla (-paikoilla), tai jotka ovat mainitulla (mainituilla) paikalla (paikoilla) aikana, jolloin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettuja mukuloita tai kasveja oli ensimmäisessä luettelamakohdassa tarkoitettussa tuotantopaikassa,
    - tilat, joissa edellä mainituissa luettelamakohdissa tarkoitetuilta tuotantopaikoilta lähtöisin olevia perunoita käsitellään,
    - kaikki koneet, ajoneuvot, säiliöt, varastot tai näiden osat sekä kaikki muut esineet, mukaan lukien pakkaukset, jotka ovat voineet olla kosketuksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettujen mukuloiden tai kasvien kanssa,
    - kaikki mukulat tai kasvit, jotka on varastoitu johonkin edellisessä luettelamakohdassa tarkoitetuista rakenteista tai esineistä tai jotka ovat kosketuksissa sellaisen kanssa ennen kyseisten rakenteiden tai esineiden puhdistamista ja desinfiointia,
    - 6 artiklassa tarkoitettujen kokeiden jälkeen mukulat tai kasvit, jotka ovat suoraan ylenevässä tai alenevassa polvessa tai sisaruussuhteessa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettuihin mukuloihin ja kasveihin nähden ja joiden osalta saastunna näyttää todennäköiseltä klooniyhteyden vuoksi, vaikka ne ovat saataneekin testeissä osoittautua negatiivisiksi kasvintuhoajan suhteen. Lajiketestaus voidaan tehdä saastuneiden ja samasta kloonista polveutuvien mukuloiden tai kasvien tunnistamisen varmistamiseksi,ja
  - edellisessä luettelamakohdassa tarkoitettujen mukuloiden tai kasvien tuotantopaikka (-paikat).
2. Edellä 5 artiklan 1 kohdan c alakohdassa tarkoitettujen mahdollisen leviämisen määrittämiseksi olisi otettava huomioon seuraavat tekijät:
    - muiden sellaisten tuotantopaikkojen läheisyys, joilla viljellään perunaa tai muita isäntäkasveja,
    - siemenperunoiden yhteistuotanto ja -käyttö.
  3. 5 artiklan 2 kohdan ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettu ilmoittaminen on hoidettava seuraavasti:
    - välittömästi sen jälkeen, kun kasvintuhoajan esiintyminen on varmistettu laboratoriotestauksella käyttäen liitteessä I esitettyjä menetelmiä, on ilmoitettava ainakin
      - perunaerän lajikenimi,
      - tyyppi (ruoka- ja teollisuus-, siemenperuna jne.) ja tarvittaessa perunoiden siemenluokka,
    - kun on olemassa toisesta jäsenvaltiosta tai toiseen jäsenvaltioon siirrettäviin perunoihin liittyvä saastuntariski, jäsenvaltion, jossa esiintyminen on varmistettu, on välittömästi ilmoitettava kyseisille jäsenvaltioille tiedot, joita ne tarvitsevat voidakseen noudattaa 5 artiklan 3 kohdan säännöksiä, eli
      - perunaerän lajikenimi,
      - lähettäjän ja vastaanottajan nimi ja osoite,
      - perunaerän toimituspäivämäärä,

- toimitetun perunaerän koko,
- tarvittaessa jäljennös kasvipassista tai ainakin kasvipassin numero, tai tarvittaessa viljelijän tai kauppiaan rekisteröintinumero ja jäljennös tavarantoimitusilmoituksesta.

Komissiolle on välittömästi ilmoitettava tällaisten tietojen toimittamisesta.

- Kun kaikki tutkimukset on tehty, on aina ilmoitettava
    - päivämäärä, jona saastunta varmistui,
    - lyhyt kuvaus tutkimuksista, jotka tehtiin saastunnan lähteen ja mahdollisen leviämisen tunnistamiseksi, toteutetun näytteenoton laajuus mukaan luettuna,
    - tiedot saastunnan tunnistetusta tai oletetusta lähteestä (tai lähteistä),
    - ilmoitetun saastunnan laajuutta koskevat tiedot, mukaan luettuina tuotantopaikkojen lukumäärä ja erien lukumäärä sekä lajike ja siemenperunoiden yhteydessä luokka,
    - alueen rajoittamista koskevat tiedot, mukaan luettuina sellaisten tuotantopaikkojen lukumäärä, joita ei ole ilmoitettu saastuneiksi mutta jotka sisältyvät kyseiseen alueeseen,
    - vahvistettua taudin esiintymistä koskevat muut tiedot, joita komissio voi vaatia.
-

## LIITE IV

1. Edellä 7 artiklan 1 kohdassa tarkoitettut virallisesti valvotut toimenpiteet ovat

- käyttö eläinten rehuksi lämpökäsittelyn jälkeen siten, että kasvintuhoojan henkiin jäämisen riskiä ei ole,  
  
tai
- hävittäminen virallisesti hyväksytyllä tarkoitukseen varatulla jätteidenhävittämispaikalla, jossa ei ole tunnistettavaa riskiä kasvintuhoojan pääsystä ympäristöön, esimerkiksi maatalousmaahan imeytymisen kautta,  
  
tai
- tuhkakksi polttaminen,  
  
tai
- teollinen käsittely toimittamalla suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään virallisesti hyväksytyt jätteidenhävitystilat ja -laitteet, joista on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ei ole, sekä järjestelmä, jolla ainakin laitoksesta lähtevät ajoneuvot voidaan puhdistaa ja desinfioida,  
  
tai
- muut toimenpiteet, jos on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ei ole; nämä toimenpiteet ja niiden perustelut on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.

Edellä mainittuihin toimenpiteisiin liittyvä tai niistä syntyvä mahdollinen jäljelle jäävä jäte hävitetään virallisesti hyväksytyillä menetelmillä tämän direktiivin liitteen V mukaisesti.

2. Jäsenvaltioiden vastuussa olevien viranomaisten valvomaan asianmukaista 5 artiklan 1 kohdan b alakohdan mukaisesti todennäköisesti saastuneina pidettyjen mukuloiden tai kasvien 7 artiklan 2 kohdassa tarkoitettua käyttöä tai hävittämistä on, edellyttäen, että vastuussa olevien viranomaisten välillä toimii asianmukainen tiedonvaihto jatkuvan valvonnan varmistamiseksi ja että jäsenvaltion vastuussa oleva viranomainen on hyväksynyt ensimmäisessä ja toisessa luettelukohdassa tarkoitettujen jätteidenhävitystilat ja -laitteet paikoissa, joissa perunat on tarkoitus pakata tai jalostaa, seuraava:

- niiden käyttö kulutukseen tarkoitettuina ruokaperunoina, suoraan toimitukseen ja käyttöön valmiissa pakkauksissa, jotka eivät edellytä minkäänlaista uudelleen pakkaamista, paikassa, jossa on asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet. Kylvämiseen tarkoitettuja perunoita saa käsitellä samassa paikassa ainoastaan, jos tämä tapahtuu erikseen tai puhdistuksen ja desinfiointin jälkeen,  
  
tai
- niiden käyttö teolliseen käsittelyyn tarkoitettuina perunoina, jotka toimitetaan suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään asianmukaiset jätteidenhävitystilat- ja -laitteet sekä järjestelmä, jolla ainakin laitoksesta lähtevät ajoneuvot voidaan puhdistaa ja desinfioida,  
  
tai
- mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, jos on todettu, että se ei aiheuta tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ja jos se on saanut mainittujen vastuussa olevien viranomaisten hyväksynnän.

3. 7 artiklan 3 kohdassa tarkoitettujen kohteiden asianmukaisten puhdistus- ja desinfiointimenetelmien on oltava sellaisia, joiden ei ole todettu aiheuttavan minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa; ne on toteutettava jäsenvaltioiden vastuussa olevien viranomaisten valvonnassa.



4. Jäsenvaltioiden 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan mukaisesti toteamalla rajoitetulla alueella toteuttamiin ja 7 artiklan 4 kohdassa tarkoitettuihin toimenpiteisiin on kuuluttava seuraavat toimenpiteet:

4.1 saastuneiksi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti ilmoitetuilla tuotantopaikoilla

a) saastuneeksi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisesti ilmoitetulla pellolla

- i) — ilmoitettua saastunutta seuraavien vähintään kolmen kasvukauden aikana,
- toteutetaan toimenpiteitä itsestään leviävien perunakasvien ja muiden itsestään kylväytyvien kasvintuhoajan isäntäkasvien hävittämiseksi,
  - yhtäkään perunan mukulaa, kasvia tai siementä tai muuta itsestään kylväytyvää kasvintuhoajan isäntäkasvia eikä viljelystä, josta aiheutuu tunnistettavaa kasvintuhoajan leviämisvaaraa, ei istuteta eikä kylvetä,

— edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan ensimmäisen perunoiden korjuukauden aikana ja sillä edellytyksellä, että pellosta ei ole istuttamista tai kylvämistä edeltävien vähintään kahden perättäisen kasvukauden aikana tehdyissä virallisissa tarkastuksissa löydetty itsestään leviäviä perunakasveja ja muita itsestään kylväytyviä kasvintuhoajien isäntäkasveja, saa tuottaa ainoastaan ruoka- ja teollisuusperunoita ja korjatut mukulat on tutkittava liitteessä I kuvatun menettelyn mukaisesti,

— edeltävässä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan perunoiden korjuukauden aikana ja sopivan viljelykierron jälkeen – jonka pituus on vähintään kaksi vuotta, jos on kasvatettava siemenperunoita – perunoita voi istuttaa siemen- tai ruoka- ja teollisuusperunan tuottamiseksi ja virallisia tutkimuksia suoritetaan 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti, tai

ii) — ilmoitettua saastunutta seuraavien neljän kasvukauden aikana

— toteutetaan toimenpiteitä itsestään leviävien perunakasvien ja muiden itsestään kylväytyvien kasvintuhoajan isäntäkasvien hävittämiseksi,

— pelto jätetään joko avokesannolle, jota pidetään yllä, tai pysyväksi laitumeksi, jolloin sitä joko niitetään usein ja matalaan tai laidunnetaan intensiivisesti,

— edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan ensimmäisen perunoiden korjuukauden aikana ja sillä edellytyksellä, että pellosta ei ole istuttamista tai kylvämistä edeltävien vähintään kahden perättäisen kasvukauden aikana tehdyissä virallisissa tarkastuksissa löydetty itsestään leviäviä perunakasveja ja muita itsestään kylväytyviä kasvintuhoajien isäntäkasveja, saa tuottaa siemen- tai ruoka- ja teollisuusperunoita ja korjatut mukulat on tutkittava liitteessä I kuvatun menettelyn mukaisesti;

b) kaikilla muilla saastuneen tuotantopaikan pelloilla, jos vastuussa olevilla viranomaisilla on varmuus siitä, että itsestään levinneet perunakasvit ja muut itsestään kylväytyvät kasvintuhoajan isäntäkasvit on hävitetty

— ilmoitettua saastunutta seuraavan kasvukauden aikana ei istuteta tai kylvetä yhtään perunan mukulaa, kasvia tai siementä tai muuta itsestään kylväytyvää kasvintuhoajan isäntäkasvia, tai

— varmennettuja siemenperunoita istutetaan ainoastaan ruoka- ja teollisuusperunan tuottamiseksi,

— ilmoitettua saastunutta seuraavan toisen kasvukauden aikana istutetaan tai kylvetään siemen- tai ruoka- ja teollisuusperunan tuottamiseksi ainoastaan varmennettuja siemenperunoita tai siemenperunoita, jotka on virallisissa testeissä todettu perunan vaaleasta rengasmädästä vapaiksi ja jotka on kasvatettu virallisessa valvonnassa muissa kuin 4.1 kohdassa tarkoitetuissa tuotantopaikoissa,

— ilmoitettua saastunutta seuraavien vähintään kolmen kasvukauden aikana istutetaan tai kylvetään siemen- tai ruoka- ja teollisuusperunan tuottamiseksi ainoastaan varmennettuja siemenperunoita tai siemenperunoita, jotka on virallisessa valvonnassa kasvatettu varmennetuista siemenperunoista,

- kunkin edellisissä luetelmakohdissa tarkoitetun kasvukauden aikana toteutetaan toimenpiteitä itsestään levinneiden perunakasvien ja muiden itsestään kylväytyvien kasvintuhoojan isäntäkasvien hävittämiseksi, jos niitä esiintyy, ja kullakin perunapellolla tehdään korjatuille perunoille virallisia testejä liitteessä I kuvatun menetelyn mukaisesti;
- c) välittömästi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan mukaisen saastunnan ilmoittamisen jälkeen ja saastunutta seuraavan ensimmäisen kasvukauden jälkeen kaikki tuotantopaikan laitteistot ja varastotilat, jotka ovat yhteydessä perunan tuotantoon, puhdistetaan ja desinfioidaan tarvittaessa 3 kohdassa tarkoitetuilla sopivilla menetelmillä;
- d) suojatuissa viljelykasvien tuotantoyksiköissä, joissa kasvualustan vaihtaminen kokonaan on mahdollista
  - mukuloita, kasveja tai siemeniä saa istuttaa tai kylvää ainoastaan, jos tuotantoyksikköön sovelletaan virallisessa valvonnassa sellaisia toimenpiteitä, joiden tarkoituksena on kasvintuhoojan ja kaikkien isäntäkasvien hävittäminen, mukaan lukien vähintään kasvualustan vaihtaminen kokonaan sekä tuotantoyksikön ja kaikkien välineiden puhdistus ja desinfiointi, ja jos vastuussa olevat viranomaiset ovat tämän seurauksena hyväksyneet sen perunan tuotantoon,
  - perunoita tuotetaan varmennetuista siemenperunoista tai testatuista lähteistä peräisin olevista minimukuloista tai mikrokasveista.

#### 4.2. Rajoittamatta 4.1 kohdassa lueteltujen toimenpiteiden soveltamista, jäsenvaltioiden on rajoitetun alueen sisällä

- a) välittömästi ilmoitetun saastunnan jälkeen varmistettava, että kaikki tuotantopaikan laitteistot ja varastotilat, jotka ovat yhteydessä perunan tuotantoon, puhdistetaan ja desinfioidaan tarvittaessa 3 kohdassa tarkoitetuilla sopivilla menetelmillä;
- b) ilmoitetun saastunnan jälkeen viipymättä ja vähintään kolmen kasvukauden ajan
  - määrättävä vastuussa olevat viranomaiset valvomaan tiloja, joissa harjoitetaan perunan mukuloiden viljelyä, varastointia tai käsittelyä, sekä niiden yritysten tiloja, jotka käyttävät perunantuotantolaitteita sopimuksen perusteella,
  - vaadittava, että kyseisen alueen kaikki perunasadot istutetaan ainoastaan sertifioitua siementä tai virallisen valvonnan alaisena kasvatettua siementä käyttäen ja että korjuun jälkeen testataan 5 artiklan 1 kohdan b alakohdan mukaisesti mahdollisesti saastuneiksi ilmoitetuilla tuotantopaikoilla kasvanneet siemenperunat,
  - vaadittava, että kaikissa alueen yrityksissä siemenperuna ja muuhun käyttöön tarkoitettu peruna käsitellään erillään tai että siemenperunan ja muuhun käyttöön tarkoitettujen perunoiden käsittelyn välillä huolehditaan puhdistamisesta ja desinfioinnista,
  - toteutettava virallinen kartoitustutkimus 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti;
- c) laadittava tarvittaessa ohjelma kaikkien siemenperunavarastojen korvaamiseksi sopivan ajanjakson kuluessa.

## LIITE V

Liitteessä IV olevassa 1 kohdassa tarkoitettujen virallisesti hyväksytyjen jätteidenhävitysmenetelmien on vastattava seuraavia säännöksiä siten, että vältetään mahdollinen tunnistettava kasvintuhoojan leviämisaara:

- i) perunajäte (hylätyt perunat ja kuoret mukaan luettuina) ja mahdollinen muu perunoihin liittyvä kiinteä jäte (maaperä, kivet ja muu jäte mukaan luettuina) hävitetään joko
- hävittämällä virallisesti hyväksytyllä tarkoitukseen varatulla jätteidenhävittämispaikalla, jossa ei ole tunnistettavaa riskiä kasvintuhoojan pääsystä ympäristöön, esimerkiksi maatalousmaahan imeytymisen kautta; jäte on kuljetettava suoraan hävittämispaikalle pakkaamalla se siten, ettei ole vaaraa jätteen häviämisestä,
- tai
- tuhkaksi polttamalla,
- tai
- muilla toimenpiteillä, jos on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaaraa ei ole; nämä toimenpiteet on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille;
- ii) nestemäinen jäte: nestemäinen jäte, joka sisältää suspendoituneita kiinteitä aineita, suodatetaan ennen hävittämistä tai kiintoaineet poistetaan laskeuttamalla. Nämä kiintoaineet hävitetään i alakohdassa esitetyllä tavalla.

Tämän jälkeen nestemäinen jäte joko

- kuumennetaan kauttaaltaan vähintään 60 °C:seen 30 minuutin ajaksi ennen hävittämistä,
- tai
- hävitetään muulla virallisesti hyväksytyllä tavalla virallisessa valvonnassa siten, ettei ole olemassa tunnistettavaa riskiä jätteen pääsystä kosketuksiin maatalousmaan kanssa. Asiaan liittyvät yksityiskohdat on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle.

Tässä liitteessä kuvatut vaihtoehdot koskevat myös saastuneiden erien käsittelyyn, hävittämiseen ja prosessointiin liittyvää jätettä.