

I

(Besluiten waarvan de publicatie voorwaarde is voor de toepassing)

RICHTLIJN 98/57/EG VAN DE RAAD

van 20 juli 1998

betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

DE RAAD VAN DE EUROPESE UNIE,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap, inzonderheid op artikel 43,

Gezien het voorstel van de Commissie⁽¹⁾,

Gezien het advies van het Europees Parlement⁽²⁾,

Gezien het advies van het Economisch en Sociaal Comité⁽³⁾,

Overwegende dat het schadelijk organisme *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. voorheen bekend stond onder de naam *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; dat *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. waarschijnlijk de algemeen aanvaarde naam voor het organisme zal worden; dat in de onderhavige richtlijn rekening dient te worden gehouden met deze wetenschappelijke ontwikkeling;

Overwegende dat in de landbouwproductie van de Gemeenschap de aardappel- en de tomatenteelt een belangrijke plaats innemen; dat schadelijke organismen een constante bedreiging vormen voor de opbrengsten in de aardappel- en tomatenteelt;

Overwegende dat, door de aardappel- en de tomatenteelt tegen deze schadelijke organismen te beschermen, niet alleen de productiecapaciteit in stand wordt gehouden, maar bovendien de landbouwproductiviteit kan worden verbeterd;

Overwegende dat beschermende maatregelen om het binnenbrengen van schadelijke organismen op het grondgebied van een lidstaat te voorkomen, slechts een beperkt effect zouden sorteren indien geen maatregelen worden genomen om die organismen overal in de Gemeenschap gelijktijdig en systematisch te bestrijden en om verspreiding ervan te voorkomen;

Overwegende dat één van de schadelijke organismen voor aardappelen en tomaten *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. is, het pathogene agens van bruinrot bij

aardappelen en van verwelkingsziekte bij aardappelen en tomaten; dat gevallen van de door dit pathogene agens veroorzaakte ziekte in enkele delen van de Gemeenschap zijn signaleerd en er nog steeds enkele besmettingshaarden van beperkte omvang zijn;

Overwegende dat een en ander voor de aardappel- en de tomatenteelt overal in de Gemeenschap een aanzienlijk gevaar oplevert, tenzij voor deze gewassen adequate maatregelen worden genomen om het organisme te lokaliseren en de verspreiding ervan vast te stellen, teneinde het optreden en de verspreiding ervan te voorkomen, en waar het organisme wordt aangetroffen ervoor te zorgen dat het zich niet verder kan verspreiden en dat de nodige bestrijdingsmaatregelen worden genomen met het oog op uitroeiing;

Overwegende dat daartoe binnen de Gemeenschap een aantal maatregelen dient te worden genomen; dat de lidstaten zo nodig aanvullende of strengere maatregelen moeten kunnen vaststellen, met dien verstande dat het verkeer van aardappelen of tomaten binnen de Gemeenschap daarvan geen andere hinder mag ondervinden dan is toegestaan op grond van Richtlijn 77/93/EEG van de Raad van 21 december 1976 betreffende beschermende maatregelen tegen het binnenbrengen en de verspreiding in de Gemeenschap van voor planten en plantaardige producten schadelijke organismen⁽⁴⁾; dat van dergelijke maatregelen aan de andere lidstaten en aan de Commissie kennis dient te worden gegeven;

Overwegende dat er daarbij rekening mee dient te worden gehouden dat systematische officiële onderzoeken moeten worden verricht om het pathogene agens te kunnen lokaliseren; dat dergelijke onderzoeken controleprocedures moeten omvatten en, zo nodig, aangezien de ziekte in bepaalde milieuomstandigheden latent aanwezig kan zijn en onopgemerkt kan blijven bij de aardappelen als gewas en bij de bewaring, ook bemonsterings- en testprocedures; dat de verspreiding van het pathogene agens bij het gewas zelf niet de belangrijkste factor is, maar het pathogene agens zich via het oppervlaktewater en via sommige verwante in het wild voorkomende nachtschadeachtigen kan verspreiden en irrigatie van

⁽¹⁾ PB C 124 van 21.4.1997, blz. 12, en
PB C 108 van 7.4.1998, blz. 85.

⁽²⁾ PB C 14 van 19.1.1998, blz. 34.

⁽³⁾ PB C 206 van 7.7.1997, blz. 57.

⁽⁴⁾ PB L 26 van 31.1.1977, blz. 20. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 98/2/EG van de Commissie (PB L 15 van 21.1.1998, blz. 34).

aardappelen en tomaten met besmet water daarom een besmettingsrisico lijkt op te leveren; dat het pathogene agens bovendien kan overwinteren in opslag van aardappelen en tomaten, die daardoor een infectiehaard kan vormen waardoor de ziekte zich in het daaropvolgende seizoen opnieuw voordoet; dat het pathogene agens zich eveneens verspreidt door contact met besmette aardappelen, of met poot/plant-, oogst- of behandelingsmachines of containers voor vervoer en opslag die met besmette aardappelen in contact zijn geweest;

Overwegende dat verspreiding van het pathogene agens kan worden tegengegaan of voorkomen door dergelijke voorwerpen te desinfecteren; dat besmetting van pootaardappelen een groot risico van verspreiding van het pathogene agens oplevert; dat latente infectie van pootaardappelen een groot risico van verspreiding van het pathogene agens oplevert dat kan worden voorkomen door pootaardappelen te gebruiken die zijn geteeld in het kader van een officieel erkend programma waarbij de pootaardappelen zijn onderzocht en vrij zijn bevonden van besmetting;

Overwegende dat de huidige kennis van de biologische eigenschappen en de epidemiologie van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. onder Europese condities nog onvolledig is en dat de voorgestelde maatregelen naar verwachting binnen een aantal seizoenen opnieuw zullen moeten worden bekeken; dat ook de testprocedures zullen moeten worden aangepast in het licht van verder onderzoek naar in het bijzonder de gevoeligheid en specificiteit van de testmethoden dat zal worden verricht om de beste testmethoden die beschikbaar zijn te kunnen kiezen en standaardiseren;

Overwegende dat het wenselijk is dat de lidstaten bij het verder uitwerken van dergelijke algemene maatregelen en van de door de lidstaten te treffen strengere of aanvullende maatregelen ter voorkoming van het binnenbrengen van het pathogene agens op hun grondgebied, nauw met de Commissie samenwerken binnen het Permanent Plantenziektkundig Comité, hierna „het comité” genoemd,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

Deze richtlijn heeft betrekking op de maatregelen die in de lidstaten moeten worden genomen tegen *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., vroeger bekend als *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (hierna „het organisme” genoemd) ten aanzien van de in bijlage I, deel I, vermelde gastheerplanten van het organisme (hierna „het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal” genoemd), teneinde:

- a) het organisme te lokaliseren en de verspreiding ervan vast te stellen,
- b) het optreden en de verspreiding ervan te voorkomen, en,

- c) waar het organisme wordt aangetroffen, verspreiding ervan te voorkomen en het te bestrijden met het oog op uitroeiing.

Artikel 2

1. De lidstaten verrichten ieder jaar systematisch officiële onderzoeken naar het organisme op het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal dat van hun grondgebied afkomstig is. Met het oog op de identificatie van mogelijke andere besmettingsbronnen die een bedreiging vormen voor de teelt van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, voeren de lidstaten in de productiegebieden van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal een risico-evaluatie uit en, als daaruit een risico van verspreiding van het organisme naar voren komt, voeren zij gerichte officiële onderzoeken uit naar het organisme op andere planten dan het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, inclusief in het wild voorkomende nachtschadeachtigen die als gastheerplant kunnen optreden, alsmede zowel in oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor irrigatie of bespuiting van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, als in vloeibaar afval dat wordt geloosd uit bedrijven waar het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal industrieel wordt verwerkt en verpakt en dat wordt gebruikt voor irrigatie of beregening van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal. De omvang van deze gerichte onderzoeken wordt bepaald afhankelijk van de geconstateerde risico's. De lidstaten kunnen eveneens officiële onderzoeken naar het organisme op ander materiaal verrichten, zoals groeimedium, grond, en vast afval van bedrijven voor industriële verwerking en verpakking.

2. De in lid 1 bedoelde officiële onderzoeken worden als volgt uitgevoerd:

- a) voor het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal: overeenkomstig de in bijlage I, deel II, punt 1, aangegeven methode, en
- b) voor andere gastheerplanten dan het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, alsmede water, inclusief vloeibaar afval: overeenkomstig daartoe geëigende methoden, waarbij, indien van toepassing, monsters worden genomen voor officieel of onder officieel toezicht verricht laboratoriumonderzoek;
- c) zo nodig, voor ander materiaal: overeenkomstig de daartoe geëigende methoden.

Met het oog op deze onderzoeken wordt door de verantwoordelijke officiële instanties als bedoeld in Richtlijn 77/93/EEG, volgens deugdelijke wetenschappelijke en statistische beginselen en op grond van de biologische eigenschappen van het organisme, nader bepaald welke inspectieprocedures moeten worden gevolgd, alsmede waar en op welk tijdstip en hoeveel monsters moeten worden genomen en hoe de samenstelling van de steekproef dient te zijn, waarbij rekening wordt gehouden met de voor de betrokken lidstaat specifieke methoden voor de teelt van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal en, zo nodig, andere gastheerplanten van het organisme.

3. Nadere gegevens over en de uitkomsten van de in lid 1 bedoelde onderzoeken worden elk jaar aan de

andere lidstaten en aan de Commissie ter kennis gebracht overeenkomstig het bepaalde in bijlage I, deel II, punt 2. Deze kennisgevingen worden gedaan vóór 1 juni, behalve over aardappelen die worden gebruikt als op eigen bedrijf gewonnen zaad waarvoor ze vóór 1 september moeten worden gedaan. De nadere gegevens over en de uitkomsten betreffende de gewassen moeten worden afgezet tegen de productie in het voorgaande jaar. De verstrekte gegevens kunnen aan het comité worden voorgelegd.

4. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG worden bepalingen vastgesteld ten aanzien van:

— de geëigende methoden voor de onderzoeken en de laboratoriumtests als bedoeld in lid 2, eerste alinea, onder b).

5. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen de volgende bepalingen worden vastgesteld:

— de geëigende methoden voor de onderzoeken als bedoeld in lid 2, eerste alinea, onder c);

— nadere bepalingen inzake de onderzoeken als bedoeld in lid 2, tweede alinea, om te garanderen dat de lidstaten gelijkwaardige garantieniveaus bieden.

Artikel 3

De lidstaten zien erop toe dat gevallen van vermoede of bevestigde aanwezigheid van het organisme op hun grondgebied aan hun eigen verantwoordelijke officiële instanties worden gemeld.

Artikel 4

1. Telkens wanneer wordt vermoed dat het organisme voorkomt, dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de betrokken lidstaat (lidstaten) toe te zien op de volledige afwikkeling van het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek, waarbij voor het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal gebruik wordt gemaakt van de geëigende methode van bijlage II overeenkomstig de in bijlage III, punt 1, gestipuleerde voorwaarden of, in andere gevallen, een andere officieel erkende methode, teneinde de vermoede aanwezigheid van het organisme te bevestigen dan wel te weerleggen. Indien bevestigd wordt dat het organisme voorkomt, geldt het bepaalde in bijlage III, punt 2.

2. In afwachting dat de vermoede aanwezigheid wordt bevestigd of weerlegd, als bedoeld in lid 1, dienen de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaten, in alle gevallen waarin:

- i) diagnostische symptomen van de door het organisme veroorzaakte ziekte zijn waargenomen en een positieve uitkomst is verkregen bij de screenings-test(s) als omschreven in bijlage II, deel I, punt 1, en deel II, of
- ii) een positieve uitkomst is verkregen bij de screenings-test(s) als omschreven in bijlage II, deel I, punt 2, en deel III,

met betrekking tot hun eigen productie

- a) te verbieden dat planten en knollen van alle gewassen, partijen of zendingen waarvan de monsters zijn geno-

men, worden verplaatst, tenzij dit onder hun toezicht gebeurt en op voorwaarde dat vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico is dat het organisme zich kan verspreiden;

- b) het nodige te doen om de oorsprong van de vermoede aanwezigheid van het organisme te achterhalen;
- c) op grond van het geschatte risico passende aanvullende voorzorgsmaatregelen te nemen, in het bijzonder ten aanzien van de productie van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal en van het verplaatsen van andere dan onder a) bedoelde partijen pootaardappelen die geteeld zijn op de productieplaats waar de onder a) genoemde monsters zijn genomen, om verspreiding van het organisme te voorkomen.

3. Indien er bij vermoede aanwezigheid van het organisme een risico bestaat dat het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal of het oppervlaktewater stromend naar of afkomstig van (een) andere lidstaat (lidstaten) wordt besmet, dient de lidstaat waar de vermoede aanwezigheid is gerapporteerd de andere betrokken lidstaat (lidstaten) onverwijld en overeenkomstig het geconstateerde risico nadere gegevens inzake de vermoede aanwezigheid mede te delen; tussen de betrokken lidstaten wordt op passende wijze samengewerkt. De aldus in kennis gestelde lidstaten treffen voorzorgsmaatregelen overeenkomstig lid 2, onder c), en nemen alle nodige maatregelen overeenkomstig het bepaalde in lid 1 en lid 2.

4. De volgende maatregelen kunnen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG:

— de maatregelen als bedoeld in lid 2, onder c).

Artikel 5

1. Wanneer het officiële of onder officieel toezicht verrichte laboratoriumonderzoek waarbij de in bijlage II beschreven methode of, in alle overige gevallen, een andere officieel erkende methode is toegepast, de aanwezigheid van het organisme in het overeenkomstig deze richtlijn genomen monster bevestigt, nemen de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaat, rekening houdend met deugdelijke wetenschappelijke beginselen, de biologische eigenschappen van het organisme en de in de lidstaten gebruikelijke teelt-, afzet- en verwerkingsmethoden voor de gastheerplanten van het organisme, de volgende maatregelen:

- a) voor het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal:
 - i) stellen zij een onderzoek in om de omvang en de primaire bron(nen) van de besmetting te bepalen, overeenkomstig het bepaalde in bijlage IV, met verdere tests overeenkomstig artikel 4, lid 1, op ten minste alle klonaal verwante voorraden pootaardappelen, en
 - ii) verklaren zij het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, de zending en/of partij waarvan het monster is genomen, alsmede de machines, het voer- of vaartuig, de opslagplaats, of delen

daarvan, en enig ander voorwerp, inclusief verpakkingsmateriaal dat met het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal waarvan het monster is genomen, in contact is geweest, besmet; indien van toepassing verklaren zij ook het veld (de velden), de eenheid (eenheden) waar het gewas onder beschermde condities is geteeld, en de productieplaats(en) waar het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal is geoogst waarvan het monster is genomen, besmet; voor de tijdens de vegetatieperiode genomen monsters verklaren zij het veld (de velden), de productieplaats(en) en, in voorkomend geval, de eenheid (eenheden) waar het gewas waarvan het monster is genomen, onder beschermde condities is geteeld, besmet, en

- iii) bepalen zij, overeenkomstig het bepaalde in bijlage V, punt 1, de omvang van de waarschijnlijke besmetting door contact met de aangewezen besmettingsbronnen vóór of na de oogst, via de teeltwijze, de irrigatie of de bespuiting, of via stamverwantschap met de aangewezen besmettingsbronnen, en
 - iv) bakenen zij een zone af uitgaande van de onder ii) bedoelde besmetverklaring, de onder iii) bedoelde omvang van de waarschijnlijke besmetting en de mogelijke verspreiding van het organisme, overeenkomstig het bepaalde in bijlage V, punt 2, onder i);
- b) voor gewassen van andere dan de onder a) bedoelde gastheerplanten, indien er een aanwijsbaar risico voor de teelt van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal bestaat:
- i) stellen zij een onderzoek in overeenkomstig het bepaalde in punt a), onder i), en
 - ii) verklaren zij de gastheerplanten van het organisme, waarvan het monster is genomen, besmet, en
 - iii) bepalen zij de waarschijnlijke besmetting en bakenen zij een zone af overeenkomstig het bepaalde in punt a), onder respectievelijk iii) en iv), ten aanzien van de productie van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal;
- c) voor het oppervlaktewater (inclusief vloeibaar afval van bedrijven voor industriële verwerking of verpakking van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal) dat in contact komt met in het wild voorkomende nachtschadeachtigen die als gastheerplant kunnen optreden, wanneer vaststaat dat er aanwijsbare risico's bestaan voor de teelt van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal via irrigatie, bespuiting of overstroming met oppervlaktewater:
- i) stellen zij een onderzoek in met onder meer een officieel onderzoek, op de daartoe geschikte tijdstippen, van monsters van oppervlaktewater en, in voorkomend geval, in het wild voorkomende nachtschadeachtigen die als gastheerplant optreden, teneinde de omvang van de besmetting te bepalen, en

- ii) verklaren zij, voorzover nodig en op grond van het onder i) bedoelde onderzoek, het oppervlaktewater waarvan het monster is of de monsters zijn genomen, besmet, en
- iii) bepalen zij de waarschijnlijke besmetting en bakenen zij op basis van de onder ii) bedoelde besmetverklaring en de mogelijke verspreiding van het organisme een zone af, waarbij rekening wordt gehouden met het bepaalde in bijlage V, punt 1 en punt 2, onder ii).

2. De lidstaten stellen op de in bijlage V, punt 3, vastgestelde wijze de andere lidstaten en de Commissie onverwijld in kennis van elke besmetverklaring als bedoeld in lid 1, punt a), onder ii), en lid 1, punt c), onder ii), en verstrekken nadere gegevens betreffende de zoneafbakening als bedoeld in lid 1, punt a), onder iv), en, indien van toepassing, lid 1, punt c), onder iii). De op grond van deze alinea verstrekte gegevens kunnen aan het comité worden voorgelegd.

Daarnaast leggen de lidstaten de in bijlage V, punt 4, bedoelde aanvullende kennisgeving aan de Commissie voor. De op grond van deze alinea verstrekte gegevens worden onmiddellijk aan de leden van het comité voorgelegd.

3. Als gevolg van een in lid 2 bedoelde kennisgeving en de daarin vermelde gegevens gaan de andere, in de kennisgeving vermelde lidstaten over tot een onderzoek overeenkomstig het bepaalde in lid 1, punt a), onder i), en, waar van toepassing, lid 1, punt c), onder i), en nemen zij, indien van toepassing, maatregelen overeenkomstig het bepaalde in lid 1 en lid 2.

Artikel 6

1. De lidstaten bepalen dat het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal dat krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet is verklaard niet mag worden gepoot of uitgeplant en dat daarvoor onder toezicht van hun verantwoordelijke officiële instanties één van de in bijlage VI, punt 1, genoemde maatregelen wordt getroffen zodat vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico voor verspreiding van het organisme bestaat.

2. De lidstaten bepalen dat het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal dat krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), en punt c), onder iii), „waarschijnlijk besmet” is verklaard, met inbegrip van het in de lijst opgenomen materiaal waarvoor een risico is geconstateerd, dat is geproduceerd op productieplaatsen die krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), „waarschijnlijk besmet” zijn verklaard, niet mag worden gepoot of uitgeplant en dat het onder toezicht van hun verantwoordelijke officiële instanties op de in bijlage VI, punt 2, aangegeven adequate wijze wordt gebruikt of verwijderd, zodat wordt vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico voor verspreiding van het organisme bestaat.

3. De lidstaten schrijven voor dat machines, voer- of vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en andere

voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet zijn verklaard of waarvan overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), en punt c), onder iii), is vastgesteld dat zij waarschijnlijk besmet zijn, volgens de in bijlage VI, punt 3, beschreven adequate methoden worden vernietigd of gedesinfecteerd. Dergelijke voorwerpen worden na desinfectie niet langer als besmet beschouwd.

4. Onverminderd de maatregelen die krachtens de leden 1, 2 en 3 van dit artikel worden genomen, bepalen de lidstaten dat in de overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), en punt c), onder iii), afgebakende zone een reeks maatregelen wordt genomen, zoals gespecificeerd in bijlage VI, punten 4.1 en 4.2. De nadere bijzonderheden van deze maatregelen worden ieder jaar aan de andere lidstaten en aan de Commissie medegedeeld. De daarbij verstrekte gegevens kunnen aan het comité worden voorgelegd.

Artikel 7

1. De lidstaten schrijven voor dat pootaardappelen moeten voldoen aan de in Richtlijn 77/93/EEG vervatte eisen en in rechte lijn moeten afstammen van in het kader van een officieel goedgekeurd programma verkregen aardappelmateriaal dat bij officiële of onder officieel toezicht verrichte onderzoeken waarbij de overeenkomstige in bijlage II bedoelde methode is gevolgd, vrij van het organisme is bevonden.

Bovenbedoelde onderzoeken worden door een lidstaat verricht:

- a) wanneer bevestigd is dat het organisme is aangetroffen in de pootaardappelenproductie van de betrokken lidstaat,
 - i) door middel van onderzoek van de daaraan voorafgaande generaties, met inbegrip van de oorspronkelijke kloonsselectie, en systematisch onderzoek van de basispootgoedklonen, of
 - ii) wanneer vastgesteld is dat er geen klonale verwantschap bestaat, door middel van onderzoek van alle basispootgoedklonen of de daaraan voorafgaande generaties, met inbegrip van de oorspronkelijke kloonsselectie, en
- b) in andere gevallen: op elke plant van de oorspronkelijke kloonsselectie of op representatieve monsters van het basispootgoed of van de aan het basispootgoed voorafgaande generaties.

2. Volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG kunnen worden vastgesteld:

- de nadere toepassingsbepalingen van lid 1, tweede alinea, onder a);
- de bepalingen betreffende de representatieve monsters als bedoeld in lid 1, tweede alinea, onder b).

Artikel 8

Het in bezit hebben van en het werken met het organisme wordt door de lidstaten verboden.

Artikel 9

Onverminderd het bepaalde in Richtlijn 77/93/EEG, mogen de lidstaten toestaan dat voor experimenten, voor wetenschappelijke doeleinden of voor selectiewerkzaamheden wordt afgeweken van het bepaalde in de artikelen 6 en 8 van deze richtlijn, overeenkomstig het bepaalde in Richtlijn 95/44/EG van de Commissie⁽¹⁾.

Artikel 10

De lidstaten mogen voor hun eigen productie aanvullende of strengere maatregelen vaststellen wanneer dit nodig is om het organisme te bestrijden of om verspreiding ervan te voorkomen, voorzover die maatregelen in overeenstemming zijn met het bepaalde in Richtlijn 77/93/EEG.

De nadere bijzonderheden van die maatregelen worden ter kennis gebracht van de andere lidstaten en de Commissie. De daarbij verstrekte gegevens kunnen aan het comité worden voorgelegd.

Artikel 11

De op grond van de stand van wetenschap of techniek in de bijlagen bij deze richtlijn aan te brengen wijzigingen worden vastgesteld volgens de procedure van artikel 16 bis van Richtlijn 77/93/EEG. Voor de in bijlage II vastgestelde methoden en de in de punten 4.1 en 4.2 van bijlage VI bij de onderhavige richtlijn vastgestelde maatregelen, stelt de Commissie een verslag op, waarbij zij deze methoden en maatregelen opnieuw bekijkt in het licht van de opgedane ervaring; dit verslag wordt vóór 1 januari 2002 aan het comité voorgelegd.

Artikel 12

1. De lidstaten doen de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om met ingang van 21 augustus 1999 aan deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onverwijld in kennis.

Wanneer de lidstaten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van de bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden vastgesteld door de lidstaten.

2. De lidstaten delen de Commissie onverwijld alle belangrijke bepalingen van intern recht mee die zij op het onder deze richtlijn vallende gebied vaststellen. De Commissie stelt de andere lidstaten daarvan in kennis.

⁽¹⁾ PB L 184 van 3.8.1995, blz. 34. Richtlijn laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 97/46/EG (PB L 204 van 31.7.1997, blz. 43).

Artikel 13

Gedaan te Brussel, 20 juli 1998.

Deze richtlijn treedt in werking op de dag van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Artikel 14

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

Voor de Raad
De Voorzitter
W. MOLTERER

BIJLAGE I

DEEL I

Lijst van gastheerplanten van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. als bedoeld in artikel 1

Planten (inclusief knollen) van <i>Solanum tuberosum</i> L., met uitzondering van zaden	Aardappelen
Planten van <i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karsten ex Farw., met uitzondering van vruchten en zaden	Tomaten

DEEL II

Onderzoeken

1. Bij de officiële onderzoeken als bedoeld in artikel 2, lid 2, onder a), moet worden uitgegaan van de biologische eigenschappen van het organisme en de specifieke productiemethoden in de betrokken lidstaat; de onderzoeken moeten het volgende omvatten:
 - i) voor aardappelen:
 - op daartoe geschikte tijdstippen, visueel onderzoek van het ongeogoste gewas en/of nemen van monsters, tijdens de vegetatieperiode of tijdens de opslag, van zowel pootaardappelen als andere aardappelen. De knollen die als monster zijn genomen, worden doorgesneden en officieel onder officieel toezicht visueel onderzocht,
 - en
 - voor pootaardappelen en, zo nodig, voor andere aardappelen, officiële of onder officieel toezicht uit te voeren laboratoriumtests, waarbij de methode van bijlage II wordt gebruikt;
 - ii) voor tomaten:
 - visueel onderzoek, op daartoe geschikte tijdstippen, van ten minste de voor herplanting voor professioneel gebruik bestemde ongeogoste tomatenplanten, op daartoe geschikte tijdstippen.
2. De in artikel 2, lid 3, bedoelde kennisgeving van de officiële onderzoeken dient het volgende te bevatten:
 - i) voor onderzoeken met betrekking tot aardappelen:
 - een raming van het totale teeltareaal, zowel pootaardappelen als andere aardappelen (in ha);
 - een uitsplitsing van de gegevens in klassen van pootaardappelen en consumptieaardappelen, en, zo nodig, naar gebied;
 - het aantal monsters dat voor onderzoek is genomen, en het tijdstip waarop zij zijn genomen;
 - het aantal op het veld uitgevoerde visuele onderzoeken;
 - het aantal op knollen uitgevoerde visuele onderzoeken (en omvang van het monster);
 - ii) voor onderzoeken met betrekking tot ten minste voor herplanting voor professioneel gebruik bestemde ongeogoste tomatenplanten:
 - een raming van het totale aantal planten;
 - het aantal visuele onderzoeken;
 - iii) voor onderzoeken met betrekking tot andere gastheerplanten dan aardappelen en tomaten, met inbegrip van in het wild voorkomende nachtschadeachtigen die als gastheerplant kunnen optreden:
 - soort;
 - aantal en tijdstip van genomen monsters;
 - bemonsterd gebied/bemonsterde rivier, al naar gelang van het geval;
 - analysemethode;
 - iv) voor onderzoeken met betrekking tot water en vloeibaar afval van bedrijven voor industriële verwerking of verpakking:
 - aantal en tijdstip van genomen monsters;
 - bemonsterd gebied/bemonsterde rivier/bemonsterde bedrijfsterreinen, al naar gelang van het geval;
 - analysemethode.

BIJLAGE II

ONDERZOEKSMETHODE VOOR DE DIAGNOSE, DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN
RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUUCHI ET AL.

OMVANG VAN DE ONDERZOEKSMETHODE

De onderzoeksmethode beschrijft de verschillende procedures die betrokken zijn bij de:

- i) diagnose van bruinrot in aardappelknollen en van verwelkingsziekte in aardappel- en tomatenplanten;
- ii) detectie van *Ralstonia solanacearum* in monsters aardappelknollen;
- iii) identificatie van *Ralstonia solanacearum*.

In de aanhangsels worden bijzonderheden verstrekt voor de bereiding van het materiaal voor de toetsen, met name groeimedium, buffers, oplossingen en reagentia.

INHOUD

DEEL I:	Toepassing van de onderzoeksmethode	9
	1. Diagnose van bruinrot in aardappelknollen en van verwelkingsziekte in aardappel- en tomatenplanten	9
	2. Detectie en identificatie van <i>Ralstonia solanacearum</i> in monsters aardappelknollen	11
DEEL II:	Diagnose van bruinrot in aardappelknollen en van verwelkingsziekte in aardappel- en tomatenplanten	13
	1. Symptomen	13
	2. Snelle screeningstoets(en)	13
	3. Isolatieprocedure	14
	4. Bevestigingstoets(en)	14
DEEL III:	Detectie en identificatie van <i>Ralstonia solanacearum</i> in monsters aardappelknollen ..	17
	1. Voorbereiding van het te onderzoeken monster	17
	2. Immunofluorescentie (IF)-toets	18
	3. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (Elisa)-toets	20
	4. Polymerase Chain Reaction (PCR TM)-toets	20
	5. Selectieve uitplating	22
	6. Biotoets	23
	7. Aanrijkingstoets	23
	8. Pathogeniciteitstoets	23
	<i>Aanhangsel 1:</i> Voedingsbodems voor isolatie en kweek van <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
	<i>Aanhangsel 2:</i> Materialen ter voorbereiding van een monster	25
	<i>Aanhangsel 3:</i> Materialen voor de IF-toets	26
	<i>Aanhangsel 4:</i> Bepaling van het besmettingsniveau in de IF-toets	27
	<i>Aanhangsel 5:</i> Materialen voor de Elisa-toets	28
	<i>Aanhangsel 6:</i> Materialen voor de PCR-toets	29
	<i>Aanhangsel 7:</i> Materialen voor de selectieve uitplating- en aanrijkingstoetsen	29
	Literatuurverwijzingen	30

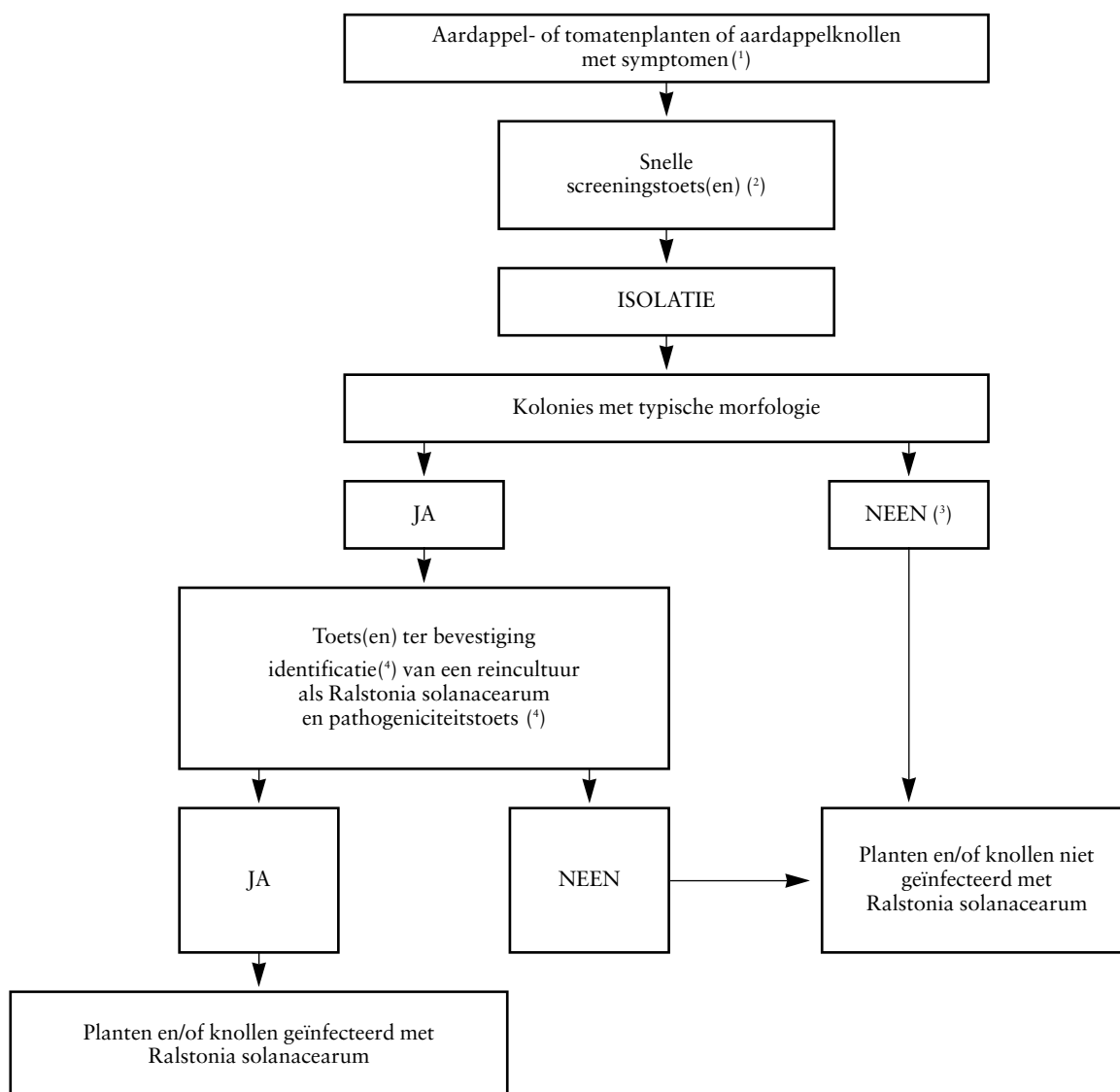
DEEL I

TOEPASSING VAN DE ONDERZOEKSMETHODE

1. Diagnose van bruinrot in aardappelknollen en van verwelkingsziekte in aardappel- en tomatenplanten

Deze toetsprocedure is bedoeld voor aardappelknollen met symptomen die kenmerkend of verdacht zijn voor bruinrot, en voor aardappel- en tomatenplanten met symptomen die kenmerkend of verdacht zijn voor verwelkingsziekte. Ze omvat een snelle screeningstoets, isolatie van het pathogeen uit geïnfecteerd vaatweefsel op diagnostische media en, in geval van een positieve uitslag, identificatie van de cultuur als *Ralstonia solanacearum*.

Weergave in stroomdiagram



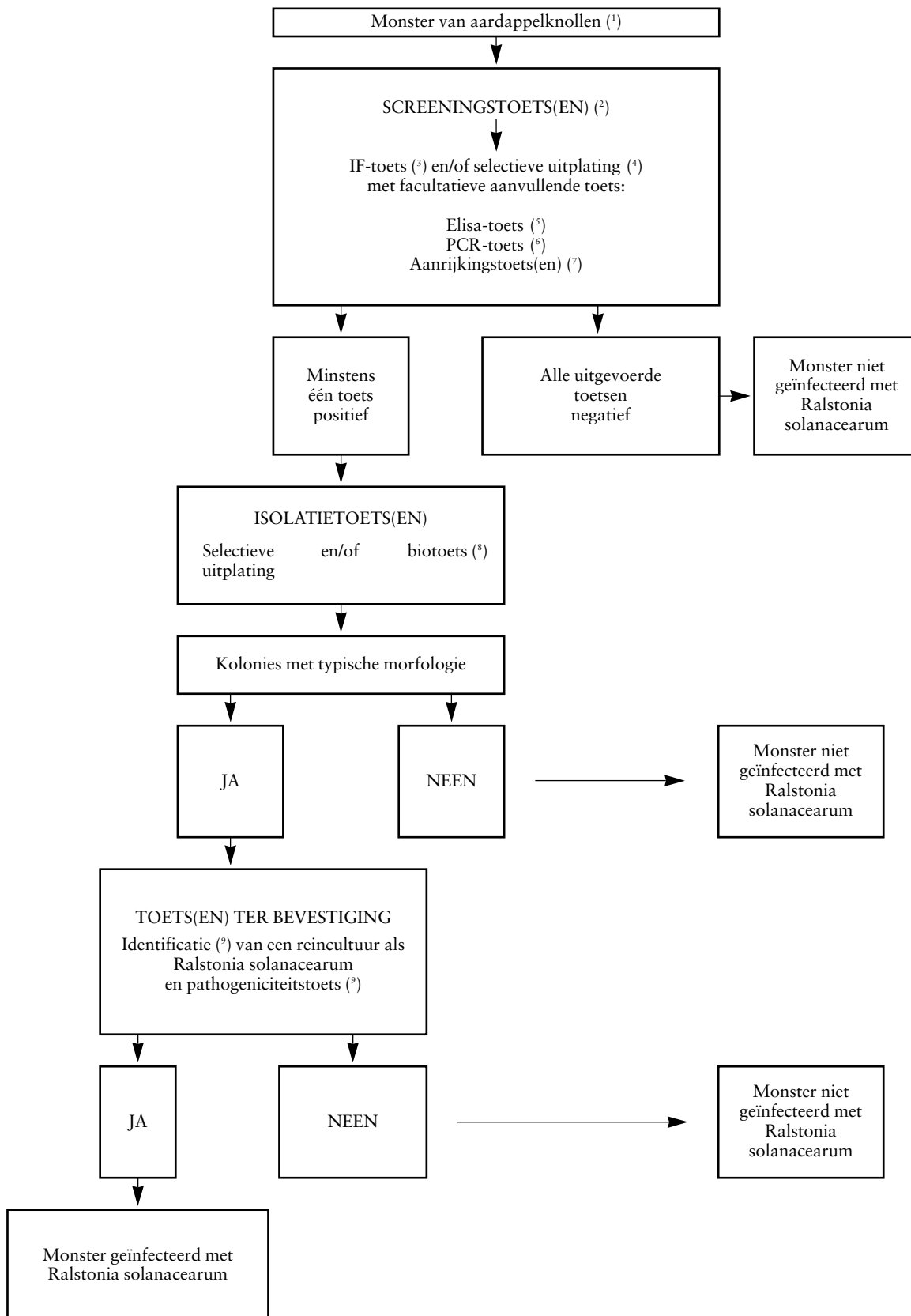
Referenties in stroomdiagram

- (¹) Beschrijving van symptomen wordt gegeven in deel II.1.
- (²) Snelle screeningstoetsen maken een voorlopige diagnose mogelijk.
Geschikte toetsen zijn:
 - Slijmradentoets met vaatweefsel uit de stengel (deel II.2)
 - Onderzoek op poly- β -hydroxybutyraatkorrels (deel II.2)
 - IF-toets (deel III.2)
 - Elisa-toets (deel III.3)
 - PCR-toets (deel III.4).
- (³) Hoewel isolatie van het pathogeen uit plantenmateriaal met typische symptomen door middel van de verdunningsplaatmethode betrekkelijk eenvoudig is, kan het kweken uit vergevorderde infectiestadia mislukken. Saprophytische bacteriën die op aangetast weefsel groeien, kunnen het pathogeen op het isolatiemedium overwoekeren of remmen. Als de isolatietoets negatief is maar de ziekteverschijnselen typisch zijn, moet de isolatie worden herhaald, bij voorkeur door selectieve uitplating.
- (⁴) Een betrouwbare identificatie van een reïncultuur van *Ralstonia solanacearum* wordt verkregen met minstens één van de in deel II.4.1 vermelde toetsen, in combinatie met een pathogeniciteitstoets (deel II.4.3). Stamkarakterisatie is facultatief maar wordt voor elk nieuw geval aanbevolen.

2. Detectie en identificatie van *Ralstonia solanacearum* in monsters aardappelknollen

Deze toetsprocedure is bedoeld voor opsporing van latente infecties in aardappelknollen met een of liefst meer screeningstoets(en) die, indien positief, worden bevestigd door de isolatie van het pathogeen. In geval van isolatie van typische kolonies wordt de procedure vervolgd door identificatie van een reïncultuur als *Ralstonia solanacearum*.

Weergave in stroomdiagram



*Referenties in stroomdiagram***(1) Monstergrootte**

De standaardmonster grootte is 200 knollen. Nochtans is de procedure ook goed toepasbaar voor monsters van minder dan 200 knollen.

(2) Screeningstoets(en)

Eén enkele toets is mogelijk niet voldoende gevoelig of betrouwbaar om *Ralstonia solanacearum* in een monster te detecteren. Daarom wordt meer dan één toets aanbevolen. Die dienen bij voorkeur gebaseerd te zijn op verschillende biologische principes.

(3) Immunofluorescentie (IF)-toets

De IF-toets (indirecte methode) is een zeer gangbare screeningstoets. Dat is een voordeel boven andere toetsen die nog niet geheel ontwikkeld of gevalideerd zijn. Deze toets wordt ingezet voor vele andere quarantaine- en kwaliteitsbacteriën, zoals *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Met de in deze methode gespecificeerde afleesparameters is het een gevoelige test. De detectiegrens is 10^3 - 10^4 cellen per ml aardappel extractpellet.

De kritische factor voor de betrouwbaarheid van het toetsresultaat is de kwaliteit van het antiserum. Alleen een antiserum met een hoge titer (minimaal 2 000 voor het ruwe antiserum) is aanvaardbaar en alle toetsen moeten worden uitgevoerd bij de antiserumtiter of één verdunning onder de titer. De indirecte methode geniet de voorkeur. De directe methode kan worden toegepast als het niveau van de gevoeligheid en specificiteit van de toets gelijkwaardig is aan die van de indirecte methode.

De IF-toets heeft het voordeel van subjectieve interpretatie van de celmorfologie en de intensiteit van de fluorescentie, die informatie geven over de specificiteit van de reactie. Er zijn immers kruisreacties mogelijk door serologisch verwante bodembacteriën of door in aardappelweefsels voorkomende bacteriën met celmorfologie van *Ralstonia solanacearum*. De IF-toets kan als enige screeningstoets worden ingezet. Indien kruisreacties worden vermoed, moet een aanvullende screeningstoets worden uitgevoerd die op een verschillend biologisch principe gebaseerd is. In dergelijke gevallen is selectieve uitplating aangewezen.

(4) Selectieve uitplating

Met het gemodificeerde SMSA-medium en de in deze methode gespecificeerde toetsmethodiek is selectieve uitplating een gevoelige en selectieve toets voor *Ralstonia solanacearum*. Het resultaat is drie tot zes dagen na de voorbereiding van het monster beschikbaar. Het pathogeen wordt rechtstreeks in de cultuur verkregen en kan daarna snel worden geïdentificeerd. Om het potentieel van deze toets ten volle te benutten moeten er zeer zorgvuldig kleine navelinden worden geprepareerd om te vermijden dat secundaire, met aardappelknollen geassocieerde bacteriën in het extract terechtkomen. Deze kunnen met *Ralstonia solanacearum* op het medium competitie aangaan en de ontwikkeling en groei van het pathogeen verstoren. Sommige stammen van *Ralstonia solanacearum* kunnen een zwakke groei vertonen want de bestanddelen van het medium kunnen ook het doelorganisme beïnvloeden. Voorzichtigheid is daarom geboden om *Ralstonia solanacearum* te onderscheiden van andere bacteriën die zich op het medium kunnen ontwikkelen. Selectieve uitplating kan als enige screeningstoets worden gebruikt. Indien een negatief toetsresultaat wordt verkregen en remming van *Ralstonia solanacearum* door andere bacteriën op het medium wordt vermoed, dan moet een aanvullende screeningstoets uitgevoerd worden ter bevestiging of weerlegging van dat resultaat. In dergelijke gevallen is de IF-toets aangewezen.

(5) Elisa-toets

Algemeen is de Elisa-toets minder gevoelig dan de IF-toets (de detectiegrens is 10^4 - 10^5 cellen per ml aardappel extractpellet). De toets is echter snel en goedkoop maar kent doorgaans meer vals-positieve (kruisreacties) resultaten en vals-negatieve (remming door fenolmoleculen in het aardappel extract) resultaten. De specificiteit van het antiserum moet bijzonder hoog zijn. De Elisa-toets kan niet als de enige screeningstoets worden ingezet.

(6) PCR-toets

PCR is potentieel geschikt voor een zeer gevoelige detectie, maar de toets wordt gemakkelijk door bestanddelen in planten- of knolextracten geremd waardoor een vals-negatieve uitslag wordt bekomen. Bepaalde aardappelcultivars bevatten meer remstoffen dan andere. Derhalve is het nodig die remstoffen te verwijderen. De remming kan door verdunning van het extract worden gereduceerd, maar daarbij wordt ook het aantal *Ralstonia solanacearum* bacteriën verdund. In alle stadia van de voorbereiding van het monster en van de toets is grote omzichtigheid geboden om besmetting te vermijden die vals-positieve resultaten met zich zou brengen. Ook organismen met homologe DNA-sequenties kunnen dergelijke vals-positieve resultaten uitlokken. Om die redenen kan de directe PCR-test niet als enige screeningstoets worden ingezet.

(7) Aanrijkingsstoets

Incubatie van de aardappel extractpellet in een semiselectieve bouillon, zoals de gemodificeerde SMSA-bouillon, maakt vermeerdering van *Ralstonia solanacearum* mogelijk. Misschien is het nog belangrijker dat hierdoor potentiële remmers van de Elisa- en PCR-toets worden gereduceerd. Zo kan *Ralstonia solanacearum* in een aanrijkingsbouillon door middel van IF, Elisa en PCR worden gedetecteerd. Directe uitplating van de aangerijkte bouillons wordt ontraden. Deze aanrijkingsmethoden zijn namelijk nog niet grondig beproefd en getest. Zij worden hier vermeld omdat ze potentieel geschikt zijn, maar door de beperkte ervaring kunnen ze niet als de enige detectiemethoden worden gebruikt.

(8) Biottoets

De biotoots wordt ingezet voor isolatie van *Ralstonia solanacearum* uit aardappel extractpellets door selectieve aanrijking in een gevoelige waardplant zoals tomatenplanten of aubergines. De toets vereist optimale incubatievoorwaarden zoals in deze methode gespecificeerd. Bacteriën die op het gemodificeerd SMSA-medium een remmend effect op *Ralstonia solanacearum* hebben, verstoren deze toets hoogstwaarschijnlijk niet.

(9) Bevestigende toets(en)

Met minstens één van de in deel II.4.1 vermelde toetsen wordt, in combinatie met een pathogeniciteitstoets (deel II.4.3), een betrouwbare identificatie van een reïncultuur van *Ralstonia solanacearum* verkregen. Stamkarakterisatie is facultatief maar wordt voor elk nieuw geval aanbevolen.

DEEL II

DIAGNOSE VAN BRUINROT IN AARDAPPELKNOLLEN EN VAN VERWELKINGSZIEKTE IN AARDAPPEL- EN TOMATENPLANTEN

1. Symptomen

1.1. Symptomen bij de aardappel

De *aardappelplant*. Het eerste stadium van de infectie is verwelking van de bladeren nabij de kop van de plant bij hoge temperaturen overdag met herstel gedurende de nacht. De verwelking wordt snel onomkeerbaar en eindigt in het afsterven van de plant. Het vaatweefsel in dwars doorgesneden stengels van verwelkte planten kan bruin verkleurd zijn en een melkachtig slijm verschijnt spontaan op het snijvlak of kan gemakkelijk uit het snijvlak naar buiten worden geperst. Wanneer een doorgesneden stengel verticaal in water wordt gezet, stromen er na korte tijd draden bacterieslijm uit de open vaatbundels.

De *aardappelknol*. Aardappelknollen moeten dicht bij het navelende (stoloon) dwars doorgesneden worden. Het eerste infectiestadium is een glazig gele tot lichtbruine verkleuring van de vaatbundelring, waaruit na enkele minuten een roomkleurig bacterieslijm naar buiten treedt, hetzij spontaan hetzij na licht aandrukken met de duimen op de schil bij het snijvlak. Later wordt de vaatverkleuring duidelijker bruin en kan de necrose zich tot in het parenchymateuze weefsel uitstrekken. In vergevorderde stadia van infectie breekt het slijm uit het navelende en de ogen naar buiten. Er ontstaan roodbruine, iets verzonken laesies op de schil, van waaruit bacterieslijm sijpelt dat bodemdeeltjes doet vasthechten.

1.2. Symptomen bij de tomaat

De *tomatenplant*. Het eerste zichtbare symptoom is dat de jongste bladeren er slap bijhangen. Indien de omgevingsfactoren gunstig zijn voor het pathogene agens (bodemtemperatuur ongeveer 25°C, verzadigde luchtvochtigheid) volgen na enige dagen epinastie en verwelking, eenzijdig of van de gehele plant, waarna deze volledig inzakt. Bij minder gunstige omgevingsfactoren (bodemtemperatuur lager dan 21°C) kunnen zich aan de stengel grote aantallen bijwortels ontwikkelen. Langs de stengel kan een vettige ribbel worden waargenomen, die een teken is van necrose in het vaatstelsel. Als de stengel overdwars wordt doorgesneden, geeft het verkleurde bruine vaatweefsel van de stengel druppels wit of geelachtig bacterieslijm af.

2. Snelle screeningstoetsen

Een snelle screening vergemakkelijkt een voorlopige diagnose. Hiervoor kan een of meer van de volgende toetsen toegepast worden:

Slijmradentoets

De aanwezigheid van *Ralstonia solanacearum* in verwelkende aardappel- of tomatenstengels kan met de volgende oriënterende proef worden vastgesteld:

Snij de stengel vlak boven het bodemniveau af. Zet de stengel verticaal met het snijvlak in een bekersglas met water. Kort daarna zullen draden bacterieslijm spontaan uit de vaatbundels stromen. Geen enkele andere bacterie die in aardappel- of tomatenplanten een vaatinfectie veroorzaakt, zal dit verschijnsel vertonen.

Detectie van poly- β -hydroxybutiraat (PHB)-korrels

De PHB-korrels in de cellen van *Ralstonia solanacearum* worden door kleuring met nijlblauw A of soedanzwart B zichtbaar gemaakt.

Ga te werk als volgt:

Maak een uitstrijkje van het bacterieslijm of van het gesuspendeerde vaatweefsel op een microscoopglasje of maak een uitstrijkje van een 48-uurskweek op YPGA of SPA (aanhangel 1). Maak ook uitstrijkjes van een ras 3/biovar 2-stam als positieve controle en, indien nodig geacht, uitstrijkjes van heterologe bacteriestammen als negatieve controle. Laat de uitstrijkjes drogen aan de lucht. Haal de onderzijde van het glasje enkele malen snel door de vlam zodat de uitstrijkjes gefixeerd zijn.

Nijlblauwkleuring

1. Overgiet de gefixeerde uitstrijkjes met een 1% waterige oplossing van nijlblauw A. Laat de kleurstofoplossing gedurende 10 minuten bij 55°C inwerken.
2. Laat de kleuringsoplossing weglopen. Was eventjes in rustig stromend kraantjeswater. Verwijder overtollig water met papierdoek.
3. Overgiet de uitstrijkjes dan met een 8% waterige azijnzuuroplossing. Laat 1 minuut bij kamertemperatuur inwerken.
4. Was in rustig stromend kraantjeswater. Droog de glaasjes op papierdoek.
5. Herbevochtig de uitstrijkjes met een druppel water en breng een dekglasje aan.
6. Onderzoek de gekleurde uitstrijkjes met een epifluorescentiemicroscop bij 450 nm met olie-immersie bij een vergroting van 1 000 \times .

Kijk naar een helderoranje fluorescentie van PHB-korrels in de bacteriecellen. Controleer de uitstrijkjes ook onder doervallend natuurlijk licht om er zeker van te zijn dat de korrels zich wel degelijk in de cellen bevinden en natuurlijk dat de celmorfologie typisch is voor *Ralstonia solanacearum*.

Soedanzwartkleuring

1. Overgiet de gefixeerde uitstrijkjes met een 0,3 % soedanzwart B-oplossing in 70 % ethanol. Laat 10 minuten bij kamertemperatuur inwerken.
2. Laat de kleuringsoplossing weglopen. Was eventjes in kraantjeswater. Verwijder overtollig water met papierdoek.
3. Dompel de uitstrijkjes eventjes in xylol. Droog de glaasjes op papierdoek.
Voorzichtig! Xylol is een schadelijk product. Werk in een zuurkast.
4. Overgiet de uitstrijkjes met 0,5 % (w/v) waterige safranineoplossing en laat 10 seconden bij kamertemperatuur inwerken.
Voorzichtig! Safranine is een schadelijk product. Werk in een zuurkast.
5. Was in rustig stromend kraantjeswater. Droog de glaasjes op papierdoek. Breng een dekglaasje aan.
6. Onderzoek de gekleurde uitstrijkjes onder een microscoop met doorvallend licht met olie-immersie bij een vergroting van 1 000 ×.
PHB-korrels in cellen van *Ralstonia solanacearum* kleuren blauwzwart. De celwand kleurt roze.

Andere screeningstoetsen

Alternatieve screeningstoetsen zijn de IF-toets (deel III.2), de Elisa-toets (deel III.3) en de PCR-toets (deel III.4).

3. Isolatieprocedure

- 3.1. Verwijder bacterieslijm of secties verkleurd vaatweefsel uit de aardappelknol of uit de stengel van de aardappel- of tomatenplant en suspendeer dit in een klein volume steriel gedistilleerd water of steriele 50 mM fosfaatbuffer. Laat 5-10 minuten weken.
- 3.2. Maak van het maceraat een reeks decimale verdunningen, bijvoorbeeld 1/10 en 1/100 of meer indien nodig geacht.
- 3.3. Breng een standaardvolume van het maceraat en de aangemaakte verdunningen op een algemene voedingsbodem (NA, YPGA of SPA (aanhangsel 1)) en/of op Kelman's tetrazolium medium (aanhangsel 1) en/of op selectief SMSA-medium (aanhangsel 7). Verdeel het door middel van een geschikte verdunningsuitplatingstechniek. Indien nodig geacht, ent dan een stel afzonderlijke platen van elk gebruikt medium met een verdunde celsuspensiekweek van een virulente ras 3/biovar 2-stam van *Ralstonia solanacearum* als positieve controle.

Incubeer de platen gedurende drie dagen bij 28°C. De incubatietijd kan tot zes dagen verlengd worden bij zwakke groei. Op gemodificeerd SMSA-medium worden de kolonies van *Ralstonia solanacearum* bij langere incubatie vaak atypisch en sterven ze af.

Op een algemene voedingsbodem ontwikkelen virulente isolaten van *Ralstonia solanacearum* parelwitte, platte, onregelmatige en uitvloeiende kolonies, vaak met kenmerkende slierten.

Op Kelman's tetrazolium medium ontwikkelen virulente isolaten van *Ralstonia solanacearum* crèmekleurige, platte, onregelmatige en uitvloeiende kolonies met een oog van bloedrood gekleurde slierten.

Avirulente vormen van *Ralstonia solanacearum* ontwikkelen botervette dieprode kolonies.

Op het gemodificeerde SMSA-medium ontwikkelen virulente isolaten van *Ralstonia solanacearum* melkwitte, platte, onregelmatige en uitvloeiende kolonies met duidelijke rode tot purperen ogen. Avirulente vormen van *Ralstonia solanacearum* ontwikkelen minder uitvloeiende kolonies die volledig roze tot rood zijn.
- 3.5. Kweek kolonies met kenmerkende morfologie rein door een subcultuur op een algemene voedingsbodem. Vermijd regelmatig subcultiveren. Dit kan tot verlies van virulentie leiden.

4. Bevestigingstoetsen

4.1. *Identificatie van Ralstonia solanacearum*

Identificeer reïnculturen met ten minste één van de volgende procedures:

Voedingstests en enzymatische tests

Noot: Neem bij elke toets de geschikte controlestammen mee op.

Onderstaande fenotypische eigenschappen van *Ralstonia solanacearum* zijn universeel aan- of afwezig:

Fluorescerend pigment	-
PHB-insluitels	+
Oxydatie/Fermentatie (O/F)-test	O+/F-
Katalase	+
Kovacs' oxidase	+
Nitraatsvermindering	-
<hr/>	
Citraatassimilatie	+
Groei op 40 °C	-
<hr/>	
Groei in 1 % NaCl	+
Groei in 2 % NaCl	-
Argininedihydrolyse	-
Gelatinevervloeiing	-
Zetmeelhydrolyse	-
Aesculinehydrolyse	-
Levanvorming	-

Noot: Media en methoden zijn te vinden in Lelliott and Stead, 1987.

IF-toets

Maak een suspensie van 10^6 cellen per ml van de kweek en een positieve controlestam. Maak een reeks tweevoudige verdunningen van het antiserum. Pas de IF-procedure toe (deel III.2). De IF-titer van de kweek moet gelijkwaardig zijn aan die van de positieve controle.

Elisa-toets

Maak een suspensie van $> 10^6$ cellen per ml van de kweek en een positieve controlestam. Pas de Elisa-procedure toe (deel III.3). De Elisa-waarde van de kweek moet gelijkwaardig zijn aan die van de positieve controle.

PCR-toets

Maak een suspensie van 10^6 cellen per ml van de kweek en een positieve controlestam. Pas de PCR-procedure toe (deel III.4). Het PCR-product van de kweek moet dezelfde grootte en hetzelfde restrictie enzyme analyse (REA)-patroon hebben als die van de positieve controle.

Fluorescente in situ-hybridisatie (FISH)

Maak een suspensie van 10^6 cellen per ml van de kweek en een positieve controlestam. Pas de FISH-procedure toe (Van Beuningen et al., 1995) met de OLI-1 PCR-primer (Seal et al., 1993). De kweek moet dezelfde reactie vertonen als de positieve controle.

Maken van eiwitprofiel

Gedenatureerde eiwitten van hele cellen worden door middel van polyacrylamidegelelektroforese — PAGE (Stead, 1992a) gescheiden.

Maken van vetzuurprofiel (FAP)

Laat de kweek gedurende 48 uur bij 28 °C of trypticasesoja-agar groeien en pas de FAP-procedure toe (Janse, 1991; Stead, 1992a; Stead; 1992b). Het profiel van de kweek moet identiek zijn met dat van de positieve controle. Onder de aangegeven omstandigheden zijn 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH en 18:1 2OH kenmerkende vetzuren.

4.2. Stamkarakterisatie

Stamkarakterisatie is facultatief maar wordt voor elk nieuw geval aangeraden. Maak desgevallend gebruik van minstens één van de volgende procedures:

Bepaling van biovar

Ralstonia solanacearum wordt in biovars gescheiden op grond van het vermogen zuren te produceren uit drie hexosealcoholen en drie suikers (Hayward, 1964, 1994):

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Benutting van:					
— maltose	-	+	+	-	+
— lactose	-	+	+	-	+
— cellobiose	-	+	+	-	+
— mannitol	-	-	+	+	+
— sorbitol	-	-	+	+	-
— dulcitol	-	-	+	+	-

Aanvullende tests onderscheiden biovar 2 in subfenotypes (Hayward, 1994):

	Biovar 2	Biovar 2-A	Biovar 2-T
Benutting van trehalose	-	+	+
Benutting van inositol	+	-	+
Benutting van D-ribose	-	-	+
Pectinolyse Hildebrand medium	gering	gering	hoog

Bepaling van ras

Het ras (Buddenhagen et al., 1962) wordt bepaald op grond van een pathogeniciteitstest in tomatenplanten of aubergines en in tabaksplanten en aan de hand van een overgevoeligheidsreactie (OR) in tabaksbladeren (Lozano en Sequeira, 1970):

	Ras(*)		
	1	2	3
Reactie in:			
— tomatenplanten/aubergines	verwelking	geen reactie	verwelking
— tabaksplanten	verwelking	geen reactie	geen reactie
— tabaksbladeren	necrose (48 uur) en ver- welking (7-8 dagen)	OR (12-24 uur)	chlorose (2-8 dagen)

(*) Ras 4 (pathogeen voor gember en enkele andere waardplanten) en ras 5 (slechts pathogeen voor moerbeï) zijn niet opgenomen.

Bepaling van het ras door de pathogeniciteitstest of door de overgevoeligheidstest op tabak is niet steeds zeer betrouwbaar en kan in de plaats daarvan afgeleid worden uit de biovar en de natuurlijke waard waaruit de bacterie geïsoleerd werd.

De kweek kan verder worden gekarakteriseerd door:

„Fingerprinting” van het genoom

Moleculaire differentiatie van stammen in het *Ralstonia solanacearum*-complex kan plaatsvinden door middel van:

RFLP-analyse (Cook et al., 1989)

PCR van repetitieve DNA-sequenties [REP-, ERIC- & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995)]

4.3.

Pathogeniciteitstoets

Deze test is bedoeld als bevestiging van de identificatie en om de virulentie van de als *Ralstonia solanacearum* geïdentificeerde bacteriecultuur aan te tonen.

Maak een inoculum aan van 10^6 cellen per ml van de cultuur en een positieve controlestam. Inoculeer 5-10 tomatenplanten of aubergines, bij voorkeur in het derde volgroeide bladstadium of ouder (deel III.6) en incubeer de geënte planten tot twee weken bij een temperatuur van 22 tot 28 °C en hoge relatieve luchtvochtigheid. Geef dagelijks water. Controleer vanaf de vierde dag op verwelkingssymptomen en/of epinastie, vergeling, dwerggroei. Isoleer als volgt uit planten met symptomen:

— Verwijder een sectie van de stengel 2 cm boven het inoculatiepunt.

— Breng het over in een klein volume steriel gedistilleerd water of steriele 50 mM fosfaatbuffer en verdeel het in kleine stukjes. Plaats uit, incubeer en controleer op typische kolonies van *Ralstonia solanacearum*.

DEEL III

DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN RALSTONIA SOLANACEARUM IN MONSTERS AARDAPPELKNOLLEN

Noot: De standaardmonster grootte is 200 knollen. Nochtans is de procedure ook goed toepasbaar voor monsters van minder dan 200 knollen.

1. Voorbereiding van het te onderzoeken monster

Noot: De met deze procedure verkregen aardappel extractpellet kan ook worden gebruikt voor de detectie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Opties vóór het testen indien nuttig geacht:

- i) Incubeer het monster tot 14 dagen bij 25-30°C om de vermeerdering van lage *Ralstonia solanacearum*-populaties te bevorderen.
- ii) Was de knollen in stromend water met de aangewezen desinfectantia en reinigingsmiddelen. Laat de knollen aan de lucht drogen.

1.1. Verwijder met een schoon en gedesinfecteerd scalpel of aardappelschilmes de schil aan het navelende zodat de vaatweefsels net zichtbaar worden. Snij zorgvuldig een kegelvormige kern vaatweefsel (doorsnede 3-5 mm) uit het navelende van elke knol. Beperk de hoeveelheid niet-vaatweefsel tot een strikt minimum.

Behandel aldus iedere knol uit het monster.

Noot: In dit stadium kan het visuele onderzoek van de knollen (deel II.1) plaatsvinden. Houd elke knol met verdachte symptomen of met rotting apart en toets die afzonderlijk (deel II).

1.2. Verzamel de navelenden in een geschikte container en sluit deze af. De navelenden moeten bij voorkeur direct worden verwerkt. Als dat niet mogelijk is, bewaar ze dan hoogstens 24 uur — of bij 4°C niet langer dan 72 uur.

1.3. Verwerk de navelenden volgens één van onderstaande procedures:

- i) Breng de navelenden in een geschikt vaatje over.
Voeg een voldoende hoeveelheid maceratiebuffer toe (aanhangel 2) om de navelenden te bedekken.
Vermaal de navelenden in een Waring-menger of met Ultra Thurrax totdat ze net volledig gehomogeniseerd zijn. Vermijd overmatige homogenisatie.
Laat het maceraat dan 15-30 minuten weken.
- ii) Breng de navelenden in een geschikt vaatje over.
Voeg een voldoende hoeveelheid maceratiebuffer toe om de navelenden te bedekken.
Zet het vaatje op of in een roterende schudder.
Incubeer bij 50-100 toeren per minuut gedurende 4 uur bij 20-22°C of gedurende 16-24 uur bij 4°C.
- iii) Breng de navelenden over in een maceratiezakje (type Stomacherzakje met afmetingen van 105 mm × 150 mm, radiatiesteriel).
Maak de navelenden zorgvuldig fijn met een geschikt stuk gereedschap, bv. een hamer totdat ze net volledig gehomogeniseerd zijn.
Voeg een voldoende hoeveelheid maceratiebuffer toe om de fijngemaakte navelenden te bedekken.
Laat het maceraat dan 15-30 minuten weken.

1.4. Extraheer de bacteriën uit de verwerkte navelenden volgens één van onderstaande procedures:

- i) Giet het maceraat voorzichtig in een centrifugebuis over maar laat de stukjes in het vaatje of het zakje. Als het overgegoten maceraat troebel is centrifugeer dan bij niet meer dan 180 g gedurende 10 minuten bij een temperatuur onder de 10°C.
Centrifugeer het overgegoten maceraat of het supernatans van de eerste centrifugefase bij 7 000 g gedurende 15 minuten of bij 10 000 g gedurende 10 minuten bij een temperatuur onder de 10°C.
Giet dan het supernatans af zonder de pellet te verstoren.
- ii) Filter het maceraat door een filtersysteem met poriën van 40-100 µm.
Bevorder de filtratie door een vacuümpomp te gebruiken.
Verzamel het filtraat in een centrifugebuis.
Was de filter met maceratiebuffer.
Centrifugeer het filtraat bij 7 000 g gedurende 15 minuten of bij 10 000 g gedurende 10 minuten bij een temperatuur onder de 10°C.
Giet het supernatans af zonder de pellet te verstoren.

- 1.5. Resuspender de pellet in 1 ml pelletbuffer (aanhangel 2).
Verdeel in twee gelijke delen en breng elke fractie over in een microvaatje.
Gebruik één microvaatje voor de toetsen. Bewaar dit extract tijdens het onderzoek bij 4 °C.
Voeg 10-25 % (v/v) steriele glycerol aan het andere microvaatje toe. Meng door vortexen. Bewaar dit vaatje bij -18 °C (weken) of bij -70 °C (maanden).
2. **Immunofluorescentie (IF)-toets**
- Gebruik antiserum voor *Ralstonia solanacearum*, bij voorkeur tegen ras 3/biovar 2. Bepaal de titer op een suspensie van 10⁶ cellen per ml van de homologe stam van *Ralstonia solanacearum* met een geschikte verdunning van het fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC)-conjugaat, overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant. Het ruwe antiserum moet een IF-titer hebben van ten minste 1 : 2 000.
- Gebruik microscoopglasjes met meerdere venstertjes, bij voorkeur met tien venstertjes met een doorsnede van minstens 6 mm.
- Neem een FITC-conjugaatcontrole in elk objectglasje op. De test moet worden herhaald met inbegrip van een PHB-controletoets indien er in de FITC-controle ook maar één positieve cel wordt aangetroffen.
- Maak afzonderlijke positieve controleglasjes met een suspensie van 10⁶ cellen per ml van een geschikte ras 3/biovar 2-stam van *Ralstonia solanacearum*. Neem in elk stel tests één dergelijk glasje op.
- 2.1. Prepareer de objectglasjes volgens een van onderstaande procedures:
- i) Voor pellets met betrekkelijk weinig zetmeel:
Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is voor een venster met een doorsnede van 6 mm geschikt — vergroot het volume voor grotere vensters naar rato) van de geresuspendeerde pellet op een rijtje vensters. De andere rij kan als duplicaat worden gebruikt of voor een tweede monster als aangegeven in figuur 1.
- ii) Voor andere pellets:
Maak decimale oplossingen, dit wil zeggen 1/10, 1/100 en 1/1 000, van de geresuspendeerde pellet in pelletbuffer. Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is voor een venster met een doorsnede van 6 mm geschikt — vergroot het volume voor grotere vensters naar rato) van de geresuspendeerde pellet en van elke verdunning op een rijtje vensters. De andere rij kan als duplicaat worden gebruikt of voor een tweede monster als aangegeven in figuur 2.
- 2.2. Laat de druppels drogen. Fixeer de bacteriecellen op het glasje ofwel door te verwarmen, ofwel door door de vlam te halen ofwel door te flamberen met 95 % ethanol.
- 2.3. IF-werkwijze:
- i) Volgens het prepareren van objectglasjes in 2.1.i):
Maak een aantal tweevoudige verdunningen van het antiserum aan in IF-buffer (aanhangel 3), met name 1/4 van de titer (T/4), 1/2 van de titer (T/2), de titer (T) en tweemaal de titer (2T).
- ii) Volgens het prepareren van objectglasjes in 2.1.ii):
Maak de werkverdunning (WV) van het antiserum aan in IF-buffer. De werkverdunning is de verdunning van het antiserum met optimale specificiteit en is meestal de helft van de titer.

Figuur 1

Prepareren van het objectglasje volgens 2.1.i) en 2.3.i)

Standaardverdunning van geresuspendeerde pellet

$T = \text{titer}$

	FITC	T/4	T/2	T	2T	⇒ Tweevoudige verdunningen van antiserum
Monster 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicaat van monster 1 of monster 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

Figuur 2

Prepareren van het objectglaasje volgens 2.1.ii) en 2.3.ii)

	FITC	Standaardverdunding van antiserum				⇒ Decimale verdunding van geresuspendeerde pellet
	Onverdund	Onverdund	1/10	1/100	1/1 000	
Monster 1	● 1	● 2	● 3	● 4	● 5	
Duplicaat van monster 1 of monster 2	● 6	● 7	● 8	● 9	● 10	

2.3.1. Schik de microscoopglaasjes op vochtige papierdoek.

Bedek de testvenstertjes met de antiserumverdunding(en). Breng PBS aan op de FITC-vensters. Het op de venstertjes aangebrachte volume antiserum moet gelijkwaardig zijn aan het volume aangebracht extract.

2.3.2. Incubeer afgedekt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.

2.3.3. Schud de druppels antiserum van het glaasje af en spoel de glaasjes zorgvuldig met IF-buffer. Was 5 minuten in IF-buffer-Tween en vervolgens 5 minuten in IF-buffer (aanhangel 3).

Verwijder zorgvuldig de overmaat aan vocht.

2.3.4. Schik de microscoopglaasjes op vochtig vloeipapier.

Bedek alle venstertjes met de verdunding van het FITC-conjugaat die gebruikt werd om de titer van het antiserum te bepalen. Het op de venstertjes aangebrachte volume conjugaat moet identiek zijn met het volume aangebracht antiserum.

2.3.5. Incubeer afgedekt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur.

2.3.6. Schud de druppels conjugaat van het glaasje af. Spoel af en was als voorheen (in 2.3.3).

Verwijder zorgvuldig de overmaat aan vocht.

2.3.7. Pipetteer 5-10 μ l van 0,1M fosfaat gebufferde glycerol (aanhangel 3), of een gelijkwaardig inbedmiddel, op elk venstertje en breng een dekglasje aan.

2.4. Aflezen van de IF-toets

Onderzoek de glaasjes met een epifluorescentiemicroscopie die voorzien is van geschikte filters voor excitatie van FITC. Gebruik een geschikt olie-immersie objectief voor een totale vergroting van 500-1 000 x. Bekijk de venstertjes langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek.

Controleer eerst het positieve controleglaasje. De cellen moeten helder fluorescerend en volledig gekleurd zijn. *Noot:* De test moet herhaald worden bij afwijkende kleuring.

Lees de toetsglaasjes af. Kijk eerst uit naar fluorescerende cellen in de FITC-controlevenstertjes. Fluorescerende cellen in de FITC-controle wijst op specifieke binding van het conjugaat, autofluorescentie of contaminerende cellen van de testvenstertjes. *Noot:* De toets moet herhaald worden indien zulks wordt waargenomen.

Kijk vervolgens in de testvenstertjes uit naar helder fluorescerende cellen met een voor *Ralstonia solanacearum* kenmerkende morfologie. De intensiteit van de fluorescentie moet gelijkwaardig zijn aan die van de positieve controlestam bij dezelfde antiserumverdunding. Cellen met onvolledige kleuring of met een zwakke fluorescentie mogen genegeerd worden, tenzij er veel van dergelijke cellen zijn (zie verder).

Interpretatie van het resultaat van de IF-toets

- i) Wanneer geen helder fluorescerende cellen met een kenmerkende morfologie worden aangetroffen, is de IF-toets negatief.
- ii) Wanneer wel helder fluorescerende cellen met een kenmerkende morfologie worden aangetroffen, bepaal dan het gemiddeld aantal cellen per objectiefveld en bereken het aantal cellen (N) per ml geresuspendeerde pellet (aanhangel 4).

Een populatie van ongeveer 10^3 cellen per ml geresuspendeerde pellet wordt gezien als detectiegrens van de IF-toets:

- voor monsters met $N > 10^3$ cellen per ml is de IF-toets positief,
- voor monsters met $N < 10^3$ cellen per ml kan de IF-toets als positief worden beschouwd.

- iii) Wanneer relatief grote aantallen ($> 10^5$ cellen per ml) van onvolledig gekleurde of zwak fluorescerende cellen worden waargenomen op de titer van het antiserum dan moet
- hetzij een tweede toets uitgevoerd worden die gebaseerd is op een verschillend biologisch principe;
 - hetzij een tweede IF-toets uitgevoerd worden met een tweede, verschillend antiserum en/of een verdere verdunning van de geresuspendeerde pellet.

3. Elisa-toets

(Naar: Robinson-Smith et al., 1995)

Gebruik antiserum voor *Ralstonia solanacearum*, bij voorkeur tegen ras 3/biovar 2. Bepaal de titer op een suspensie van 10^6 cellen per ml van de homologe stam van *Ralstonia solanacearum*.

Aanbevolen wordt het gebruik van NUNC Polysorp-microtiterplaten.

Neem een negatieve aardappel-extractcontrole en een met fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS)-controle op.

Gebruik een suspensie van $> 10^6$ cellen per ml van de passende ras/biovarstam van *Ralstonia solanacearum* als positieve controle. Op eenzelfde manier als het (de) monster(s) onderzoeken, maar goed van de monsters op de microtiterplaat gescheiden houden.

- 3.1. Pipetteer 100-200 μ l geresuspendeerde pellet in een microvaatje.
Verwarm gedurende 4 minuten bij 100°C. Breng het microvaatje over op ijs.
- 3.2. Voeg een gelijk volume carbonaatcoatingbuffer van dubbele sterkte toe (aanhangel 5). Meng door vortexen.
- 3.3. Breng in elk van minstens twee putjes van de microtiterplaat 100 μ l van het mengsel aan. Incubeer 1 uur bij 37°C of overnacht bij 4°C.
- 3.4. Ledig de putjes. Was de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangel 5) en laat de laatste wasoplossing minstens 5 minuten in de putjes.
- 3.5. Maak de aangewezen verdunning van *Ralstonia solanacearum* antiserum in een buffer met blokkerend agens (aanhangel 5). Breng 100 μ l antiserumverdunning in de putjes aan.
Incubeer 1 uur bij 37°C.
- 3.6. Ledig de putjes. Was de putjes goed als voorheen (3.4).
- 3.7. Maak de aangewezen verdunning van alkalische-fosfataseconjugaat in een buffer met blokkerend agens. Breng 100 μ l conjugaatverdunning in de putjes aan.
Incubeer 1 uur bij 37°C.
- 3.8. Ledig de putjes. Was de putjes goed als voorheen (3.4 en 3.6).
- 3.9. Maak de alkalische-fosfatasesubstraatoplossing (aanhangel 5). Breng 100 μ l op de putjes aan en laat gedurende 30 minuten tot 1 uur in het donker bij kamertemperatuur incuberen.
- 3.10. Lees de absorptie bij 409 nm af.

Interpretatie van de uitslag van de Elisa-test

De Elisa-test is negatief als de optische dichtheid (OD) van het monster $<$ is dan $2 \times OD$ van de negatieve controle.

De Elisa-test is positief als de optische dichtheid van het monster $>$ is dan $2 \times OD$ van de negatieve controle.

4. PCR-toets

Naar: Seal et al., 1993

Noot: Er moet in alle stadia van de monsterbereiding en andere PCR-handelingen gebruik worden gemaakt van pipetpunten met filterprop.

Maak een suspensie van 10^6 cellen per ml van een ras 3/biovar 2-stam van *Ralstonia solanacearum* als positieve controle. Test overeenkomstig het (de) monster(s).

- 4.1. Pipetteer 100 μ l van de geresuspendeerde pellet in een microbuisje.

Alternatief: breng 90 μ l van de geresuspendeerde pellet over in een microvaatje, voeg 10 μ l 0,5 M NaOH toe en meng door het microvaatje herhaaldelijk om te keren.

- 4.2. Verhit 4 minuten bij 100 °C. Breng dan het microvaatje onmiddellijk over in ijs.
- 4.3. Maak ten minste twee decimale verdunningen, bv. 1/10 en 1/100 of meer indien nodig geacht, in steriel gedistilleerd of ultrapuur water (UPW).
- 4.4. Maak de PCR-mix (aanhangel 6) in een steriel vaatje door de volgende bestanddelen in onderstaande volgorde aan elkaar toe te voegen:

Voor een reactievolume van 50 μ l

Bestanddeel	Hoeveelheid	Eindconcentratie
Steriel gedistilleerd water of UPW	30,8 μ l-33,8 μ l	
10 \times PCR-buffer	5,0 μ l	1 \times
d-ATP	1,0 μ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-GTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-TTP	1,0 μ l	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Primer Y-2 (20 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Taq-polymerase (5E/ μ l)	0,2 μ l	1,0 E
Totaal volume	45 μ l-48 μ l	

Voor meer reacties

Bereken de hoeveelheid van elk bestanddeel voor het vereiste aantal reacties. Meng de bestanddelen en breng 45-48 μ l van het mengsel in steriele PCR-reactievaatjes over. Bewaar de vaatjes met de PCR-reactiemix in ijs.

Voor reactievolumes van 25 μ l: verminder de bestanddelen proportioneel.

- 4.5. PCR-amplificatie
- 4.5.1. Facultatief! Pulscentrifugeer de vaatjes met het verhitte extract en de positieve controle.
- Voeg in de aangegeven volgorde 2-5 μ l van het (de) monster(s), de watercontrole en de positieve controle aan de reactievaatjes met de PCR-mix toe. Plaats de vaatjes zorgvuldig in het verwarmingsblok van het PCR-apparaat.
- 4.5.2. Werk het volgende amplificatieprogramma af:
- één cyclus van:
- i) 2 minuten bij 96 °C: denaturatie van de DNA-strengen
- gevolgd door 50 cycli van:
- ii) 20 seconden bij 94 °C: denaturatie
 - iii) 20 seconden bij 68 °C: aanhechten van de primers
 - iv) 30 seconden bij 72 °C: polymerisatie van de kopie
- gevolgd door één cyclus van:
- v) 10 minuten bij 72 °C: verdere polymerisatie
- en eindig met één cyclus van:
- vi) incubatie op 4 °C
- Noot:* Deze parameters gelden voor een Perkin Elmer 9600. Andere PCR-apparaten kunnen een afdekking met minerale olie in de PCR-reactievaatjes en/of aanpassing van de duur van de fasen ii), iii) en iv) in het amplificatieprogramma nodig hebben.
- 4.5.3. Neem de reactievaatjes uit het PCR-apparaat voor analyse van het PCR-product. Indien analyse niet direct mogelijk is, bewaar dan de vaatjes bij 4 °C voor analyse binnen 24 uur of bij -18 °C voor later.

- 4.6. Analyse van het PCR-product

De PCR-fragmenten worden aangetoond door elektroforese in agarosegel en kleuring met ethidiumbromide.

- 4.6.1. Breng de gewenste hoeveelheid agarosegel langzaam aan de kook in tris-acetaat-elektroforese (TAE)-buffer.

- 4.6.2. Koel de gesmolten agaroseoplossing tot 50-60°C. Giet de oplossing in de vorm van het elektroforeseapparaat. Plaats de kam in de agaroseoplossing en laat stollen.
- 4.6.3. Verwijder de kam. Voeg TAE-buffer toe in het elektroforesebakje zodat de gel net (2-3 mm) met de buffer bedekt is.
- 4.6.4. Breng 3 µl druppels opbrengbuffer op parafilm. Voeg 12 µl van het PCR-product van de reactievaatjes van de monsters, de positieve controle en van de watercontrole toe en meng beide door behoedzame aspiratie in de pipetpunt. De opgegeven volumes kunnen aan de capaciteit van de putjes in de agarosegel worden aangepast.
- 4.6.5. Vul voorzichtig de putjes in de gel. Neem als referentie een geschikte DNA-merker in minstens één putje op.
- 4.6.6. Verbind de draden van de stroombron en het elektroforeseapparaat. Voer de elektroforese uit bij 5-8 V/cm totdat het merkerfront op ongeveer 1 cm van het einde van de gel is.
- 4.6.7. Schakel de stroombron uit. Ontkoppel de draden van het elektroforeseapparaat. Verwijder de gel zorgvuldig. Plaats de gel in de ethidiumbromideoplossing. Laat 30 tot 45 minuten inwerken. *Noot:* Draag bij het gebruik van ethidiumbromide, dat een krachtig mutageen is, te allen tijde wegwerphandschoenen!
- 4.6.8. Laat de gel gedurende 10-15 minuten in gedistilleerd water weken.
- 4.6.9. Maak het (de) geamplificeerde DNA-fragment(en) met UV-licht zichtbaar. Het PCR-product van *Ralstonia solanacearum* met de primers OLI-1 en Y-2 is 288 baseparen lang. Toets de lengte van de gevisualiseerde fragmenten aan de DNA-merker en aan de positieve controle. *Noot:* De watercontrole moet in ieder geval negatief zijn. Indien positief, dan moet de test overgedaan worden.
- 4.6.10. Fotografeer de gel indien een duurzame registratie van het analyseresultaat nodig is.
- 4.6.11. Bevestig de authenticiteit van het geamplificeerde fragment door restrictie-enzym-analyse (REA).
- 4.7. Restrictie-enzym-analyse (REA)
- 4.7.1. Breng 8,5 µl van het PCR-product (van 4.5.3) over in een microvaatje. Voeg 1 µl van 10 × enzymbuffer en 0,5 µl van het restrictie-enzym *Ava*II toe.
- 4.7.2. Meng de componenten door behoedzame aspiratie in een pipetpunt. Indien er druppels op de wanden van het microvaatje achterblijven, is een microcentrifugepuls wenselijk. Incubeer gedurende 1 uur bij 37°C.
- 4.7.3. Analyseer het behandelde PCR-product door agarosegelelektroforese zoals voorheen in 4.6.

Interpretatie van het resultaat van de PCR-toets

De PCR-toets is negatief indien het kenmerkende DNA-fragment van 288 bp niet gedetecteerd wordt en het fragment voor de positieve controlestam van *Ralstonia solanacearum* wel gedetecteerd wordt.

De PCR-toets is positief indien het kenmerkende DNA-fragment van 288 bp wordt gedetecteerd en de REA-analyse van het PCR-product identiek is met de positieve controlestam van *Ralstonia solanacearum*.

5. Selectieve uitplatingstoets

Naar: Elphinstone et al., 1996

- 5.1. Voer de test uit met een geschikte verdunningsuitplatingstechniek, bv.:
- Maak minstens twee decimale verdunningen, namelijk 1/10 en 1/100 of meer indien nodig geacht, van de geresuspendeerde pellet in pelletbuffer. Pipetteer een afgemeten standaardvolume (50-100 µl) van de geresuspendeerde pellet en elke verdunning op gemodificeerd SMSA-medium (aanhangel 7) en verspreid dit met een steriel glasstaafje over het hele oppervlak van het medium. Maak voorts, indien nuttig geacht, een verdunningsuitstrijk met een entoog met 10 µl van de geresuspendeerde pellet. De öse tussen de uitstrijken afvlammen.
 - Breng een afgemeten standaardvolume (50-100 µl) van de geresuspendeerde pellet op een plaat gemodificeerd SMSA-medium en verspreid dit met een steriel glasstaafje over het hele oppervlak van het medium. Strijk de staaf zonder afvlammen op nog twee andere platen gemodificeerd SMSA-medium.
- 5.2. Breng afzonderlijk met dezelfde verdunningsuitplatingstechniek een suspensie van 10⁶ cellen per ml van een ras 3/biovar 2-stam van *Ralstonia solanacearum* als positieve controle op een stel gemodificeerde SMSA-platen aan.
- 5.3. Incubeer de platen bij 28°C. Begin de platen na drie dagen af te lezen. Indien negatief, incubeer verder tot zes dagen. Virulente isolaten van *Ralstonia solanacearum* ontwikkelen melkwitte, platte, onregelmatige en vloeibare kolonies met duidelijke rode tot purperen centra, die interne streping of kransvorming vertonen.
- 5.4. Kweek de kolonies met kenmerkende morfologie rein door een subcultuur op een algemene voedingsbodem (aanhangel 1).

- 5.5. Identificeer reïnculturen (deel II.4.1) en bevestig *Ralstonia solanacearum* met een pathogeniciteitstest (deel II.4.3).

Interpretatie van het resultaat van de selectieve uitplatingstoets

De selectieve uitplatingstoets is negatief als er na zes dagen geen kolonies worden geïsoleerd of als er geen kenmerkende kolonies van *Ralstonia solanacearum* worden geïsoleerd, mits er geen aanwijzingen zijn van remming door kolonies van andere bacteriën, en mits er wel kenmerkende kolonies van *Ralstonia solanacearum* worden aangetroffen op de positieve controle.

De selectieve uitplatingstoets is positief als er wel kenmerkende kolonies van *Ralstonia solanacearum* worden geïsoleerd.

6. **Biotoets**

Naar: Janse, 1988

- 6.1. Neem voor elke toets tien proefplanten van een gevoelige tomaat- of auberginecultivar in het derde volgroeide bladstadium. Geef de proefplanten 24 uur voor enting geen water.
- 6.2. Verdeel 100 μ l van de geresuspendeerde pellet over de proefplanten. Inoculeer in de stengel tussen de kiemblaadjes en op een of meer andere plaatsen.
- 6.3. Inoculeer door dezelfde techniek tien zaailingen met een suspensie van 10^6 cellen per ml van een ras 3/biovar 2-stam van *Ralstonia solanacearum* als positieve controle en tien zaailingen met pelletbuffer als negatieve controle.
- Houd de positieve controleplanten gescheiden van de andere planten om besmetting te vermijden.
- 6.4. Incubeer de zaailingen verder tot vier weken bij een constante temperatuur van 22-28 °C en hoge relatieve luchtvochtigheid en geef dagelijks water. Let op het ontstaan van verwelking, epinastie, chlorose en/of verminderde groei.
- 6.5. Isoleer van geïnfecteerde planten (deel II). Identificeer reïnculturen met kenmerkende morfologie (deel II.4.1) en bevestig *Ralstonia solanacearum* met een pathogeniciteitstoets (deel II.4.3).
- 6.6. Controleer indien nodig geacht de afwezigheid van infectie in proefplanten die geen enkel teken van infectie vertonen. Neem van iedere proefplant een stukje van 1 cm van de stengel ter hoogte van 2 cm boven het inoculatiepunt. Homogeniseer de weefsels in maceratiebuffer en voer de selectieve uitplatingstoets uit (deel III.5.1). Indien positief, identificeer reïnculturen met kenmerkende morfologie (deel II.4.1) en bevestig *Ralstonia solanacearum* met een pathogeniciteitstoets (deel II.4.3).

Interpretatie van het resultaat van de biotoets

De biotoets is negatief indien de proefplanten niet met *Ralstonia solanacearum* geïnfecteerd zijn, en indien *Ralstonia solanacearum* wordt gedetecteerd in de positieve controle.

De biotoets is positief indien de proefplanten wel met *Ralstonia solanacearum* geïnfecteerd zijn.

7. **Aanrijkingstoets**

Naar: J.G. Elphinstone et al., 1996

- 7.1. Breng 100 μ l van de geresuspendeerde pellet over in 3 ml gemodificeerde SMSA-bouillon (aanhangel 7).
- 7.2. Incubeer gedurende minstens 48 uur, maar in ieder geval niet langer dan 72 uur, bij 28 °C met de dop los op het buisje met het oog op beluchting.
- 7.3. Druk de dop aan en vortex. Neem fracties voor de IF-toets (deel III.2), de Elisa-toets (deel III.3) en/of de PCR-toets (deel III.4).

8. **Pathogeniciteitstoets**

Zie deel II.4.3.

*Aanhangsel 1***Voedingsbodems voor het kweken van *Ralstonia solanacearum*****Glucose-nutriënt-agar**

Nutriënt-agar (Difco)	23 g
Gedistilleerd water	1 liter

Bereid hoeveelheden van een halve liter mediumvloeistof in kolven van 1 liter.

Los de bestanddelen op.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Tot 50 °C afkoelen. Platen gieten.

Gist-pepton-glucose-agar

Gistextract (Difco)	5 g
Bacto pepton (Difco)	5 g
D(+)-glucose (monohydraat)	10 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Gedistilleerd water	1 liter

Bereid hoeveelheden van een halve liter mediumvloeistof in kolven van 1 liter.

Los de bestanddelen op.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Tot 50 °C afkoelen. Platen gieten.

Sucrose-pepton-agar

Sucrose	20 g
Pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Gedistilleerd water	1 liter

Bereid hoeveelheden van een halve liter mediumvloeistof in kolven van 1 liter.

Los de bestanddelen op. Breng de pH zo nodig op 7,2-7,4.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Tot 50 °C afkoelen. Platen gieten.

Kelmans tetrazolium-medium

Cas-aminozuren (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Dextrose	5 g
Bacto agar (Difco)	15 g
Gedistilleerd water	1 liter

Bereid hoeveelheden van een halve liter mediumvloeistof in kolven van 1 liter.

Los de bestanddelen op. Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Tot 50 °C afkoelen.

Een via een filter gesteriliseerde waterige oplossing van trifenyltetrazoliumchloride (Sigma) toevoegen om een eindconcentratie van 50 mg per l te verkrijgen.

Platen gieten.

*Aanhangsel 2***Materialen voor voorbereiding van een monster**

Maceratiebuffer: 50 mM fosfaatbuffer, pH 7,0

Deze buffer wordt gebruikt voor maceratie van weefsel.

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Gedistilleerd water	1 liter

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Aliquot voorzover nodig geacht. Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Toevoeging van 5 % PVP-40 wordt bij de uitvoering van de directe PCR-test aanbevolen ter verlaging van de incidentie van amplificatieremming door aromatische moleculen in het extract.

Geadviseerd wordt een ontvlokingsmiddel, een antischuimmiddel of een antioxidant toe te voegen bij gebruik van de Waring-menger of de Ultra Turrax-homogenisatieprocedure voor maceratie van de aardappelweefselkernen.

Lubrol vlokken	0,5 g per l
DC siliconenantischuim	1,0 ml per l
Tetranatriumpyrofosfaat	1,0 g per l

Afzonderlijk in autoclaaf steriliseren. Aan de gewenste concentratie toevoegen.

Pelletbuffer: 10 mM fosfaatbuffer, pH 7,2

Deze buffer wordt gebruikt om de pellets van aardappelnaveleinden opnieuw te suspenderen en te verdunnen.

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	2,7 g
Na H ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0,4 g
Gedistilleerd water	1 liter

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Aliquot voorzover nodig geacht. Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

*Aanhangsel 3***Materialen voor de IF-toets**

IF-buffer: 10 mM met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,2

Deze buffer wordt gebruikt voor verdunning van antisera.

Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Gedistilleerd water	1 liter

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Aliquot voorzover nodig geacht.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

IF-buffer-Tween

Deze buffer wordt gebruikt voor het wassen van de glaasjes. Voeg 0,1 % Tween 20 aan de IF-buffer toe.

0,1 M met fosfaat gebufferd glycerol, pH 7,6

Deze buffer wordt gebruikt als inbedvloeistof op de vensters van het IF-glaasje om de fluorescentie te versterken.

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

—

*Aanhangsel 4***Bepaling van het besmettingsniveau met de IF-toets**

Oppervlakte (S) van het venster van een objectglas met meerdere vensters

$$= \frac{\pi D^2}{4}$$

waarin D = diameter van het venster. (1)

Oppervlakte (s) van het objectiefveld

$$= \frac{\pi d^2}{4}$$

waarin d = diameter van het veld. (2)

Bepaal door rechtstreekse meting of door berekening aan de hand van de volgende formule:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4} \quad (3)$$

waarin i = veldcoëfficiënt (hangt af van het type oculair en varieert van 8 tot 24),

K = buiscoëfficiënt (1 of 1,25),

G = (vergrotingsfactor (100 ×, 40 × enz.) van het objectief.

Uit (2) volgt

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}} \quad (4)$$

Uit (3) volgt

$$d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2 K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK}$$

Tel het aantal typische fluorescerende cellen per veld (c).

Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per venster (C).

$$C = c \frac{S}{s}$$

Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per ml pellet (N)

$$N = C \times \frac{1\,000}{y} \times F$$

waarin y = volume van het pellet op het venster,

F = pelletverdunningsfactor.

*Aanhangsel 5***Materialen voor de Elisa-toets**

Buffer met carbonaatcoating van dubbele sterkte, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Gedistilleerd water	1 liter

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Aliquot voorzover nodig geacht.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Als antioxidant kan natriumsulfiet in een eindconcentratie van 0,2% worden toegevoegd als het extract een hoge fractie aromatische moleculen bevat.

10 × met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
Gedistilleerd water	1 liter

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Aliquot voorzover nodig geacht.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121 °C.

Met fosfaat gebufferde fysiologische zoutoplossing — Tween (PBS-T)

10 × PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Gedistilleerd water	895 ml

Buffer met blokkerend agens (antistof) (moet vers bereid worden)

10 × PBS	10 ml
PVB (molecuulgewicht 44 000)	2 g
10 % Tween 20	0,5 g
Melkpoeder	0,5 g
Gedistilleerd water	100 ml

Alkalische-fosfatasesubstraatoplossing, pH 9,8

Diëthanolamine	97 ml
Gedistilleerd water	800 ml

Mengen en de pH met geconcentreerd HCl op 9,8 brengen.

Met gedistilleerd water tot 1 liter aanvullen.

0,2 g MgCl₂ toevoegen.

Per 15 ml oplossing twee fosfatasesubstraatabletten (Sigma) oplossen.

*Aanhangsel 6***Materialen voor de PCR-toets**

Oligonucleotidenvolgorde van de primer:

Primer OLI-1 5'-GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Voor materialen: zie Seal et al. (1993).

*Aanhangsel 7***Materialen voor selectieve uitplating- en aanrijkingstoetsen**

Selectief SMSA-medium (Engelbrecht, 1994, zoals door Elphinstone e.a. in 1996 gemodificeerd).

Basaal medium

Cas-aminozuren (Difco)	1 g
Bacto pepton (Difco)	10 g
Glycerol	5 ml
Agar (Difco)	15 g
Gedistilleerd water	1 liter

Bereid hoeveelheden van een halve liter mediumvloeistof in kolven van 1 liter.

Los de bestanddelen op en controleer de pH. Vóór sterilisatie in een autoclaaf de pH zo nodig op 6,5 brengen. *Ralstonia solanacearum* groeit niet goed op het medium bij een pH > 7,0.

Gedurende 15 minuten steriliseren in autoclaaf bij 121°C.

Tot 50°C afkoelen.

De volgende bestanddelen (alle van Sigma) toevoegen om de opgegeven eindconcentraties te verkrijgen:

Gentiaanviolet	5 mg per l		
Polymyxine B-sulfaat	100 mg per l	(ca. 600 000 eenheden)	Sigma P-1004
Bacitracine (*)	25 mg per l	(ca. 1 250 eenheden)	Sigma B-0125
Chlooramfenicol	5 mg per l		Sigma C-3175
Penicilline G	0,5 mg per l	(ca. 825 eenheden)	Sigma P-3032
Tetrazoliumzouten	50 mg per l		

Los de bestanddelen in 70% ethanol op tot de gegeven concentraties voor de hoeveelheid bereid medium. Sommige bestanddelen, namelijk polymyxine B en chlooramfenicol, moeten enigszins worden verwarmd en geschud.

SMSA-bouillon (Elphinstone et al., 1996)

Bereiden als voor het selectief SMSA-medium, maar zonder agar.

In 3 ml aliquots verdelen over 30 ml Universal wegwerpbuisjes.

(*) Indien nodig geacht, kan het aantal besmettelijke saprofytische bacteriën worden verminderd door de bacitracineconcentratie tot 300 delen per miljoen te verhogen, zonder dat daardoor de terugwinning van *Ralstonia solanacearum* wordt verminderd.

Literatuurverwijzingen

- Buddenhagen, I.W.; Sequeira, L. and Kelman, A., 1962. Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Cook, D.; Elizabeth B. and Sequeira L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 113-121.
- Dinesen I.G. and DeBoer, S.H., 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.
- Elphinstone, J.G.; Hennessy, J.; Wilson, J. and Stead, D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. *EPP0 Bulletin* 26.
- Engelbrecht, M.C., 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.
- Hayward, A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 265-277.
- Hayward, A.C., 1994. Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (eds. A.C. Hayward and G.L. Hartman) CAB International Oxford, 127-135.
- Janse, J.D., 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPP0 Bulletin* 18, 343-351.
- Janse, J.D., 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335-345.
- Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64, 293-695.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.* (T.F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. 216 pp.
- Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. and De Bruijn, F.J., 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 528-536.
- Lozano, J.C. and Sequeira, L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60, 838.
- Mirza, M.S.; Rademaker, J.W.L.; Janse, J.D. and Akkermans, A.D.L., 1993. Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1029-1034.
- Robinson-Smith, A.; Jones, P.; Elphinstone, J.G. and Forde, S.M.D., 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7, 67-79.
- Seal, S.E.; Jackson, L.A.; Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139, 1587-1594.
- Smith, J.J.; Offord, L.C.; Holderness, M. and Saddler, G.S., 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4262-4268.
- Stead, D.E., 1992a. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J.M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 76-111.
- Stead, D.E., 1992b. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 281-295.
- Van Beuningen, A.; Derks, H. and Janse J.D., 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in-situ hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2, 266-269.

BIJLAGE III

1. Voor elke vermoede aanwezigheid van het organisme waarvoor de screeningstest(s) voor het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal volgens de in bijlage II voor het betrokken product beschreven methode of, in alle andere gevallen, enige andere officieel erkende methode, een positieve uitkomst heeft opgeleverd en waarvoor de bevestiging of de weerlegging na de volledige uitvoering van genoemde methode nog wordt afgewacht, moeten:
 - waar mogelijk, de partij of het gedeelte daarvan (waaruit het monster is genomen) in de originele verpakking met label,
 - waar mogelijk, het resterende deel van de monsters,
 - het resterende extract en de daarbij gemaakte preparaten voor de screeningstest(s), bijvoorbeeld de immunofluorescentiepreparaten,
en
 - alle relevante documentatieworden bewaard totdat het onderzoek volgens genoemde methode is afgerond.
2. Ingeval de aanwezigheid van het organisme wordt bevestigd, wordt gedurende ten minste één maand na de kennisgeving krachtens artikel 5, lid 2, van deze richtlijn het volgende bewaard en adequaat geconserveerd:
 - het in punt 1 genoemde materiaal, en
 - een monster van het met de knol of het plantenextract geïnoculeerde tomaten- of auberginemateriaal, indien dit van nut is, en
 - de geïsoleerde cultuur van het organisme.

BIJLAGE IV

Het in artikel 5, lid 1, punt a), onder i), bedoelde onderzoek omvat, voorzover van belang, de volgende elementen:

- i) de productieplaats(en) waar,
 - aardappelen worden of zijn geteeld die klonaal verwant zijn aan de aardappelen waarvan is geconstateerd dat zij met het organisme besmet zijn;
 - tomaten worden of zijn geteeld uit dezelfde bron als die van tomaten die met het organisme besmet blijken te zijn;
 - aardappelen of tomaten worden of zijn geteeld die onder officieel toezicht zijn geplaatst omdat vermoed wordt dat het organisme erop voorkomt;
 - aardappelen worden of zijn geteeld die klonaal verwant zijn aan de aardappelen die zijn geteeld op productieplaatsen waarvan vermoed wordt dat zij besmet zijn met het organisme;
 - aardappelen of tomaten worden geteeld en die in de nabijheid zijn gelegen van besmette productieplaatsen, onder meer van productieplaatsen die op een of andere wijze rechtstreeks of via loonwerkbedrijven in contact kunnen zijn geweest met dezelfde landbouwmachines of productievoorzieningen;
 - voor irrigatie of bespuiting oppervlaktewater wordt gebruikt waarvan vermoed wordt of bevestigd is dat het besmet is met het organisme;
 - voor irrigatie of bespuiting oppervlaktewater wordt gebruikt dat ook wordt gebruikt voor productieplaatsen waarvan vermoed wordt of bevestigd is dat zij met het organisme besmet zijn;
 - overstroming plaatsheeft of heeft plaatsgevonden met oppervlaktewater waarvan vermoed wordt of bevestigd is dat het met het organisme is besmet;

en

- ii) oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor irrigatie, bespuiting of overstroming van velden of productieplaatsen waarvan bevestigd is dat zij met het organisme besmet zijn.

BIJLAGE V

1. De omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld in artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), en punt c), onder iii), wordt bepaald aan de hand van de volgende elementen, voorzover van belang:
 - het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal dat wordt geteeld op een krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde productieplaats;
 - de productieplaats(en) die via de teelt in contact kunnen zijn geweest met het overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde, in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, onder meer met productieplaatsen die op een of andere wijze rechtstreeks of via loonwerkbedrijven in contact kunnen zijn geweest met dezelfde landbouwmachines of productievoorzieningen;
 - het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, geproduceerd op de in bovenstaand streepje bedoelde productieplaats(en) of dat op dergelijke productieplaats(en) aanwezig was in de periode waarin het overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde, in de lijst opgenomen plantaardige materiaal aanwezig was op de in het eerste streepje bedoelde productieplaatsen;
 - de opslagplaatsen waar het van bovenbedoelde productieplaatsen afkomstige in de lijst opgenomen plantaardige materiaal is opgeslagen;
 - machines, voertuigen, vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en alle andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die met het overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde, in de lijst opgenomen plantaardige materiaal in contact kunnen zijn geweest;
 - in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat is opgeslagen in of in contact is geweest met in het vorige streepje genoemde voorwerpen of inrichtingen voordat die waren gereinigd en ontsmet;
 - op grond van de uitkomsten van de in artikel 5, lid 1, punt a), onder i), bedoelde onderzoeken en tests, voor aardappelen, knollen of planten met een klonale verwantschap via zuster- of uitgangsmateriaal en, voor tomaten, planten uit dezelfde bron als het overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde, in de lijst opgenomen plantaardige materiaal, en dat ondanks een negatief testresultaat waarschijnlijk besmet is door hieraan verwant materiaal;
 - de plaatsen waar het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal bedoeld in het voorgaande streepje wordt geteeld;
 - de plaatsen waar het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal wordt geteeld en waar voor irrigatie of bespuiting water wordt gebruikt dat overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt c), onder ii), besmet is verklaard;
 - in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat is geproduceerd op velden die overstromd zijn met oppervlaktewater waarvan bevestigd is dat het met het organisme is besmet.
2. Bij het bepalen van de mogelijke verspreiding als bedoeld in artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), en in artikel 5, lid 1, punt c), onder ii), wordt rekening gehouden met:
 - i) in de in artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), bedoelde gevallen:
 - de nabijheid van andere plaatsen waarop in de lijst opgenomen plantaardig materiaal wordt geteeld;
 - de gemeenschappelijke productie en het gemeenschappelijk gebruik van voorraden pootaardappelen;
 - het feit dat op de productieplaatsen oppervlaktewater voor irrigatie of bespuiting van het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal wordt gebruikt, wanneer er gevaar was of is geweest van oppervlaktewaterafvoer of overstroming van overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde productieplaatsen;
 - ii) in gevallen waarin het oppervlaktewater besmet is verklaard overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt c), onder ii):
 - de voor de teelt van in de lijst opgenomen plantaardig materiaal gebruikte productieplaatsen in de nabijheid van of met risico van overstroming door het besmet verklaarde oppervlaktewater;
 - aparte irrigatiereservoirs waarin het besmet verklaarde oppervlaktewater kan zijn terechtgekomen.

3. De in artikel 5, lid 2, eerste alinea, bedoelde kennisgeving moet de volgende gegevens bevatten:
 - de datum waarop de in artikel 4 bedoelde vermoede aanwezigheid is gemeld en de data van de in artikel 5 bedoelde bemonstering en bevestiging van de aanwezigheid van het organisme;
 - de gegevens met betrekking tot de besmetverklaring en de zoneafbakening.

 4. De in artikel 5, lid 2, tweede alinea, bedoelde aanvullende kennisgeving moet de volgende gegevens bevatten:
 - voor elke besmet verklaarde zending of partij aardappelen: naar gelang van het geval, de bij artikel 7 of 8 van Richtlijn 77/93/EEG voorgeschreven certificaten, het paspoort- of registratienummer van de aardappeltelers, collectieve opslagplaatsen en verzendingscentra;
 - voor elke besmet verklaarde zending of partij tomatenplanten: de bij artikel 7 of 8 van Richtlijn 77/93/EEG voorgeschreven certificaten en het paspoortnummer, overeenkomstig de in bijlage V, deel A, hoofdstuk I, punt 2.2, bij Richtlijn 77/93/EEG opgenomen lijst;
 - voor pootaardappelvoorraden en, indien mogelijk, ook in alle andere gevallen: de naam van het ras en de klasse;
 - alle andere door de Commissie verlangde informatie over de geconstateerde besmetting.
-

BIJLAGE VI

1. De in artikel 6, lid 1, bedoelde maatregelen zijn:
 - verbranding, of
 - gebruik als diervoer na een warmtebehandeling die het risico dat het organisme overleeft, uitsluit, of
 - op een stortplaats waar geen lekkage naar landbouwgrond of contact met water dat voor irrigatie van landbouwgrond kan worden gebruikt, mogelijk is, diep begraven, of
 - rechtstreekse en onverwijld levering, voor industriële verwerking, aan verwerkende bedrijven die over adequate afvalverwijderingsinstallaties beschikken die voldoen aan de in bijlage VII vastgestelde voorschriften, of
 - andere maatregelen, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden; van deze maatregelen moet onverwijld aan de Commissie en aan de andere lidstaten kennis worden gegeven.
2. Het in artikel 6, lid 2, bedoelde geëigende gebruik of de daarin bedoelde verwijdering, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de betrokken lidsta(a)t(en), waarbij moet worden gezorgd voor een adequate communicatie tussen de betrokken verantwoordelijke officiële instanties, teneinde te garanderen dat dergelijk toezicht te allen tijde plaatsvindt, alsmede voor goedkeuring door de verantwoordelijke officiële instantie van de lidstaat waar de aardappels verpakt of verwerkt moeten worden met betrekking tot de in het eerste en het tweede streepje bedoelde afvalverwijderingsinstallaties, omvat:
 - i) voor aardappelknollen:
 - gebruik als consumptieaardappelen welke dan moeten worden verpakt in inrichtingen met de nodige afvalverwijderingsinstallaties, waarbij rechtstreeks moet worden geleverd zonder dat de aardappelen nog worden omgepakt, of
 - gebruik als fabrieksaardappelen, waarbij rechtstreeks en onmiddellijk moet worden geleverd aan een verwerkend bedrijf met de nodige afvalverwijderingsinstallaties, of
 - enig ander gebruik dan wel verwijdering, op voorwaarde dat vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden, onder voorbehoud van goedkeuring door de genoemde verantwoordelijke officiële instanties; van dergelijke maatregelen dient onverwijld kennis te worden gegeven aan de Commissie en aan de andere lidstaten;
 - ii) voor andere plantendelen, met inbegrip van stukken stengel en blad:
 - vernietiging, of
 - enig ander gebruik dan wel verwijdering, op voorwaarde dat vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden; van dergelijke maatregelen dient kennis te worden gegeven aan de Commissie en aan de andere lidstaten.
3. De in artikel 6, lid 3, bedoelde voorwerpen moeten, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaten, worden ontsmet door ze te reinigen en, zo nodig, te desinfecteren op zulke wijze dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden.
4. De in artikel 6, lid 4, bedoelde maatregelen die door de lidstaten in de krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), en punt c), onder iii), afgebakende zones moeten worden uitgevoerd, omvatten:
 - 4.1. voor productieplaatsen die overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet zijn verklaard:
 - a) op een overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaard veld of besmet verklaarde eenheid voor beschutte teelt:

- i) gedurende ten minste vier teeltjaren na de besmetverklaring:
- maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten en ook andere gastheerplanten van het organisme zoals onder meer onkruid van de familie der nachtschadeachtigen te elimineren, en
 - een verbod op het poten, uitplanten of uitzaaien van:
 - aardappelknollen of -planten,
 - tomatenplanten en -zaad,
 - naar gelang van de biologische eigenschappen van het organisme,
 - andere gastheerplanten,
 - planten van de soort Brassica, waarvoor een aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme erin kan overleven,
 - gewassen waarvoor een aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich erdoor zou kunnen verspreiden;
 - in de eerste teeltperiode voor aardappelen en tomaten volgende op in bovenstaand streepje bedoelde periode, en op voorwaarde dat het veld gedurende ten minste twee opeenvolgende oogstjaren vóór de opplant vrij is bevonden van opslag van aardappel- en tomatenplanten, alsmede van andere gastheerplanten, inclusief onkruid van de familie der nachtschadeachtigen:
 - voor aardappelen: er mag alleen officieel gecertificeerd pootgoed worden gepoot en dan nog uitsluitend voor de teelt van consumptieaardappelen, en
 - een officieel onderzoek, inclusief tests, als aangegeven in artikel 2, lid 1;
 - in de aardappel- of tomatenteeltperiode volgende op de in bovenstaand streepje bedoelde periode en na een adequate vruchtwisselingscyclus, dienen, voor aardappelen, alleen officieel gecertificeerde pootaardappelen te worden gepoot voor de teelt van zowel poot- als consumptieaardappelen en dient, voor aardappelen en tomaten, een officieel onderzoek te worden uitgevoerd als bedoeld in artikel 2, lid 1,
- of
- ii) gedurende vijf teeltjaren na de besmetverklaring:
- maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten en ook andere gastheerplanten van het organisme zoals onder meer onkruid van de familie der nachtschadeachtigen te elimineren, en
 - maatregelen waarbij men het veld gedurende de eerste drie jaar ofwel in volle braak laat liggen, ofwel gebruikt voor de teelt van granen naar gelang van het vastgestelde risico, ofwel gebruikt als blijvend grasland dat kort wordt afgemaaid of intensief wordt begraasd, ofwel gebruikt voor de productie van graszaad, waarna gedurende twee jaar gewassen worden verbouwd die niet kunnen fungeren als gastheerplant voor het organisme en waarvoor er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme erin zou kunnen overleven of zich erdoor zou kunnen verspreiden;
 - in de eerste teeltperiode voor aardappelen of tomaten volgende op de in het bovenstaande streepje bedoelde periode:
 - voor aardappelen: er mag alleen officieel gecertificeerd pootgoed worden gepoot en dan nog uitsluitend voor de teelt van poot- of consumptieaardappelen, en
 - een officieel onderzoek, inclusief tests, als aangegeven in artikel 2, lid 1;
- b) op andere velden:
- in het teeltjaar volgende op de besmetverklaring van het veld of de inrichting:
 - een verbod om aardappelen te poten of aardappelplanten of andere gastheerplanten van het organisme te planten en maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten en ook andere gastheerplanten van het organisme zoals onder meer onkruid van de familie der nachtschadeachtigen te elimineren, of
 - voor aardappelknollen, poten van uitsluitend officieel gecertificeerd pootgoed voor de teelt van consumptieaardappelen, op voorwaarde dat ten genoeg van de verantwoordelijke officiële instanties kan worden aangetoond dat er geen risico bestaat voor opslag van aardappel- en tomatenplanten en andere gastheerplanten van het organisme zoals onder

meer onkruid van de familie der nachtschadeachtigen. Het ongeogoste gewas moet op daartoe geschikte tijdstippen worden gecontroleerd en opslag van aardappelplanten moet worden onderzocht op de aanwezigheid van het organisme; bovendien moeten voor aardappelen de geogoste knollen worden gecontroleerd;

- in de eerste teeltperiode volgende op de in het eerste streepje bedoelde periode:
 - voor aardappelen: poten van uitsluitend gecertificeerd pootgoed voor de teelt van zowel poot- als consumptieaardappelen;
 - in ten minste het tweede teeltjaar volgende op de in het eerste streepje bedoelde periode:
 - voor aardappelen: poten van uitsluitend officieel gecertificeerd pootgoed of pootgoed dat onder officieel toezicht uit officieel gecertificeerd pootgoed is voortgebracht, voor de teelt van zowel poot- als consumptieaardappelen;
 - in elk van de in bovenstaande streepjes bedoelde teeltjaren: maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten en ook andere gastheerplanten van het organisme zoals onder meer onkruid van de familie der nachtschadeachtigen te elimineren, en een officieel onderzoek als aangegeven in artikel 2, lid 1, alsmede, in gevallen waarin pootaardappelen worden gepoot voor de teelt van pootgoed, tests op de knollen;
- c) onmiddellijk na de besmetverklaring overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), en in elk van de daaropvolgende teeltperioden tot en met de periode waarin de teelt van aardappelen en tomaten op het (de) besmet verklaarde veld(en) als aangegeven onder punt a) voor het eerst is toegestaan:
- reiniging en, zo nodig, ontsmetting van alle machines en opslaginrichtingen op de plaats waar aardappelen en tomaten zijn geteeld, volgens de in punt 3 bedoelde adequate methoden;
 - officiële controles van irrigatie- en bespuitingsprogramma's, met, zo nodig, een verbod om te irrigeren of beregenen teneinde te voorkomen dat het organisme zich verspreidt;
- d) in een overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde eenheid voor beschutte teelt, waar het groeimedium volledig kan worden vervangen:
- verbod van opplant van aardappelknollen of -planten, of andere gastheerplanten van het organisme, en van inzaai van respectievelijk tomatenplanten en -zaad, tenzij in de inrichting, onder officieel toezicht, de nodige maatregelen zijn genomen om het organisme uit te roeien en alle plantaardig materiaal dat als gastheer kan fungeren, te vermijden, waarbij ten minste het groeimedium volledig is vervangen en de betrokken inrichting en alle materiaal is gereinigd en, zo nodig, ontsmet, en de verantwoordelijke officiële instanties daarna toestemming hebben gegeven om er aardappelen of tomaten te telen, en
 - voor de teelt van aardappelen: gebruik van officieel gecertificeerd pootgoed of miniknollen of van microplanten die afkomstig zijn van geteste bronnen;
 - officiële controles van irrigatie- en beregeningsprogramma's, met, zo nodig, een verbod om te irrigeren of te beregenen teneinde te voorkomen dat het organisme zich verspreidt;
- 4.2. in de afgebakende zones moeten de lidstaten, onverminderd de in punt 4.1 genoemde maatregelen:
- a) onmiddellijk, en gedurende ten minste drie teeltjaren na de besmetverklaring:
- aa) wanneer de afgebakende zone overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), is vastgesteld:
- ervoor zorgen dat hun verantwoordelijke officiële instanties toezicht houden op de bedrijfsterreinen of -inrichtingen waar aardappelen of tomaten worden geteeld, opgeslagen of behandeld en op bedrijven waar machines van loonwerkbedrijven worden gebruikt voor de teelt van aardappelen of tomaten;
 - voorschrijven dat machines en opslagsplaatsen op dergelijke bedrijven worden gereinigd en gedesinfecteerd volgens de in punt 3 aangegeven adequate methoden;

- bepalen dat in die zone uitsluitend gecertificeerd pootgoed of onder officieel toezicht geteeld pootgoed voor de aardappelteelt mag worden gebruikt, en dat pootgoed dat geteeld is op productieplaatsen die overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), „waarschijnlijk besmet” zijn verklaard, na de oogst onderzocht wordt;
 - voorschrijven dat in alle bedrijfsinrichtingen in de zone de voorraden geoogste pootaardappelen gescheiden worden gehouden van die van consumptieaardappelen;
 - een officieel onderzoek verrichten als omschreven in artikel 2, lid 1;
- ab) in gevallen waarin oppervlaktewater overeenkomstig artikel 5, lid 1, punt c), onder ii), besmet is verklaard of overeenkomstig bijlage V, punt 2, is opgenomen in de lijst van elementen voor de mogelijke verspreiding van het organisme:
- op de daartoe geschikte tijdstippen ieder jaar een onderzoek verrichten, inclusief een bemonstering van het oppervlaktewater en, zo nodig, van gastheerplanten van de familie der nachtschadeachtigen in de relevante waterbronnen, alsmede tests met
 - voor in de lijst opgenomen plantaardig materiaal: de toepasselijke methode, vermeld in bijlage II;
 - in de overige gevallen: een andere officieel goedgekeurde methode;
 - officiële controles uitvoeren op irrigatie- en beregeningsprogramma's, inclusief een verbod op het gebruik van besmet verklaard water voor irrigatie of bespuiting van in de lijst opgenomen plantaardig materiaal, teneinde te voorkomen dat het organisme zich verspreidt. Dit verbod kan opnieuw worden gezien op grond van de uitkomsten van voornoemd jaarlijks onderzoek;
 - wanneer vloeibaar afval besmet is verklaard, officiële controles uitvoeren op de afvoer van afval van de inrichtingen voor industriële verwerking of verpakking waar het in de lijst opgenomen materiaal wordt behandeld;
- b) indien relevant, een programma opstellen om de pootaardappelvoorraden binnen een passende termijn volledig te vervangen.
-

BIJLAGE VII

De officieel erkende afvalverwijderingsinstallaties, bedoeld in bijlage VI, punt 1, vierde streepje, moeten aan de volgende eisen voldoen om te voorkomen dat het organisme zich kan verspreiden:

- i) bij de verwerking van aardappelen en tomaten verkregen afval (onder meer uitschot van aardappelen, schillen en tomaten) en al het andere vaste afval dat met de aardappelen en tomaten in contact is geweest, moet:
 - op een stortplaats waar geen lekkage naar landbouwgrond of contact met water dat voor irrigatie van landbouwgrond kan worden gebruikt, mogelijk is, diep worden begraven. Het afval dient rechtstreeks naar de locatie te worden vervoerd, op zodanige wijze dat geen afval kan worden verloren, of
 - worden verbrand;
- ii) bij de verwerking ontstaan vloeibaar afval: vloeibaar afval dat gesuspendeerde vaste stoffen bevat moet, voordat het wordt verwijderd, worden gefilterd of een proces ondergaan waarbij dergelijke stoffen worden neergeslagen. De verkregen vaste stoffen moeten worden verwijderd als aangegeven onder i).

Het vloeibare wordt vervolgens:

- gedurende ten minste 30 minuten verhit tot minimaal 70°C voordat het wordt afgevoerd, of
 - op een andere officieel goedgekeurde wijze onder officieel toezicht verwijderd zodat er geen risico bestaat dat het afval in contact kan komen met landbouwgrond of met water dat voor de irrigatie van landbouwgrond zou kunnen worden gebruikt. Nadere bijzonderheden over die maatregelen worden aan de andere lidstaten en aan de Commissie medegedeeld.
-