

RICHTLIJN 2006/63/EG VAN DE COMMISSIE

van 14 juli 2006

tot wijziging van de bijlagen II tot en met VII bij Richtlijn 98/57/EG van de Raad betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 98/57/EG van de Raad van 20 juli 1998 betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* ⁽¹⁾, en met name op artikel 11,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, het pathogene agens van bruinrot bij aardappelen en tomaten (hierna „het organisme” genoemd), is een van de belangrijkste schadelijke organismen voor deze gewassen.
- (2) Het organisme komt nog in bepaalde delen van de Gemeenschap voor.
- (3) Bij Richtlijn 98/57/EG zijn uitvoerige maatregelen vastgesteld die in de lidstaten moeten worden genomen om het organisme te lokaliseren en de verspreiding ervan te bepalen, het optreden en de verspreiding ervan te voorkomen en, waar het wordt aangetroffen, verspreiding ervan te voorkomen en het te bestrijden met het oog op uitroeiing.
- (4) Sindsdien zijn het inzicht in de biologie van het organisme en de detectie- en identificatiemethoden aanzienlijk verbeterd. Verder moeten diverse technische bepalingen betreffende de bestrijdingsmaatregelen opnieuw worden bezien naar aanleiding van de ervaringen in de praktijk.
- (5) In verband met deze ontwikkelingen moeten de maatregelen in bepaalde bijlagen bij Richtlijn 98/57/EG worden herzien en bijgewerkt.
- (6) Wat de detectie- en identificatiemethoden betreft, worden de FISH-test (fluorescentie-in-situ-hybridisatie), een moderne detectiemethode, verbeteringen aan de PCR-test (polymerasekettingreactie) en aan diverse technische

onderdelen van de huidige detectie- en identificatiemethode, en methoden ter detectie en identificatie van het organisme in andere waardplanten dan aardappel en in water en grond in de richtlijn opgenomen.

- (7) Ten aanzien van de technische aspecten van de bestrijdingsmaatregelen worden betere bepalingen vastgesteld voor de wijze van bewaring van de geteste monsters met het oog op de traceerbaarheid, de elementen die nodig zijn om de omvang van de waarschijnlijke besmetting te bepalen, de gegevens van de kennisgeving van de bevestigde aanwezigheid van het organisme en van de besmette zone, alsmede de maatregelen die in besmet verklaarde productieplaatsen en in de afgebakende zones moeten worden genomen. Daarnaast worden enkele bepalingen opgenomen voor tomaten om meer recht te doen aan het belang van deze plant als waard voor het organisme.
- (8) De in deze richtlijn vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Plantenziektkundig Comité,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De bijlagen II tot en met VII bij Richtlijn 98/57/EG worden vervangen door de overeenkomstige teksten in de bijlage bij deze richtlijn.

Artikel 2

1. De lidstaten dienen uiterlijk op 31 maart 2007 de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen vast te stellen en bekend te maken om aan deze richtlijn te voldoen. Zij delen de Commissie de tekst van die bepalingen onverwijld mee, alsmede een tabel ter weergave van het verband tussen die bepalingen en deze richtlijn.

Zij passen die bepalingen toe vanaf 1 april 2007.

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

⁽¹⁾ PB L 235 van 21.8.1998, blz. 1.

2. De lidstaten delen de Commissie onmiddellijk de belangrijkste bepalingen van intern recht mede die zij op het onder deze richtlijn vallend gebied vaststellen.

Artikel 3

Deze richtlijn treedt in werking op de derde dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Unie*.

Artikel 4

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 14 juli 2006.

Voor de Commissie
Markos KYPRIANOU
Lid van de Commissie

BIJLAGE

„BIJLAGE II

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

OVERZICHT VAN DE ONDERZOEKSMETHODE

Deze onderzoeksmethode beschrijft de verschillende procedures voor:

- i) de diagnose van bruinrot in aardappelknollen en aardappel-, tomaten- en enkele andere waardplanten;
- ii) de detectie van *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) in monsters van aardappelknollen, aardappel- en tomatenplanten en andere waardplanten, water en grond;
- iii) de identificatie van *R. solanacearum*.

INHOUD

	<i>Bladzijde</i>
	Algemene beginselen
	40
DEEL I	Toepassing van de onderzoeksmethode
	40
	1. Stroomdiagram voor de diagnose van bruinrot (<i>R. solanacearum</i>) in aardappelknollen en aardappel-, tomaten- en andere waardplanten met symptomen van bruinrot
	40
	2. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in monsters van symptoomloze aardappelknollen
	43
	3. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in monsters van symptoomloze aardappel-, tomaten- en andere waardplanten
	46
DEEL II	Methoden voor de detectie van <i>R. solanacearum</i> in aardappelknollen en aardappel-, tomaten- en andere waardplanten met symptomen van bruinrot
	48
	1. Symptomen
	48
	2. Snelle screeningstests
	48
	3. Isolatieprocedure
	49
	4. Identificatietests voor <i>R. solanacearum</i>
	49
DEEL III	1. Methoden voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in monsters van symptoomloze aardappelknollen
	49
	1.1. Bereiding van de monsters
	49
	1.2. Testmethode
	51
	2. Methoden voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in monsters van symptoomloze aardappel-, tomaten- en andere planten
	51
	2.1. Bereiding van de monsters
	51
	2.2. Testmethode
	52
DEEL IV	1. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in water
	53
	2. Methoden voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in water
	55
	2.1. Bereiding van de monsters
	55
	2.2. Testmethode
	55
DEEL V	1. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in grond
	56
	2. Methoden voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i> in grond
	58
	2.1. Bereiding van de monsters
	58
	2.2. Testmethode
	58

	Bladzijde
DEEL VI	
Geoptimaliseerde protocollen voor de detectie en identificatie van <i>R. solanacearum</i>	58
A. Diagnose en detectie	58
1. Slijmradentest	58
2. Detectie van poly- β -hydroxybutyraatkorrels	58
3. Serumagglutinatietests	59
4. Selectieve isolatie	60
4.1. Selectieve uitplating	60
4.2. Ophopingsprocedure	60
5. Immunofluorescentietest (IF-test)	61
6. Polymerasekettingreactietest (PCR-test)	64
6.1. DNA-zuiveringsmethoden	65
a) Methode volgens Pastrik (2000)	65
b) Andere methoden	65
6.2. PCR	66
6.3. Analyse van het PCR-product	66
7. Fluorescentie-in-situ-hybridisatietest (FISH-test)	67
8. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)-tests	69
a) Indirecte ELISA	69
b) DASI (Double-Antibody Sandwich Indirect)-ELISA	70
9. Bioassay	71
B. Identificatietests	72
1. Voedingstests en enzymatische identificatietests	72
2. IF-test	72
3. ELISA-test	73
4. PCR-test	73
5. FISH-test	73
6. Vetzuurprofiel (FAP)	73
7. Stamkarakterisatie	73
7.1. Biovarbepaling	73
7.2. Genetische vingerafdruk	74
7.3. PCR-methoden	74
C. Bevestigingstest	74
Aanhangsel1 Bij de optimalisering en validering van de protocollen ingeschakelde laboratoria	76
Aanhangsel2 Isolatie- en kweekmedia voor <i>R. solanacearum</i>	77
Aanhangsel3 A) In de handel verkrijgbaar gestandaardiseerd controlemateriaal	79
B) Bereiding van positieve en negatieve controles voor de screeningstests (PCR/IF en FISH)	80
Aanhangsel4 Buffers voor testprocedures	82
Aanhangsel5 Bepaling van het besmettingsniveau met de IF- en de FISH-test	85
Aanhangsel6 Gevalideerde PCR-protocollen en -reagentia	86
Aanhangsel7 Gevalideerde reagentia voor de FISH-test	91
Aanhangsel8 Aubergine- en tomatenteelt	93
Literatuurverwijzingen	94

ALGEMENE BEGINSELEN

In de aanhangsels worden geoptimaliseerde protocollen voor de verschillende methoden, gevalideerde reagentia, en nadere bijzonderheden betreffende de bereiding van analyse- en controlemateriaal beschreven. Aanhangsel 1 bevat een lijst van laboratoria die bij de optimalisering en validering van de protocollen zijn betrokken.

Aangezien de protocollen betrekking hebben op de detectie van een quarantaineorganisme en daarbij levensvatbare culturen van *R. solanacearum* als controlemateriaal gebruikt worden, moeten de procedures onder adequate quarantaineomstandigheden met de nodige faciliteiten voor afvalverwijdering worden uitgevoerd en moeten de officiële autoriteiten voor plantenquarantaine de vereiste vergunningen hebben verstrekt.

De testparameters moeten zodanig zijn dat *R. solanacearum* bij de drempelwaarden die voor de gekozen methoden zijn vastgesteld op consistente en reproduceerbare wijze gedetecteerd wordt.

Het is essentieel dat de positieve controlemonsters zorgvuldig bereid worden.

Om de tests met de vereiste drempelwaarden te kunnen verrichten moet verder de apparatuur juist ingesteld, in goede staat van onderhoud en geijkt zijn, moeten de reagentia zorgvuldig gehanteerd en bewaard worden en moeten alle maatregelen worden genomen om kruisbesmetting tussen de monsters te voorkomen; zo moeten de positieve controlemonsters gescheiden van de analysemonsters bewaard worden. Er moeten kwaliteitsbewakingsnormen worden toegepast om administratieve en andere fouten te vermijden, met name bij de etikettering en documentatie.

Een vermoede aanwezigheid als bedoeld in artikel 4, lid 2, van Richtlijn 98/57/EG betekent dat een positieve uitslag is verkregen bij een diagnostische of screeningstest op een monster zoals aangegeven in de stroomdiagrammen. Een positieve eerste screeningstest (IF, PCR/FISH, selectieve isolatie) moet met een tweede, op andere biologische principes gebaseerde screeningstest worden bevestigd.

Als de eerste screeningstest positief is, wordt besmetting met *R. solanacearum* vermoed en moet een tweede screeningstest worden uitgevoerd. Is de tweede screeningstest ook positief, dan wordt het vermoeden bevestigd (vermoede aanwezigheid) en moeten de tests volgens de onderzoeksmethode worden voortgezet. Als de tweede screeningstest negatief is, wordt aangenomen dat het monster niet met *R. solanacearum* besmet is.

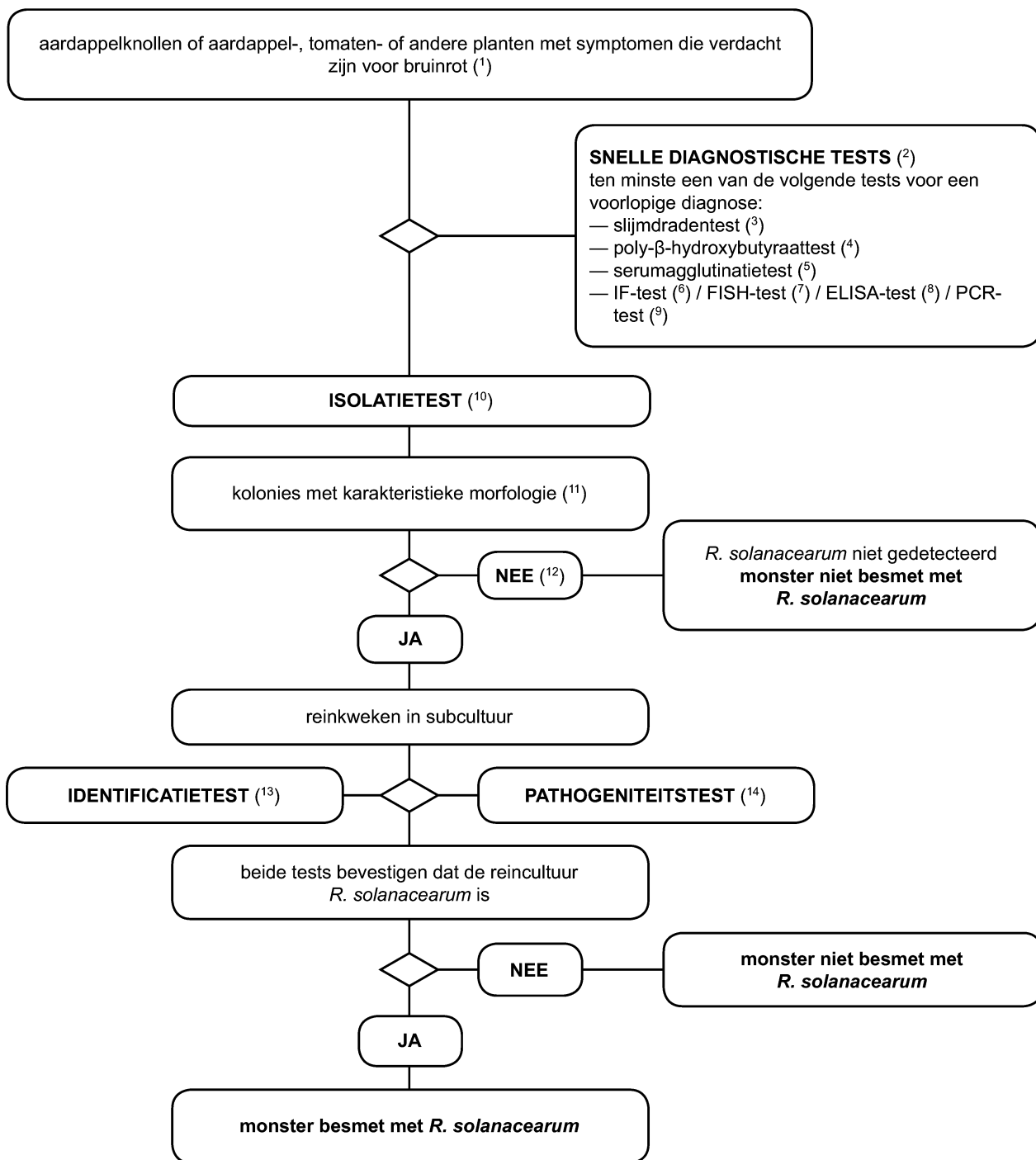
Onder bevestigde aanwezigheid als bedoeld in artikel 5, lid 1, van Richtlijn 98/57/EG wordt verstaan dat een reïncultuur van *R. solanacearum* is geïsoleerd en geïdentificeerd en de pathogeniteit ervan bevestigd is.

DEEL I

TOEPASSING VAN DE ONDERZOEKSMETHODE

1. Stroomdiagram voor de diagnose van bruinrot (*R. solanacearum*) in aardappelknollen en aardappel-, tomaten- en andere waardplanten met symptomen van bruinrot

De testprocedure is bedoeld voor aardappelknollen en -planten met symptomen die karakteristiek zijn voor bruinrot of een vermoeden daarvan doen rijzen. Ze omvat een snelle screeningstest, isolatie van het pathogeen uit geïnfecteerd vaatweefsel op (selectief) medium en, in geval van een positieve uitslag, identificatie van de cultuur als *R. solanacearum*.



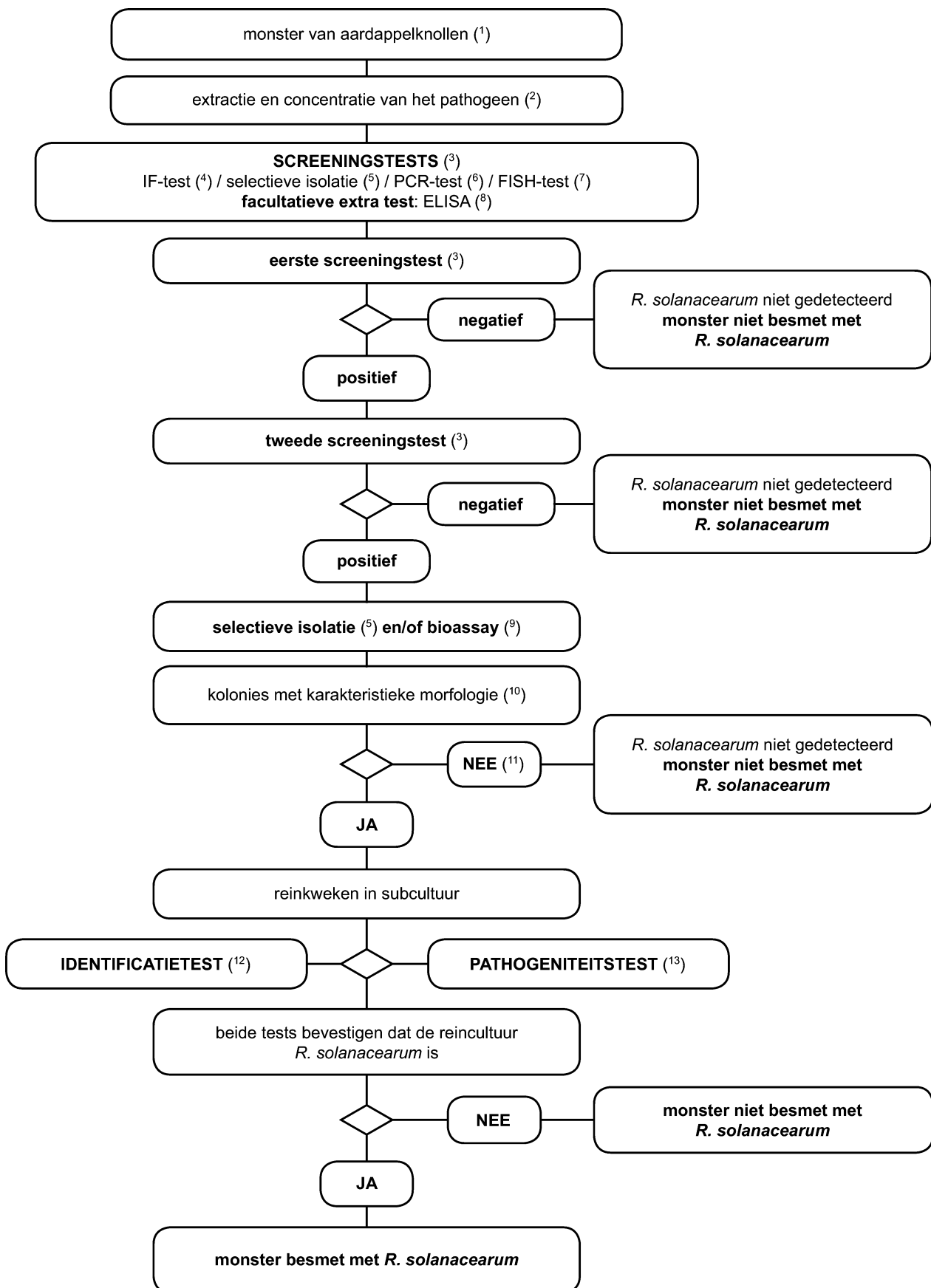
- (¹) De symptomen worden onder II.1 beschreven.
- (²) Snelle diagnostische tests zijn nuttig voor een voorlopige diagnose, maar zijn niet essentieel. Een negatieve uitslag is geen garantie dat het pathogeen niet aanwezig is.
- (³) De slijmradentest wordt onder VI.A.1 beschreven.
- (⁴) De poly- β -hydroxybutyraatetest wordt onder VI.A.2 beschreven.
- (⁵) Serumagglutinatietests op bacterieslijm of extract van weefsel met symptomen worden onder VI.A.3 beschreven.
- (⁶) De IF-test op in water gesuspendeerd bacterieslijm of extract van weefsel met symptomen wordt onder VI.A.5 beschreven.
- (⁷) De FISH-test op in water gesuspendeerd bacterieslijm of extract van weefsel met symptomen wordt onder VI.A.7 beschreven.
- (⁸) De ELISA-test op in water gesuspendeerd bacterieslijm of extract van weefsel met symptomen wordt onder VI.A.8 beschreven.
- (⁹) De PCR-test op in water gesuspendeerd bacterieslijm of extract van weefsel met symptomen wordt onder VI.A.6 beschreven.
- (¹⁰) Meestal kan het pathogeen door verdunnen en uitplaten makkelijk uit plantenmateriaal met symptomen worden geïsoleerd (II.3).
- (¹¹) De karakteristieke koloniemorfologie wordt onder II.3.d beschreven.
- (¹²) Kweken uit vergevorderde infectiestadia kan mislukken wegens concurrentie van of overwoekering door saprofytische bacteriën. Als de isolatietest negatief is maar de ziekteverschijnselen karakteristiek zijn, moet de isolatie worden herhaald, bij voorkeur door selectieve uitplating.
- (¹³) Met de tests onder VI.B worden reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd. Subspecifieke karakterisering is niet verplicht, maar voor nieuwe gevallen wel aanbevolen.
- (¹⁴) De pathogeniteitstest wordt onder VI.C beschreven.

2. **Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in monsters van symptomloze aardappelknollen**

Principe

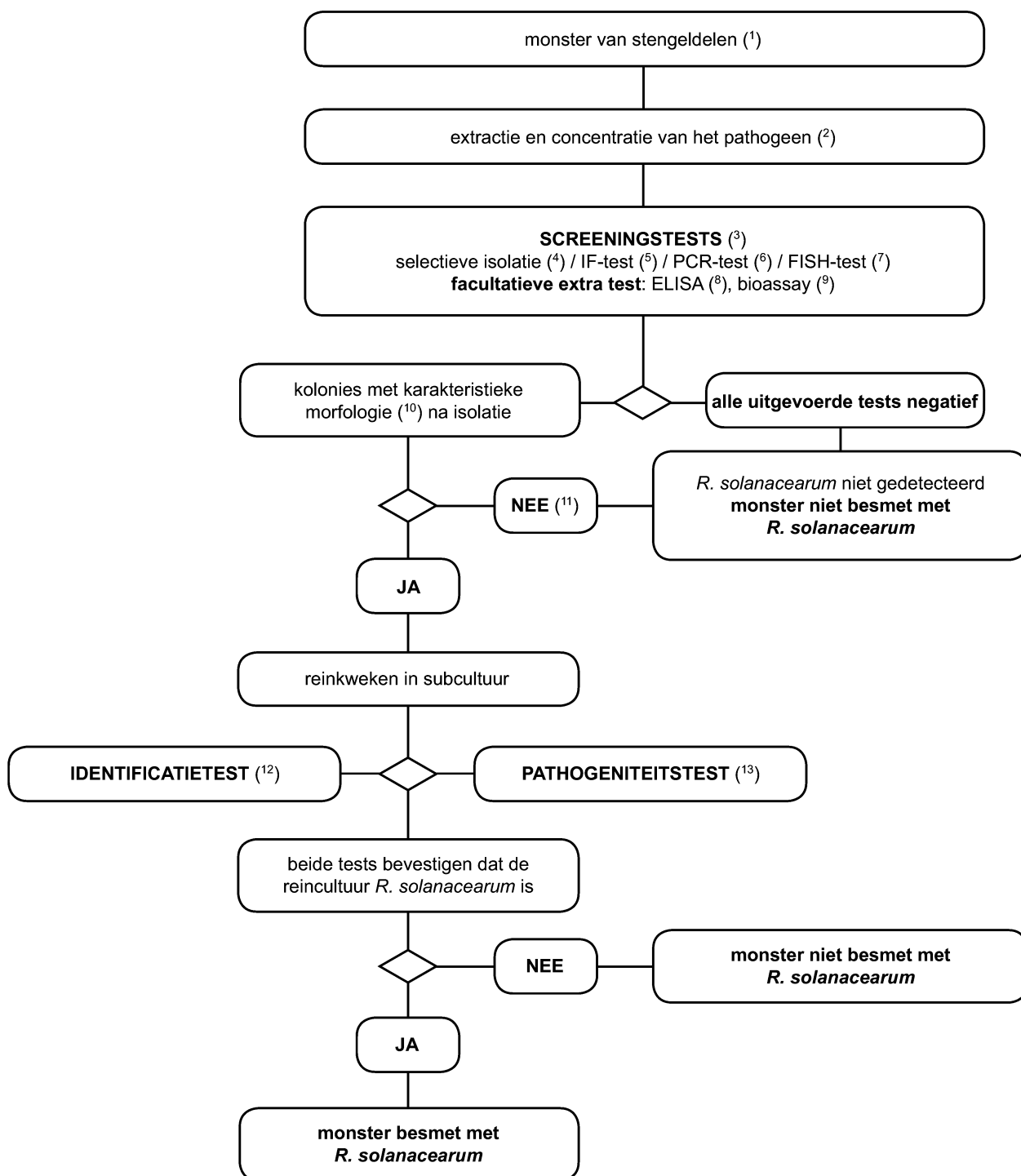
Deze testprocedure is bedoeld voor het opsporen van latente infecties in aardappelknollen. Een positieve uitslag bij ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde screeningstests³ moet worden bevestigd door isolatie van het pathogeen. In geval van isolatie van karakteristieke kolonies wordt de procedure vervolgd door identificatie van een reïncultuur als *R. solanacearum*. Een positieve uitslag bij slechts één van de screeningstests is niet voldoende om het monster als verdacht aan te merken.

Met de screenings- en isolatietests moet een detectiegrens worden gehaald van 10^3 - 10^4 cellen/ml van de geresuspendeerde pellet die als positieve controle aan elke testreeks wordt toegevoegd.



- (¹) De standaardmonster grootte is 200 knollen, maar de procedure kan met kleinere monsters worden uitgevoerd als er geen 200 knollen beschikbaar zijn.
- (²) De methoden voor de extractie en concentratie van het pathogeen worden onder III.1.1 beschreven.
- (³) Als ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde tests een positieve uitslag geven, zijn isolatie en bevestiging vereist. Er wordt eerst ten minste één screeningstest uitgevoerd. Wanneer deze test negatief is, wordt het monster als negatief beschouwd. Als de testuitslag positief is, moeten een tweede en eventueel nog verdere screeningstests op basis van andere biologische principes worden verricht om de eerste positieve uitslag te bevestigen. Indien de tweede of andere tests negatief zijn, wordt het monster als negatief beschouwd. In dat geval hoeven geen verdere tests te worden verricht.
- (⁴) De IF-test wordt onder VI.A.5 beschreven.
- (⁵) Selectieve isolatie wordt onder VI.A.4 beschreven.
- (⁶) De PCR-tests worden onder VI.A.6 beschreven.
- (⁷) De FISH-test wordt onder VI.A.7 beschreven.
- (⁸) De ELISA-tests worden onder VI.A.8 beschreven.
- (⁹) De bioassay wordt onder VI.A.9 beschreven.
- (¹⁰) De karakteristieke koloniemorfologie wordt onder II.3.d beschreven.
- (¹¹) Kweken en bioassays kunnen mislukken wegens concurrentie van of remming door saprofytische bacteriën. Als in screeningstests een duidelijke positieve uitslag is verkregen maar de isolatietests negatief zijn, moeten de isolatietests herhaald worden met dezelfde pellet of door nog meer vaatweefsel rond de navel van doorgesneden knollen van hetzelfde monster te nemen; zo nodig moeten meer monsters worden getest.
- (¹²) Met de tests onder VI.B worden reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd.
- (¹³) De pathogeniteitstest wordt onder VI.C beschreven.

3. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in monsters van symptomloze aardappel-, tomaten- of andere waardplanten



- (¹) Zie onder III.2.1 voor aanbevolen monstergrootten.
- (²) De methoden voor de extractie en concentratie van het pathogeen worden onder III.2.1 beschreven.
- (³) Als ten minste twee, op verschillende biologische principes gebaseerde tests een positieve uitslag geven, zijn isolatie en bevestiging vereist. Er wordt ten minste één screeningstest uitgevoerd. Wanneer deze test negatief is, wordt het monster als negatief beschouwd. Als de testuitslag positief is, moeten een tweede en eventueel nog verdere screeningstests op basis van andere biologische principes worden verricht om de eerste positieve uitslag te bevestigen. Indien de tweede of andere tests negatief zijn, wordt het monster als negatief beschouwd. In dat geval hoeven geen verdere tests te worden verricht.
- (⁴) Selectieve isolatie wordt onder VI.A.4 beschreven.
- (⁵) De IF-test wordt onder VI.A.5 beschreven.
- (⁶) De PCR-tests worden onder VI.A.6 beschreven.
- (⁷) De FISH-test wordt onder VI.A.7 beschreven.
- (⁸) De ELISA-tests worden onder VI.A.8 beschreven.
- (⁹) De bioassay wordt onder VI.A.9 beschreven.
- (¹⁰) De karakteristieke koloniemorfologie wordt onder II.3.d beschreven.
- (¹¹) Kweken en bioassays kunnen mislukken wegens concurrentie van of remming door saprofytische bacteriën. Als in screeningstests een positieve uitslag is verkregen maar de isolatietests negatief zijn, moeten de isolatietests worden herhaald.
- (¹²) Met de tests onder VI.B worden reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd.
- (¹³) De pathogeniteitstest wordt onder VI.C beschreven.

DEEL II

METHODEN VOOR DE DETECTIE VAN R. SOLANACEARUM IN AARDAPPELKNOLLEN EN AARDAPPEL-, TOMATEN- EN ANDERE WAARDPLANTEN MET SYMPTOMEN VAN BRUINROT

1. **Symptomen** (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

- 1.1. Symptomen bij aardappel

Aardappelplant. Het eerste infectiestadium uit zich in bladverwelking nabij de top van de plant bij hoge temperaturen overdag met herstel's nachts. Aanvankelijk blijven de bladeren groen, later vergelen ze en treedt bruine necrose op. Ook komt epinastie voor. De verwelking van scheuten of hele planten is al snel onomkeerbaar; de plant zakt ineen en sterft. Het vaatweefsel in dwars doorsneden stengels van verwelkte planten ziet er doorgaans bruin uit en uit het snijvlak komt een melkachtig bacterieslijm (spontaan of als de stengel wordt dichtgeknepen). Wanneer een doorsneden stengel verticaal in water wordt gezet, komen er slijmraden uit de vaatbundels.

Aardappelknol. De aardappelknollen moeten dicht bij het navelende (stoloon) dwars of over de stoloon overlans doorsneden worden. Het eerste infectiestadium uit zich in een glazige gele tot lichtbruine verkleuring van de vaatbundelring, waaruit na enkele minuten spontaan roomkleurig bacterieslijm komt. Later wordt de vaatverkleuring duidelijker bruin en kan de necrose zich tot in het parenchym uitstrekken. In gevorderde stadia komt uit de navel en de ogen bacterieslijm waaraan bodemdeeltjes blijven hangen. Op de schil kunnen door instorting van onderliggend vaatweefsel roodbruine, iets verzonken laesies verschijnen. In gevorderde stadia van de ziekte komt secundair vaak zacht bacterieel of schimmelrot voor.

- 1.2. Symptomen bij tomaat

Tomatenplant. Het eerste zichtbare symptoom is dat de jongste bladeren er slap bijhangen. In voor het pathogeen gunstige omstandigheden (bodemtemperatuur ongeveer 25 °C, 100 % luchtvochtigheid) volgen na enkele dagen epinastie en eenzijdige of totale verwelking van de plant, waarna deze volledig inzakt. In minder gunstige omstandigheden (bodemtemperatuur lager dan 21 °C) treedt minder verwelking op, maar kunnen zich aan de stengel grote aantallen bijwortels ontwikkelen. Vanaf de voet van de stengel verschijnen met water verzadigde ribbels, wat wijst op necrose in het vaatstelsel. Als de stengel dwars wordt doorsneden, komt er wit of gelig bacterieslijm uit het bruin verkleurde vaatweefsel.

- 1.3. Symptomen bij andere waardplanten

Solanum dulcamara (bitterzoet) en *S. nigrum* (zwarte nachtschade) — In het wild wordt verwelking bij deze onkruidplanten zelden waargenomen, tenzij bij bodemtemperaturen van meer dan 25 °C of extreem hoge inoculumniveaus (bijvoorbeeld wanneer *S. nigrum* vlak naast zieke aardappel- of tomatenplanten groeit). Als verwelking wel optreedt, zijn de symptomen dezelfde als bij tomaat. Niet-verwelkende *S. dulcamara* die met wortel en stengel in water staat kan op een dwarse doorsnede van de onderste of onder water gelegen stengeldelen een lichtbruine verkleuring van het vaatweefsel vertonen. Bacterieslijm of -slijmraden kunnen uit het vaatweefsel komen als een doorsneden stengel verticaal in water wordt gezet, ook als er geen verwelkingssymptomen zijn.

2. **Snelle screeningstests**

Snelle screeningstests zijn nuttig voor een voorlopige diagnose, maar niet essentieel. Voer een of meer van de onderstaande gevalideerde tests uit.

- 2.1. Slijmradentest

(Zie VI.A.1)

- 2.2. Detectie van poly- β -hydroxybutyraatkorrels (PHB-korrels)

Kleur thermisch gefixeerde uitstrijkjes bacterieslijm uit geïnfecteerd weefsel op een objectglaasje met nijlblauw A of sudanzwart om de karakteristieke PHB-korrels in de cellen van *R. solanacearum* te zien (VI.A.2).

2.3. Serumagglutinatietests

(Zie VI.A.3)

2.4. Andere tests

Andere geschikte snelle screeningstests zijn onder meer de IF-test (VI.A.5), FISH-test (VI.A.7), ELISA-tests (VI.A.8) en PCR-tests (VI.A.6).

3. Isolatieprocedure

- a) Neem wat slijm of verkleurd vaatweefsel uit de aardappelknol of uit de stengel van de verwelkte aardappel-, tomaten- of andere waardplant. Suspendeer dit in een klein volume steriel gedestilleerd water of steriele fosfaatbuffer 50 mM (aanhangel 4) en laat 5-10 minuten staan.
- b) Maak een reeks decimale verdunningen van de suspensie.
- c) Breng 50-100 µl van de suspensie en verdunningen over op een algemeen medium (NA, YPGA of SPA; aanhangsel 2) en/of op Kelman's tetrazoliummedium (aanhangel 2) of een ander gevalideerd selectief medium (zoals SMSA; aanhangsel 2). Gebruik daarvoor een geschikte techniek. Plaat als positieve controle eventueel ook een verdunde celsuspensie van *R. solanacearum* biovar 2 uit.
- d) Incubeer de platen 2-6 dagen bij 28 °C.
 - Op een algemeen medium vormen virulente isolaten van *R. solanacearum* parelwitte, platte, onregelmatige en uitvloeiende kolonies, vaak met kenmerkende slierten in het midden. Avirulente isolaten vormen kleine, ronde, niet-uitvloeiende, volledig roomkleurige, botervette kolonies.
 - Op Kelman's tetrazolium en SMSA zijn de slierten bloedrood. Avirulente isolaten van *R. solanacearum* vormen kleine, ronde, niet-uitvloeiende, volledig dieprode, botervette kolonies.

4. Identificatietests voor *R. solanacearum*

Onder VI. B worden tests beschreven om de identificatie van vermoedelijke isolaten van *R. solanacearum* te bevestigen.

DEEL III

1. Methoden voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in monsters van symptoomloze aardappelknollen

1.1. Bereiding van de monsters

Opmerkingen

- De standaardmonster grootte is 200 knollen per test. Intensievere bemonstering houdt in dat er meer tests op monsters van deze grootte worden genomen. Wanneer een groter aantal knollen per monster wordt genomen, treedt remming op of zijn de resultaten moeilijk te interpreteren. De procedure is echter ook goed toepasbaar voor monsters van minder dan 200 knollen, wanneer er niet zoveel beschikbaar zijn.
- De hierna beschreven detectiemethoden zijn gevalideerd met monsters van 200 knollen.
- Het hierna beschreven aardappelextract kan ook worden gebruikt voor de detectie van de aardappelringrotbacterie, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Facultatieve behandeling vóór de bereiding van het monster:

- a) Incubeer de monsters vooraf maximaal twee weken voor de test bij 25-30 °C, zodat eventueel aanwezige *R. solanacearum* zich vermenigvuldigt.
- b) Was de knollen. Gebruik geschikte ontsmettingsmiddelen (als een PCR-test uitgevoerd wordt, chloorverbindingen om eventueel aanwezig pathogeen-DNA te verwijderen) en reinigingsmiddelen na elk monster. Laat de knollen aan de lucht drogen. Deze wasprocedure is vooral nuttig, maar niet verplicht, voor monsters met veel aanhangende grond en als een PCR-test of directe isolatie moet worden uitgevoerd.

- 1.1.1. Verwijder met een schoon, ontsmet scalpel of aardappelschilmes de schil aan het navelinde (stoloon) van elke knol, zodat het vaatweefsel zichtbaar wordt. Snij voorzichtig een kleine kegelvormige kern vaatweefsel uit het navelinde van elke knol en zorg er daarbij voor dat deze zo weinig mogelijk niet-vaatweefsel bevat (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NB: Houd (rottende) knollen met verdachte symptomen van bruinrot apart en test die afzonderlijk.

Als bij het uitsnijden van het navelindstukje voor bruinrot verdachte symptomen worden waargenomen, moet de knol visueel worden onderzocht en bij de navel worden doorgesneden. Doorgesneden knollen met vermoedelijke symptomen moeten ten minste twee dagen bij kamertemperatuur worden bewaard om verkurking te laten optreden en vervolgens gekoeld (bij 4-10 °C) onder de juiste quarantaineomstandigheden worden opgeslagen. Alle knollen, ook die met verdachte symptomen, moeten overeenkomstig bijlage III worden bewaard.

- 1.1.2. Verzamel de navelindstukjes in ongebruikte afsluitbare of verzegelbare wegwerpcontainers (als de containers wel opnieuw gebruikt worden, moeten ze grondig worden gereinigd en met chloorverbindingen worden ontsmet). De navelindstukjes worden bij voorkeur direct verwerkt. Is dat niet mogelijk, dan moeten ze zonder toevoeging van buffer in de container worden bewaard; gekoeld mogen ze hooguit 72 uur worden bewaard, bij kamertemperatuur hooguit 24 uur.

Verwerk de navelindstukjes volgens een van onderstaande procedures:

- a) overgiet de stukjes met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer (aanhangel 4) en schud 4 uur (bij minder dan 24 °C) of 16-24 uur (gekoeld) in een rondschudapparaat (50-100 rpm),

of

- b) homogeniseer de stukjes met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer (aanhangel 4) in een blender (bv. Waring of Ultra Thurax) of door ze fijn te maken in een afgesloten wegwerpbaar maceratiezakje (bv. Stomacher of Bioreba sterk polytheen, 150 × 250 mm, met straling gesteriliseerd) met een rubberen hamer of geschikte maalapparatuur (bv. Homex).

NB: Bij gebruik van een blender is er een groot risico op kruisbesmetting tussen de monsters. Neem maatregelen om aerosolvervorming en morsen tijdens de extractie te vermijden. Voor elk monster moeten pas gesteriliseerde blendermessen en vaten gebruikt worden. Als de PCR-test wordt gedaan, moet worden vermeden dat er DNA in de containers of maalapparatuur achterblijft. Aanbevolen wordt om voor de PCR-test het materiaal in wegwerpzakjes fijn te maken en wegwerpbuisjes te gebruiken.

- 1.1.3. Schenk de bovenstaande vloeistof af. Als de vloeistof erg troebel is, kan dit worden verholpen door centrifugeren bij laag toerental (maximaal 180 g, 10 minuten, 4-10 °C) of vacuümfiltratie (40-100 µm) waarbij het filter met ongeveer 10 ml extractiebuffer wordt nagespoeld.

- 1.1.4. Concentreer de bacteriefraction door 15 minuten centrifugeren bij 7 000 g (of 10 minuten bij 10 000 g) bij 4-10 °C. Verwijder de bovenstaande vloeistof zonder de pellet te verstoren.

- 1.1.5. Resuspendeer de pellet in 1,5 ml pelletbuffer (aanhangel 4). Gebruik 500 µl voor de test op *R. solanacearum*, 500 µl voor die op *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en 500 µl voor referentiedoelindes. Voeg aan het referentieliquot van 500 µl en aan het niet-gebruikte analyseliquot steriele glycerol toe tot een eindconcentratie van 10-25 % (V/V), vortex en bewaar tussen -16 en -24 °C (enkele weken) of -68 en -86 °C (enkele maanden). Bewaar de analyseliquots tijdens het onderzoek bij 4-10 °C.

Herhaald invriezen en ontdooien wordt niet aangeraden.

Als het extract moet worden vervoerd, moet het binnen 24 à 48 uur in een koelbox worden afgeleverd.

- 1.1.6. Alle positieve *R. solanacearum*-controles en -monsters moeten gescheiden behandeld worden om contaminatie te voorkomen. Dit geldt voor de IF-glaasjes en voor alle tests.

1.2. Testmethode

Zie de stroomdiagrammen en beschrijvingen van de tests en de geoptimaliseerde protocollen in de aanhangsels:

selectieve isolatie (VI.A.4);

IF-test (VI.A.5);

PCR-tests (VI.A.6);

FISH-test (VI.A.7);

ELISA-tests (VI.A.8);

bioassay (VI.A.9).

2. Methoden voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in monsters van symptoomloze aardappel-, tomaten- en andere waardplanten

2.1. Bereiding van de monsters

NB: Voor de detectie van latente *R. solanacearum*-populaties wordt aangeraden samengestelde monsters te testen. De methode is goed bruikbaar voor samengestelde monsters van maximaal 200 stengeldelen. Surveyonderzoeken moeten gebaseerd zijn op een statistisch representatieve steekproef van de onderzochte plantenpopulatie.

2.1.1. Doe stengeldelen van 1-2 cm in een gesloten steriele container overeenkomstig de onderstaande bemonsteringsprocedures.

Zaailingen van tomatenplanten: Snij met een schoon, ontsmet mes een stuk van 1 cm van het onderste deel van elke stengel, vlak boven het bodemniveau.

Kas- of vollegrondstomatplanten: Snij met een schoon, ontsmet mes de onderste zijscheut van elke plant zo dicht mogelijk bij de hoofdstengel af. Neem de onderste 1 cm van elke zijscheut.

Andere planten: Snij met een schoon, ontsmet mes of dito snoeischaar een stuk van 1 cm van het onderste deel van de stengel af, vlak boven het bodemniveau. Snij van *S. dulcamara* of andere in water groeiende planten een stuk van 1-2 cm van het deel van de stengel onder water of de stolon met waterwortels.

Test bij het bemonsteren van een bepaalde plaats bij voorkeur een statistisch representatieve steekproef van ten minste tien planten per bemonsteringspunt van elke mogelijke onkruidwaard. Het pathogeen is het beste te detecteren laat in het voorjaar, in de zomer en in de herfst, al kan natuurlijke infectie in overblijvend bitterzoet (*S. dulcamara*) in waterlopen het hele jaar worden gedetecteerd. Het organisme komt onder meer voor in aardappelopslag, *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* en andere planten van de nachtschadefamilie, en daarnaast in *Pelargonium* spp. en *Portulaca oleracea*. *R. solanacearum* biovar 2/ras 3 kan in specifieke omstandigheden voorkomen in de wortel of rizosfeer van Europese onkruidsoorten als *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans*, *Tussilago farfara* en *Urtica dioica*.

NB: In dit stadium kan het visuele onderzoek naar inwendige symptomen (vaatverkleuring of bacterieslijm) plaatsvinden. Bewaar en test stengeldelen met symptomen afzonderlijk (zie deel II).

2.1.2. Ontsmet de stengeldelen kort met ethanol 70 % en dep ze direct droog met tissuepapier. Verwerk de stengeldelen daarna volgens een van de volgende procedures:

- a) overgiet de stengeldelen met voldoende (ongeveer 40 ml) extractiebuffer (aanhangsel 4) en schud gedurende 4 uur (bij minder dan 24 °C) dan wel 16-24 uur (indien gekoeld) in een rondschudapparaat (50-100 rpm), of
- b) verwerk de stengeldelen onmiddellijk door ze fijn te maken in een sterk maceratiezakje (bv. Stomacher of Bioreba) met voldoende extractiebuffer (aanhangsel 4) met een rubberen hamer of geschikte maalapparatuur (bv. Homex). Is dit niet mogelijk, dan kunnen ze gekoeld hooguit 72 uur worden bewaard en bij kamertemperatuur hooguit 24 uur.

2.1.3. Laat 15 minuten bezinken en schenk de bovenstaande vloeistof af.

2.1.4. Het is doorgaans niet nodig het extract verder te zuiveren of de bacteriefractie te concentreren; desgewenst kan dit worden gedaan door filtratie en/of centrifugering zoals beschreven onder III.1.1.3 tot 1.1.5.

- 2.1.5. Verdeel het oorspronkelijke of geconcentreerde monsterextract in twee gelijke delen. Houd de ene helft gedurende het onderzoek op 4-10 °C en bewaar de andere helft na toevoeging van 10-25 % (V/V) steriele glycerol tussen – 16 en – 24 °C (enkele weken) of – 68 en – 86 °C (enkele maanden) voor het geval verder onderzoek nodig is.

2.2. Testmethode

Zie de stroomdiagrammen en beschrijvingen van de tests en de geoptimaliseerde protocollen in de aanhangsels:

selectieve isolatie (VI.A.4);

IF-test (VI.A.5);

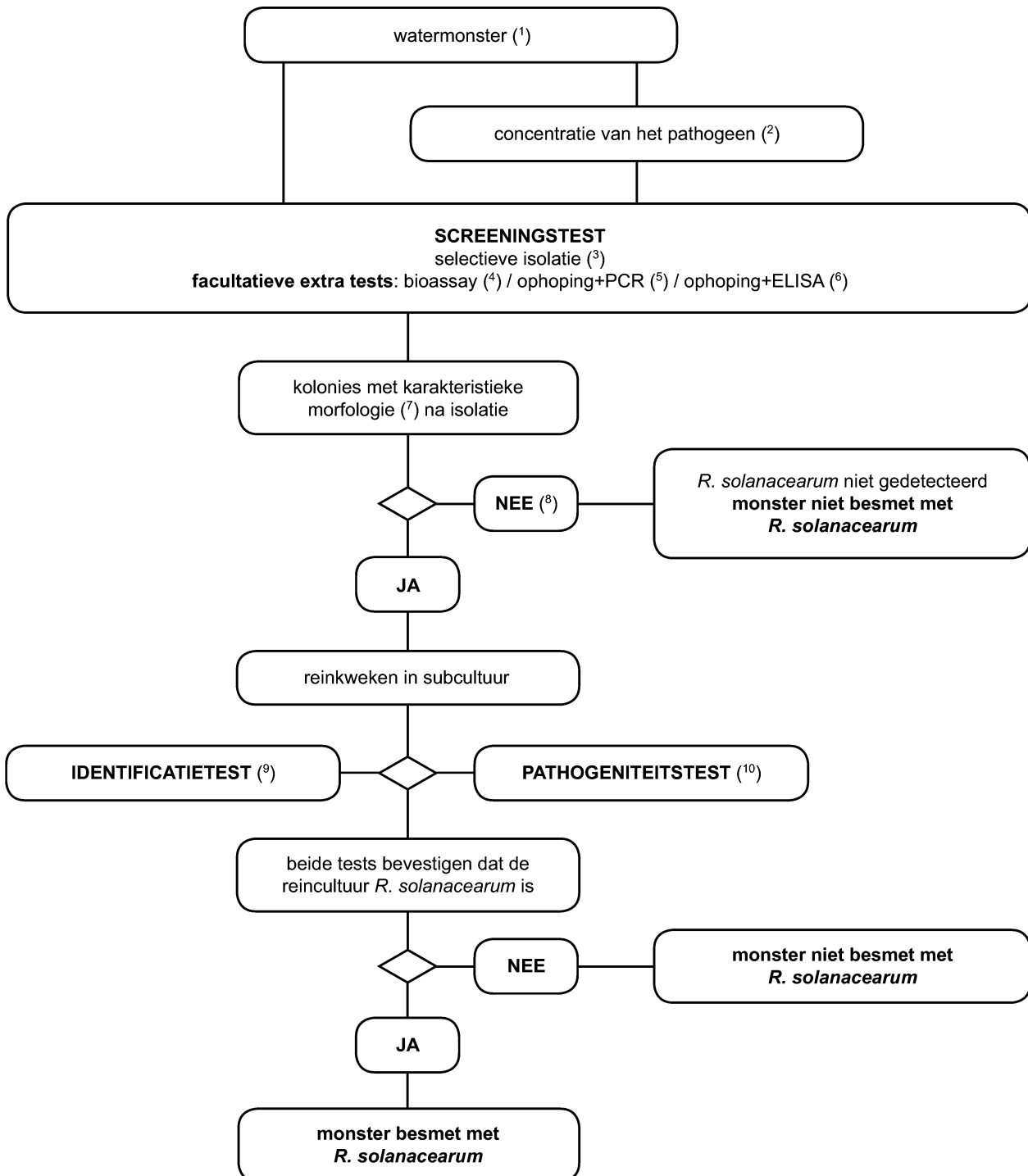
PCR-tests (VI.A.6);

FISH-test (VI.A.7);

ELISA-tests (VI.A.8);

bioassay (VI.A.9).

DEEL IV

1. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in water

- (¹) Zie onder IV.2.1 voor de aanbevolen bemonsteringsprocedures.
- (²) De methoden voor de concentratie van het pathogeen worden onder IV.2.1 beschreven. Concentratie doet niet alleen de pathogene, maar ook de concurrerende saprofytische bacteriepopulaties toenemen en is alleen aan te raden als ze de isolatietest niet hindert.
- (³) Selectieve isolatie wordt onder VI.A.4 beschreven.
- (⁴) De bioassay wordt onder VI.A.9 beschreven.
- (⁵) Ophoping+PCR wordt beschreven onder VI.A.4.2 en VI.A.6.
- (⁶) Ophoping+ELISA wordt beschreven onder VI.A.4.2 en VI.A.8.
- (⁷) De karakteristieke koloniemorfologie wordt onder II.3.d beschreven.
- (⁸) Kweken kan mislukken wegens concurrentie van of remming door saprofytische bacteriën. Als vermoed wordt dat grote saprofytische populaties de betrouwbaarheid van de isolatie reduceren, worden de isolatietests herhaald na verdunning van het monster in steriel water.
- (⁹) Met de tests onder VI.B worden reinculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd.
- (¹⁰) De pathogeniteitstest wordt onder VI.C beschreven.

2. Methoden voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in water

Principe

Met de gevalideerde detectiemethode in dit deel kan het pathogeen worden gedetecteerd in oppervlaktewater-monsters en monsters afvalwater van aardappelverwerkingsinstallaties of riooleffluent. De verwachte detectie-gevoeligheid hangt echter van het substraat af. De gevoeligheid van de isolatietest hangt af van de populatie concurrerende saprofytische bacteriën, die doorgaans veel groter is in aardappelverwerkingsafvalwater of effluent dan in oppervlaktewater. Met de onderstaande methode kan in oppervlaktewater een concentratie van 10^3 cellen per liter nog worden gedetecteerd, maar voor afvalwater ligt de gevoeligheid waarschijnlijk aanzienlijk lager. Daarom wordt afvalwater het beste getest na een eventuele zuivering (bv. sedimentatie, filtratie), waardoor de populatie saprofytische bacteriën wordt gereduceerd. Bij de beoordeling van de betrouwbaarheid van negatieve uitslagen moet rekening worden gehouden met de gevoeligheid van de testmethode. Deze methode is met succes toegepast bij onderzoek naar de aan- of afwezigheid van het pathogeen in oppervlaktewater, maar heeft haar beperkingen bij vergelijkbaar onderzoek op aardappelverwerkingsafvalwater of riooleffluent.

2.1. Bereiding van de monsters

Opmerkingen

- In oppervlaktewater is *R. solanacearum* het beste te detecteren laat in het voorjaar, in de zomer en in de herfst, bij een watertemperatuur van meer dan 15 °C.
- Herhaalde bemonstering van dezelfde plaatsen op verschillende tijdstippen in die periode reduceert de weersinvloed en verhoogt daardoor de betrouwbaarheid van de detectie.
- Zware regenval en de geografie van de waterloop kunnen leiden tot een grote verdunning die de aanwezigheid van het pathogeen kan maskeren.
- Bemonster oppervlaktewater in de buurt van waardplanten (indien aanwezig).

2.1.1. Neem op de bemonsteringsplaatsen in steriele wegwerpbuizen of -flessen watermonsters op een diepte van meer dan 30 cm (indien mogelijk) en binnen 2 m van de oever. Neem afvalwater- of effluentmonsters bij het lozingspunt. Neem bij voorkeur monsters van maximaal 500 ml per bemonsteringspunt. Als kleinere monsters worden genomen, worden op elke bemonsteringsplaats bij voorkeur op ten minste drie verschillende tijdstippen telkens twee submonsters in duplo van ten minste 30 ml genomen. Kies voor intensief onderzoek ten minste drie bemonsteringsplaatsen per 3 km waterloop en bemonster ook de zijwaterlopen.

2.1.2. Vervoer de monsters koel (4-10 °C) en in het donker en test ze binnen 24 uur.

2.1.3. Concentreer de bacteriefractie indien nodig op een van de volgende manieren:

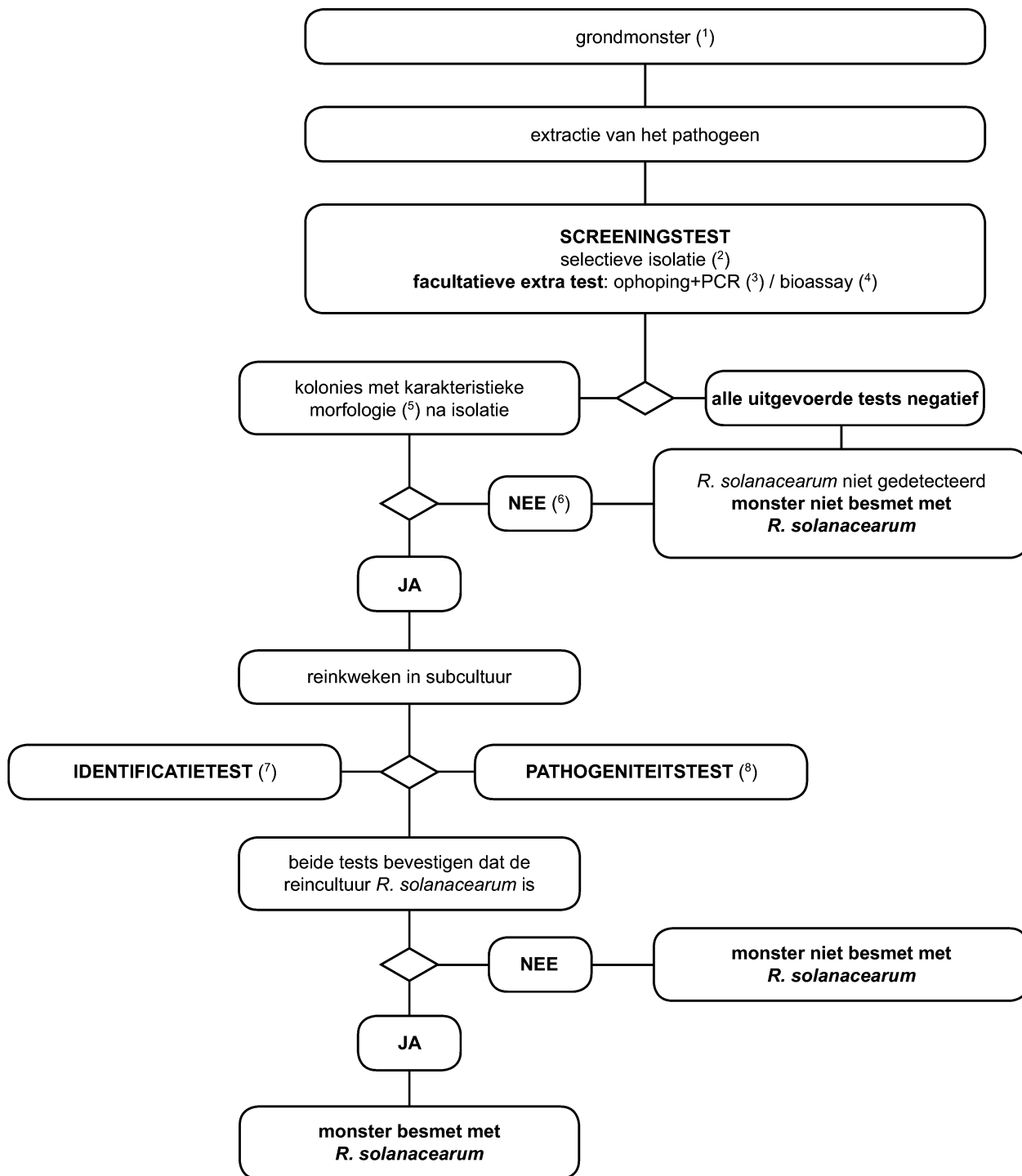
- a) centrifugeer submonsters van 30-50 ml 10 minuten bij 10 000 g (of 15 minuten bij 7 000 g), bij voorkeur bij 4-10 °C. Giet de bovenstaande vloeistof af. Resuspendeer de pellet in 1 ml pelletbuffer (aanhangsel 4);
- b) filtreer de suspensie door een membraan (minimale maasgrootte 0,45 µm). Was het filter met 5-10 ml pelletbuffer en bewaar de wasvloeistof. Deze werkwijze is geschikt voor grotere volumes water met weinig saprofyten.

Monsters van aardappelverwerkingsafvalwater of effluent worden doorgaans beter niet geconcentreerd, omdat te grote populaties concurrerende saprofytische bacteriën de detectie van *R. solanacearum* hinderen.

2.2. Testmethode

Zie de stroomdiagrammen en beschrijvingen van de tests in de aanhangsels.

DEEL V

1. Stroomdiagram voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in grond

- (¹) Zie V.2.1 voor de aanbevolen bemonsteringsprocedures.
- (²) Selectieve isolatie wordt onder VI.A.4 beschreven.
- (³) Ophoping+PCR wordt beschreven onder VI.A.4.2 en VI.A.6.
- (⁴) De bioassay wordt onder VI.A.9 beschreven.
- (⁵) De karakteristieke koloniemorfologie wordt onder II.3.d beschreven.
- (⁶) Kweken kan mislukken wegens concurrentie van of remming door saprofytische bacteriën. Als vermoed wordt dat grote saprofytische populaties de betrouwbaarheid van de isolatie reduceren, worden de isolatietests herhaald na verdere verdunning van het monster.
- (⁷) Met de tests onder VI.B worden reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan betrouwbaar geïdentificeerd.
- (⁸) De pathogeniteitstest wordt onder VI.C beschreven.

2. Methoden voor de detectie en identificatie van *R. solanacearum* in grond

Principe

Met de gevalideerde detectiemethode in dit deel kan het pathogeen worden gedetecteerd in bodemmonsters en monsters van vast aardappelverwerkingsafval of rioolslib. Ze is echter niet gevoelig genoeg om detectie van lage concentraties of onregelmatig verspreide populaties van *R. solanacearum* in natuurlijk besmette monsters van deze substraten te waarborgen.

Houd bij de beoordeling van de betrouwbaarheid van negatieve uitslagen en bij onderzoek naar de aan- of afwezigheid van het pathogeen in bodems of slib rekening met de gevoeligheid van de testmethode. De betrouwbaarste manier om na te gaan of het pathogeen in een bodem aanwezig is, is een vatbare waardplant te planten en op infectie te controleren, maar ook met die methode kunnen lage besmettingsniveaus niet altijd worden gedetecteerd.

2.1. Bereiding van de monsters

2.1.1. Neem bodemmonsters volgens de standaardprincipes voor bemonstering bij nematodenonderzoek. Verzamel 0,5-1 kg grond per monster op 60 plaatsen per 0,3 ha (in een raster van 7 × 7 m) op een diepte van 10-20 cm. Gebruik 120 bemonsteringspunten per 0,3 ha als aanwezigheid van het pathogeen wordt vermoed. Bewaar de monsters bij 12-15 °C. Bemonster aardappelverwerkings- en rioolslib door in totaal 1 kg slib te verzamelen dat representatief is voor het hele te testen volume. Meng elk monster grondig voor het testen.

2.1.2. Dispergeer submonsters van 10-25 g grond of slib in 60-150 ml extractiebuffer (aanhangsel 4) op een rondschild-apparaat (250 rpm, maximaal 2 uur). Voeg zo nodig steriele 0,02 % Tween 20 en 10-20 g steriele kiezel toe voor een betere dispersie.

2.1.3. Bewaar de suspensie tijdens het testen bij 4 °C.

2.2. Testmethode

Zie de stroomdiagrammen en beschrijvingen van de tests in de aanhangsels.

DEEL VI

GEOPTIMALISEERDE PROTOCOLLEN VOOR DE DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN *R. SOLANACEARUM*

A. Diagnose en detectie

1. Slijmradentest

De volgende eenvoudige oriënterende test geeft aan of *R. solanacearum* aanwezig is in stengels van verwelkende aardappel-, tomaten- of andere planten. Snij de stengel vlak boven het bodemniveau af. Dompel het snijvlak in een buis schoon water. Kijk of er na enkele minuten spontaan bacterieslijmraden uit de doorgesneden vaatbundels komen.

2. Detectie van poly- β -hydroxybutyraatkorrels

1. Maak op een objectglaasje een uitstrijkje van bacterieslijm uit geïnfecteerd weefsel of uit een 48 uur oude kweek op YPGA- of SPA-medium (aanhangsel 2).
2. Maak uitstrijkjes van een biovar 2-stam van *R. solanacearum* als positieve controle en eventueel van een bekende PHB-negatieve soort als negatieve controle.
3. Laat aan de lucht drogen en haal elk glaasje door de vlam om de uitstrijkjes te fixeren.
4. Kleur de preparaten met nijlblauw of sudanzwart en bekijk ze onder de microscoop volgens de onderstaande procedure.

Nijlblauwkleuring

- a) Overgiet elk glaasje met een 1 % oplossing van nijlblauw A in water. Incubeer 10 minuten bij 55 °C.
- b) Laat de kleuroplossing weglopen. Spoel even in rustig stromend kraanwater. Verwijder overtollig water met tissuepapier.
- c) Overgiet met azijnzuur 8 % en incubeer 1 minuut bij kamertemperatuur.
- d) Spoel even in rustig stromend kraanwater. Verwijder overtollig water met tissuepapier.
- e) Herbevochtig met een druppel water en breng een dekglasje aan.
- f) Bekijk het preparaat met een epifluorescentiemicroscop (450 nm, olie-immersie, 600-1 000 ×).
- g) Kijk of er een helderoranje fluorescentie van PHB-korrels te zien is. Controleer onder doorvallend natuurlijk licht of de korrels zich wel degelijk in de cellen bevinden en de celmorfologie karakteristiek is voor *R. solanacearum*.

Sudanzwartkleuring

- a) Overgiet elk glaasje met een 0,3 % oplossing van sudanzwart B in ethanol 70 %. Incubeer 10 minuten bij kamertemperatuur.
- b) Laat de kleuroplossing weglopen. Spoel even met kraanwater. Verwijder overtollig water met tissuepapier.
- c) Dompel even in xyleen en dep droog op tissuepapier. *Let op! Xyleen is gevaarlijk. Neem de nodige voorzorgen en werk in een zuurkast.*
- d) Overgiet met waterige safranineoplossing 0,5 % (m/V) en laat 10 seconden bij kamertemperatuur inwerken. *Let op! Safranine is gevaarlijk. Neem de nodige voorzorgen en werk in een zuurkast.*
- e) Spoel in rustig stromend kraanwater. Dep droog op tissuepapier. Breng een dekglasje aan.
- f) Bekijk het preparaat met een lichtmicroscop onder doorvallend licht (olie-immersie, 1 000 ×).
- g) Kijk of er blauwzwarte PHB-korrels te zien zijn in *R. solanacearum*-cellen met roze celwanden.

3. Serumagglutinatie tests

Agglutinatie van *R. solanacearum*-cellen in bacterieslijm of weefselextract van planten met symptomen is het beste waar te nemen met gevalideerde antilichamen (aanhangel 3) die met kleur zijn gelabeld, bv. met rode *Staphylococcus aureus* of gekleurde latexdeeltjes. Volg bij gebruik van in de handel verkrijgbare kits (aanhangel 3) de instructies van de fabrikant en anders de volgende procedure:

- a) Meng ongeveer 5 µl van een suspensie van gelabeld antilichaam met ongeveer 5 µl bacterieslijm op venstertjes van een objectglasje met meerdere venstertjes.
- b) Maak positieve en negatieve controles met suspensies van *R. solanacearum* biovar 2 en een heterologe stam.
- c) Meng zachtjes gedurende 15 seconden. In positieve monsters treedt agglutinatie op.

4. Selectieve isolatie

4.1. Selectieve uitplating

NB: Controleer vóór de eerste toepassing van deze methode of de toevoeging van 10^3 - 10^4 kve/ml *R. solanacearum* aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar wordt gedetecteerd.

Gebruik een geschikt gevalideerd selectief medium, bv. SMSA zoals gemodificeerd door Elphinstone e.a. (1996) (aanhangel 2).

Om *R. solanacearum* te onderscheiden van andere bacteriën die op het medium kolonies kunnen vormen, is zorg vereist. Kolonies van *R. solanacearum* kunnen bovendien een atypische morfologie vertonen op overvolle platen en in aanwezigheid van antagonistische bacteriën. Test het monster bij een vermoeden van concurrentie of antagonisme met een andere test opnieuw.

Deze methode is het gevoeligst met vers bereide monsterextracten. Zij kan echter ook worden gebruikt met extracten die tussen -68 en -86 °C in glycerol zijn bewaard.

Maak als positieve controle decimale verdunningen van een suspensie van 10^6 kve/ml van een virulente stam van *R. solanacearum* biovar 2 (bv. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Om contaminatie uit te sluiten moeten de positieve controles volledig gescheiden van de analysemonsters worden bereid.

Ga voor elke nieuw bereide charge van een selectief medium na of die geschikt is voor het kweken van de bacterie en gebruik haar pas daarna om routinemonsters te testen.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

4.1.1. Neutraliseer eventueel aanwezige saprofytische kolonievormende populaties door verdunning en uitplating. Strijk per plaat monsterextract en per verdunning 50-100 µl uit.

4.1.2. Incubeer de platen bij 28 °C. Bekijk ze na 48 uur en daarna zes dagen lang dagelijks. Karakteristieke kolonies van *R. solanacearum* op SMSA zijn melkwit, plat, onregelmatig en uitvloeiend; na drie dagen incubatie worden ze in het midden roze tot bloedrood, met interne strepen en slierten (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

NB: *R. solanacearum* vormt op dit medium soms ook atypische kolonies. Deze kunnen klein, rond, helemaal rood en niet of slechts gedeeltelijk uitvloeiend zijn, waardoor ze moeilijk van saprofytische kolonievormende bacteriën te onderscheiden zijn.

4.1.3. Kweek vermoedelijke *R. solanacearum*-kolonies rein na uitstrijken of uitplaten van verdunningen op een algemeen medium om geïsoleerde kolonies te krijgen (aanhangel 2).

4.1.4. De kweek kan worden bewaard in steriel water (pH 6-8, chloorvrij) in het donker en bij kamertemperatuur (kort) of in een geschikt cryoprotectans bij -68 à -86 °C of gevriesdroogd (lang).

4.1.5. Identificeer vermoedelijke culturen (VI. B) en voer een pathogeniteitstest uit (VI. C).

Interpretatie van het resultaat van de selectieve uitplating

De test is negatief als de platen na zes dagen geen kolonies of geen vermoedelijke *R. solanacearum*-kolonies vertonen, mits er geen aanwijzingen zijn voor remming door concurrentie of antagonisme van andere bacteriën en de positieve controles wel karakteristieke *R. solanacearum*-kolonies vertonen.

De test is positief als er vermoedelijke *R. solanacearum*-kolonies worden geïsoleerd.

4.2. Ophopingsprocedure

Gebruik een gevalideerd ophopingsmedium, bv. gemodificeerde Wilbrink-bouillon (aanhangel 2).

Deze procedure dient om populaties van *R. solanacearum* in monsterextracten selectief te stimuleren en de detectiegevoeligheid te verbeteren. Ook worden remmers van de PCR-reactie doeltreffend verdund (1:100). De ophoping van *R. solanacearum* kan echter mislukken door concurrentie of antagonisme van saprofytische organismen die vaak ook worden gestimuleerd. Daarom is isolatie van *R. solanacearum* uit kweken in ophopingsbouillon soms moeilijk. Voor de ELISA-test verdienen specifieke monoklonale (in plaats van polyklonale) antilichamen de voorkeur, daar populaties van serologisch verwante saprofyten ook kunnen toenemen.

- 4.2.1. Breng voor ophoping+PCR 100 µl monsterextract over in 10 ml ophopingsbouillon (aanhangsel 2) in DNA-vrije buisjes of flesjes. Voor ophoping+ELISA kan de concentratie van het monsterextract worden verhoogd (bv. 100 µl in 1,0 ml ophopingsbouillon).
- 4.2.2. Incubeer 72 uur bij 27-30 °C (al dan niet op een schudapparaat) met de dop los op de buisjes voor de beluchting.
- 4.2.3. Meng de suspensies voor de ELISA- of PCR-test grondig.
- 4.2.4. Behandel de bouillon vervolgens op dezelfde manier als de monsters in de boven beschreven tests.

NB: Bij een hoge kans op remming van de ophoping van *R. solanacearum* door grote populaties concurrerende saprofytische bacteriën levert ophoping van de monsterextracten vóór centrifugering of andere concentratiestappen vaak betere resultaten op.

5. Immunofluorescentiestest (IF-test)

Principe

De IF-test wordt als eerste screeningstest aanbevolen vanwege de aangetoonde robuustheid ten opzichte van de vereiste drempelwaarden.

Wanneer de IF-test als eerste screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede screeningstest een isolatie-, PCR- of FISH-test worden gedaan. Wanneer de IF-test als tweede screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd voor de verdere analyses.

NB: Gebruik gevalideerde antilichamen tegen *R. solanacearum* (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Aanbevolen wordt van elke nieuwe partij antilichamen de titer te bepalen. De titer wordt gedefinieerd als de hoogste verdunning waarbij een optimale reactie optreedt bij het testen van een suspensie met 10^5 - 10^6 cellen/ml van de homologe stam van *R. solanacearum* met een geschikt fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC)-conjugaat, overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant. De gevalideerde polyklonale antiserums hebben allemaal een IF-titer van ten minste 1:2 000. Bij het onderzoek moeten de antilichamen worden gebruikt in werkverdundingen rond de titer.

De test moet worden uitgevoerd op vers bereide monsterextracten. Zo nodig kan de test ook goed worden uitgevoerd op extracten die tussen -68 en -86 °C in glycerol zijn bewaard. De glycerol kan uit het monster worden verwijderd door toevoegen van 1 ml pelletbuffer (aanhangsel 4), 15 minuten centrifugeren bij 7 000 g en resuspensie in een gelijk volume pelletbuffer. Dit is vaak niet nodig, met name als de monsters op de objectglaasjes worden gefixeerd door ze door de vlam te halen.

Maak afzonderlijke positieve controleglaasjes van de homologe stam of een andere referentiestam van *R. solanacearum* gesuspenderd in aardappelextract, zoals beschreven in aanhangsel 3, onder B), en eventueel in buffervloeistof.

Natuurlijk geïnfecteerd weefsel (geconserveerd door vriesdrogen of invriezen bij -16 tot -24 °C) moet zo mogelijk als soortgelijke controle op hetzelfde glaasje worden gebruikt.

Als negatieve controle kunnen aliquots monsterextract worden gebruikt waarbij een eerdere test voor *R. solanacearum* negatief was.

Zie aanhangsel 3 voor gestandaardiseerd materiaal voor positieve en negatieve controles voor deze test.

Gebruik microscoopglaasjes met meerdere venstertjes, bij voorkeur tien venstertjes met een diameter van minstens 6 mm.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

5.1. Prepareer de objectglaasjes volgens een van onderstaande procedures:

- i) voor pellets met betrekkelijk weinig zetmeelsediment:

Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is genoeg voor een venstertje met een diameter van 6 mm — vergroot het volume voor grotere venstertjes naar rato) van een 1:100-verdunning van de geresuspendeerde aardappelpellet op het eerste venstertje. Pipetteer vervolgens eenzelfde volume onverdunde pellet (1/1) op de resterende venstertjes van de rij. De tweede rij kan worden gebruikt voor duplo's of voor een tweede monster zoals aangegeven in figuur 1.

- ii) voor andere pellets:

Maak decimale oplossingen (1:10 en 1:100) van de geresuspendeerde pellet in pelletbuffer. Pipetteer een afgemeten standaardvolume (15 µl is genoeg voor een venstertje met een diameter van 6 mm — vergroot het volume voor grotere venstertjes naar rato) van de geresuspendeerde pellet en van elke verdunning op een rij venstertjes. De tweede rij kan worden gebruikt voor duplo's of voor een tweede monster zoals aangegeven in figuur 2.

- 5.2. Laat de druppels bij kamertemperatuur of door verwarming tot 40-45 °C drogen. Fixeer de bacteriecellen op het glaasje door het te verwarmen (15 minuten op 60 °C), door het door de vlam te halen, met ethanol 95 % of volgens de specifieke aanwijzingen van de leverancier van de antilichamen.

Zo nodig kunnen de gefixeerde glaasjes hierna bevroren in een doos met droogmiddel bewaard worden voor verder onderzoek (dit mag niet langer dan nodig en hooguit drie maanden duren).

5.3. IF-procedure

- i) Bij het prepareren van objectglaasjes volgens 5.1. i):

Maak een reeks tweevoudige verdunningen. Het eerste venstertje krijgt een halve titer (T/2) en de volgende een kwart titer (T/4), een halve titer (T/2), een titer (T) en twee titers (2T).

- ii) Bij het prepareren van objectglaasjes volgens 5.1. ii):

Maak de werkverdunning van het antilichaam aan in IF-buffer. De werkverdunning beïnvloedt de specificiteit.

Figuur 1 Prepareren van het objectglaasje volgens 5.1. i) en 5.3. i)

		Verdunningen van geresuspendeerde pellet					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Verdunning van geresuspendeerde pellet
(T = titer)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Tweevoudige verdunningen van antiserum/antilichaam
Monster 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplo van monster 1, of monster 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

Figuur 2 Prepareren van het objectglaasje volgens 5.1. ii) en 5.3. ii)

		Werkverdunning van antiserum/antilichaam					
		1/1	1/10	1/100	leeg	leeg	<input type="checkbox"/> Decimale verdunning van geresuspendeerde pellet
Monster 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplo van monster 1, of monster 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

- 5.3.1. Leg de glaasjes op vochtig tissuepapier. Bedek alle testvenstertjes volledig met antilichaamverdunding. Het op elk venstertje aangebrachte volume antilichaam moet ten minste gelijk zijn aan het volume aangebracht extract.

Wanneer de leverancier van de antilichamen geen specifieke aanwijzingen heeft verstrekt, moet de volgende procedure worden gevolgd.

- 5.3.2. Incubeer de glaasjes op vochtig papier afgedekt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur (18-25 °C).
- 5.3.3. Schud de druppels van elk glaasje af en spoel de glaasjes zorgvuldig met IF-buffer. Was door onderdompeling gedurende 5 minuten in IF-buffer-Tween (aanhangsel 4) en vervolgens in IF-buffer. Vermijd aërosolvorming en druppeloverdracht waardoor kruisbesmetting kan optreden. Verwijder overtollig vocht zorgvuldig door zachtjes af te deppen.
- 5.3.4. Leg de glaasjes op vochtig papier. Bedek alle venstertjes met de verdunding van het FITC-conjugaat die gebruikt werd om de titer te bepalen. Het volume conjugaat op de venstertjes moet identiek zijn aan het volume antilichaam.
- 5.3.5. Incubeer de glaasjes op vochtig papier afgedekt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur (18-25 °C).
- 5.3.6. Schud de druppels conjugaat van het glaasje af. Spoel af en was als voorheen (5.3.3).

Verwijder overtollig vocht zorgvuldig.

- 5.3.7. Pipetteer 5-10 µl 0,1 M fosfaatgebufferde glycerol (aanhangsel 4), of een in de handel verkrijgbaar antifading inbedmiddel, op elk venstertje en breng een dekglasje aan.

5.4. Aflezen van de IF-test

- 5.4.1. Bekijk de glaasjes met een epifluorescentiemicroscop die voorzien is van geschikte filters voor excitatie van FITC (olie- of waterimmersie, 500-1 000 ×). Bekijk de venstertjes langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek. Onderzoek bij monsters zonder of met een gering aantal cellen ten minste 40 microscopvelden.

Onderzoek eerst het positieve controleglaasje. De cellen moeten helder fluorescerend en volledig gekleurd zijn bij de bepaalde antilichaamtiter of werkverdunding. De IF-test (VI.A.5) moet herhaald worden bij afwijkende kleuring.

- 5.4.2. Kijk vervolgens in de testvenstertjes van de objectglaasjes uit naar helder fluorescerende cellen met een voor *R. solanacearum* kenmerkende morfologie (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). De intensiteit van de fluorescentie moet gelijkwaardig zijn aan die van de positieve controlestam bij dezelfde antilichaamverdunding. Cellen met onvolledige kleuring of met een zwakke fluorescentie moeten genegeerd worden.

Als contaminatie wordt vermoed, moet de test herhaald worden. Dit kan het geval zijn als alle glaasjes in een partij positieve cellen vertonen doordat de buffer gecontamineerd is, of als er positieve cellen worden aangetroffen op de coating van het glaasje buiten de venstertjes.

- 5.4.3. Aan de immunofluorescentietest zijn verschillende problemen verbonden wat de specificiteit betreft. In pellets van naveleindstukjes en stengeldelen van aardappel worden vaak achtergrondpopulaties van fluorescerende cellen met atypische morfologie en kruisreagerende saprofytische bacteriën gevonden die qua grootte en morfologie lijken op *R. solanacearum*.
- 5.4.4. Besteed alleen aandacht aan fluorescerende cellen met een karakteristieke grootte en morfologie bij de titer of werkverdunding van de antilichamen zoals aangegeven in punt 5.3.

5.4.5. Interpretatie van de IF-test

- i) Wanneer er helder fluorescerende cellen met een karakteristieke morfologie worden aangetroffen, bepaal dan het gemiddelde aantal typische cellen per microscoopveld en bereken het aantal typische cellen per ml geresuspendeerde pellet (aanhangsel 5).

De IF-uitslag is positief als het monster ten minste 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet bevat. Het monster wordt als mogelijk besmet aangemerkt en moet nader onderzocht worden.

- ii) De IF-test is negatief als het monster minder dan 5×10^3 cellen per ml geresuspendeerde pellet bevat; het monster wordt als negatief aangemerkt. Verder onderzoek is dan niet nodig.

6. Polymerasekettingreactietest (PCR-test)

Principe

Wanneer de PCR-test als eerste screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede verplichte screeningstest isolatie of IF worden gedaan. Wanneer PCR als tweede screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd om de diagnose af te ronden.

Het wordt aangeraden deze methode alleen algemeen als eerste screeningstest te gebruiken als er voldoende gespecialiseerde ervaring mee is opgedaan.

NB: Bij de voorbereidende tests met deze methode moeten 10^3 - 10^4 cellen/ml *R. solanacearum*, toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden. Er kunnen optimalisatieproeven nodig zijn om in alle laboratoria een maximale gevoeligheid en specificiteit te bereiken.

Gebruik gevalideerde PCR-reagentia en -protocollen (aanhangsel 6). Kies bij voorkeur een methode met een interne controle.

Neem de nodige voorzorgen om contaminatie van het monster met doel-DNA te vermijden. De PCR-test moet worden uitgevoerd door ervaren analisten in speciale moleculair-biologische laboratoria om de kans op contaminatie met doel-DNA tot een minimum te beperken.

Negatieve controles (bij de DNA-extractie en de PCR-procedures) moeten altijd op dezelfde wijze worden behandeld als de uiteindelijke monsters, om na te gaan of er verontreiniging met DNA is opgetreden.

In de PCR-test moeten de volgende negatieve controles worden meegenomen:

- monsterextract waarbij een eerdere test op *R. solanacearum* negatief was;
- controles met de buffer die bij de extractie van de bacterie en het DNA uit het monster is gebruikt;
- PCR-actiemix.

Als positieve controles moeten worden genomen:

- aliquots van geresuspendeerde pellets waaraan *R. solanacearum* is toegevoegd (voor de bereiding zie aanhangsel 3, onder B);
- een suspensie van 10^6 cellen/ml van *R. solanacearum* in water uit een virulent isolaat (bv. NCPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; aanhangsel 3, onder B);
- gebruik zo mogelijk ook DNA dat is geëxtraheerd uit positieve controlemonsters in de PCR-test.

Om contaminatie te vermijden moeten de positieve controles in een andere ruimte worden bereid dan de analysemonsters.

De monsterextracten moeten zoveel mogelijk vrij van grond zijn. Het kan dus soms raadzaam zijn om extracten uit gewassen aardappelen te bereiden als er PCR-protocollen gebruikt zullen worden.

Zie aanhangsel 3 voor gestandaardiseerd materiaal voor positieve en negatieve controles voor deze test.

6.1. DNA-zuiveringsmethoden

Gebruik positieve en negatieve controlemonsters zoals hierboven beschreven (aanhangsel 3).

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

Er zijn diverse methoden beschikbaar voor het zuiveren van doel-DNA uit complexe monstersubstraten, waarbij remmers van de PCR en andere enzymatische reacties worden verwijderd en het doel-DNA in het monsterextract wordt geconcentreerd. De volgende methode is geoptimaliseerd voor gebruik met de gevalideerde PCR-methoden als beschreven in aanhangsel 6.

a) Methode volgens Pastrik (2000)

- 1) Pipetteer 220 µl lysisbuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) in een eppendorfbuisje van 1,5 ml.
- 2) Voeg 100 µl monsterextract toe en zet het buisje 10 minuten in een verwarmingsblok of waterbad op 95 °C.
- 3) Koel het buisje 5 minuten op ijs.
- 4) Voeg 80 µl lysozym-voorraadoplossing (50 mg lysozym per ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) toe en incubeer 30 minuten bij 37 °C.
- 5) Voeg 220 µl Easy DNA[®] solution A (Invitrogen) toe, vortex grondig en incubeer 30 minuten bij 65 °C.
- 6) Voeg 100 µl Easy DNA[®] solution B (Invitrogen) toe, vortex krachtig tot het neerslag vrij in het buisje beweegt en het monster gelijkmatig viskeus is.
- 7) Voeg 500 µl chloroform toe en vortex tot de viscositeit afneemt en het mengsel homogeen is.
- 8) Centrifugeer 20 minuten bij 15 000 g en 4 °C om de fasen te scheiden en de interfase te vormen.
- 9) Breng de bovenste fase over in een schoon eppendorfbuisje.
- 10) Voeg 1 ml ethanol 100 % (-20 °C) toe, vortex kort en incubeer 10 minuten op ijs.
- 11) Centrifugeer 20 minuten bij 15 000 g en 4 °C en verwijder de ethanol van de pellet.
- 12) Voeg 500 µl ethanol 80 % (-20 °C) en meng door het buisje om te keren.
- 13) Centrifugeer 10 minuten bij 15 000 g en 4 °C, bewaar de pellet en verwijder de ethanol.
- 14) Droog de pellet aan de lucht of in een DNA Speed Vac.
- 15) Resuspendeer de pellet in 100 µl steriel UPW en laat minstens 20 minuten bij kamertemperatuur staan.
- 16) Bewaar bij -20 °C voor de PCR.
- 17) Draai eventueel aanwezig wit neerslag af in een centrifuge en gebruik 5 µl van de bovenstaande vloeistof, die het DNA bevat, voor de PCR.

b) Andere methoden

Er kunnen andere DNA-extractiemethoden (bv. Qiagen DNeasy Plant Kit) worden gebruikt, mits die even doeltreffend blijken te zijn bij het zuiveren van DNA uit controlemonsters met 10^3 - 10^4 pathogene cellen/ml.

6.2. PCR

- 6.2.1. Bereid analyse- en controletemplates voor de PCR volgens de gevalideerde protocollen (VI.A.6). Bereid een tienvoudige verdunning van monster-DNA-extract (1:10 in UPW).
- 6.2.2. Bereid de geschikte PCR-reactiemix in een contaminatievrije omgeving volgens de gepubliceerde protocollen (aanhangsel 6). Gebruik zo mogelijk een multiplex-PCR-protocol met interne PCR-controle.
- 6.2.3. Voeg volgens de PCR-protocollen in steriele PCR-buisjes 2-5 µl DNA-extract toe per 25 µl PCR-reactiemix (aanhangsel 6).
- 6.2.4. Neem ook een negatief controlemonster mee met alleen PCR-reactiemix; voeg hieraan in plaats van het monster UPW toe uit dezelfde bron als in de PCR-mix is gebruikt.
- 6.2.5. Zet de buisjes in hetzelfde PCR-apparaat als voor de voorbereidende tests is gebruikt en werk het geoptimaliseerde PCR-programma af (aanhangsel 6).

6.3. Analyse van het PCR-product

- 6.3.1. Scheid de amplicons met behulp van agarosegelelektroforese. Laat minimaal 12 µl geamplificeerd DNA-reactiemengsel van elk monster, gemengd met 3 µl laadbuffer (aanhangsel 6), lopen in 2,0 % (m/V) agarosegels in TAE-buffer (Tris-acetaat-EDTA, aanhangsel 6) bij 5-8 V/cm. Gebruik een geschikte DNA-marker, bv. 100 bp ladder.
- 6.3.2. Maak de DNA-banden zichtbaar door kleuring met ethidiumbromide (0,5 mg/l) gedurende 30-60 minuten. Deze stof is mutageen – neem de nodige voorzorgen in acht.
- 6.3.3. Onderzoek de gekleurde gel door transilluminatie met kortgolvig UV ($\lambda = 302$ nm) op geamplificeerde PCR-producten van de verwachte lengte (aanhangsel 6) en leg het resultaat vast.
- 6.3.4. Ga bij alle nieuwe bevindingen/gevallen na of het PCR-amplicon authentiek is met behulp van een restrictie-enzymanalyse op een monster van het resterende geamplificeerde DNA door dat bij de optimale temperatuur en gedurende de optimale tijd met een geschikt enzym en geschikte buffer (aanhangsel 6) te incuberen. Scheid de verkregen fragmenten met behulp van agarosegelelektroforese zoals hierboven beschreven; bekijk het karakteristieke restrictiefragmentpatroon onder UV-transilluminatie na kleuring met ethidiumbromide en vergelijk dit met de niet-gedigesterde en de gedigesteerde positieve controle.

Interpretatie van het resultaat van de PCR-test

De PCR-test is negatief als er geen *R. solanacearum*-specifiek PCR-amplicon van de verwachte lengte wordt aangetroffen in het analysemonster, maar wel in alle positieve controlemonsters (bij multiplex-PCR met plantspecifieke interne controleprimers moet er een tweede PCR-product van de verwachte lengte met het analysemonster geamplificeerd zijn).

De PCR-test is positief als het *R. solanacearum*-specifieke PCR-amplicon van de verwachte lengte en met het verwachte restrictiepatroon (indien nodig) wordt aangetoond, mits dit niet in een van de negatieve controlemonsters geamplificeerd is. Een positief resultaat kan ook op betrouwbare wijze worden bevestigd door de test met een tweede set PCR-primers te herhalen (aanhangsel 6).

NB: Als het verwachte amplicon wel bij het positieve controlemonster met *R. solanacearum* in water wordt verkregen, maar niet bij de positieve controles met *R. solanacearum* in aardappelextract, is remming van de PCR waarschijnlijk de oorzaak. Bij multiplex-PCR-protocollen met interne PCR-controles is er waarschijnlijk sprake van remming als geen van beide amplicons worden verkregen.

Er moet aan contaminatie worden gedacht als het verwachte amplicon in een of meer van de negatieve controles wordt gevonden.

7. Fluorescentie-in-situ-hybridisatietest (FISH-test)

Principe

Wanneer de FISH-test als eerste screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet als tweede verplichte screeningstest een isolatie- of IF-test worden gedaan. Wanneer de FISH-test als tweede screeningstest gebruikt wordt en de uitslag positief is, moet het stroomdiagram worden gevolgd om de diagnose af te ronden.

NB: Gebruik gevalideerde, *R. solanacearum*-specifieke oligo-probes (aanhangel 7). Bij de voorbereidende tests met deze methode moeten minstens 10^3 - 10^4 cellen van *R. solanacearum* per ml, toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden.

De onderstaande procedure wordt bij voorkeur uitgevoerd op vers bereid monsterextract maar kan ook goed worden uitgevoerd op monsterextract dat in glycerol bewaard is tussen -16 en -24 °C of -68 en -86 °C.

Als negatieve controle worden aliquots monsterextract gebruikt waarbij eerdere tests op *R. solanacearum* negatief waren.

Als positieve controle worden suspensies bereid met 10^5 - 10^6 cellen/ml *R. solanacearum* biovar 2 (bv. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; aanhangsel 3) in 0,01 M fosfaatbuffer (PB) van een drie- tot vijfdaagse cultuur. Maak afzonderlijke positieve controleglasjes van de homologe stam of een andere referentiestam van *R. solanacearum* gesuspenseerd in aardappelextract, zoals beschreven in aanhangsel 3, onder B).

Het gebruik van de FITC-gelabelde eubacteriële oligo-probe kan als controle voor het hybridisatieproces dienen, omdat hierdoor alle eubacteriën in het monster gekleurd worden.

Zie aanhangsel 3, onder A, voor gestandaardiseerd materiaal voor positieve en negatieve controles voor deze test.

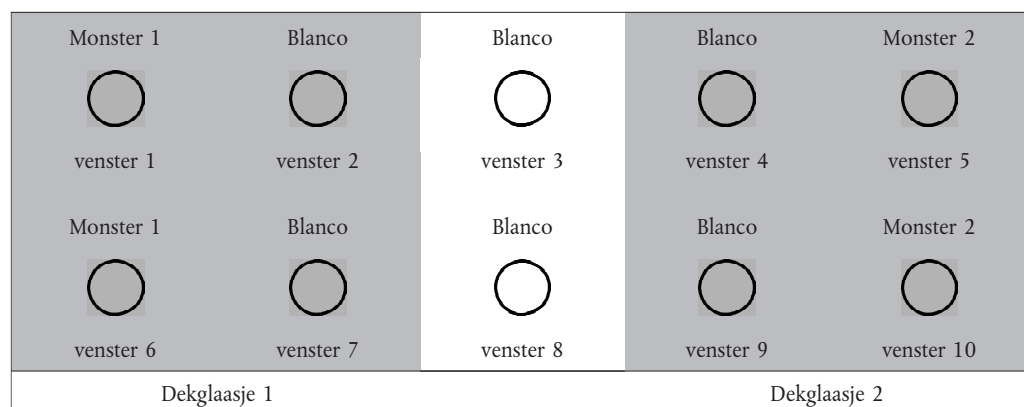
Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

7.1. Fixatie van het aardappelextract

Het volgende protocol is gebaseerd op Wullings e.a. (1998):

- 7.1.1. Bereid het fixatief (aanhangel 7).
- 7.1.2. Pipetteer 100 µl van elk monsterextract in een eppendorfbuisje en centrifugeer 7 minuten bij 7 000 g.
- 7.1.3. Verwijder de bovenstaande vloeistof en los de pellet op in 200 µl korter dan 24 uur tevoren bereid fixatief. Vortex en incubeer 1 uur in de koelkast.
- 7.1.4. Centrifugeer 7 minuten bij 7 000 g, schenk de bovenstaande vloeistof af en resuspendeer de pellet in 75 µl 0,01 M PB (aanhangel 7).
- 7.1.5. Breng 16 µl van de gefixeerde suspensies op een schoon objectglasje met venstertjes zoals aangegeven in figuur 7.1. Breng twee verschillende monsters op het glasje, onverdund en in een 1:100-verdunding (gebruik hiervoor 10 µl in 0,01 M PB). De resterende monsteroplossing (49 µl) kan na toevoeging van eenzelfde volume ethanol 96 % bij -20 °C worden bewaard. Als de FISH-test herhaald moet worden, wordt de ethanol door centrifugeren verwijderd en een gelijk deel 0,01 M PB toegevoegd en door vortexen gemengd.

Figuur 7.1 Overzicht van het FISH-glasje



7.1.6. Droog de glaasjes aan de lucht (of op een droger bij 37 °C) en fixeer ze door ze door de vlam te halen.

Op dit punt kan de procedure worden onderbroken om de volgende dag verder te gaan met de hybridisatie. De objectglaasjes moeten stofvrij en droog bij kamertemperatuur worden bewaard.

7.2. Hybridisatie

7.2.1. Dehydrateer de cellen in een ethanolreeks (50 %, 80 %, 96 %, telkens 1 minuut). Droog de glaasjes aan de lucht in een houder.

7.2.2. Maak een vochtige incubatiekamer door de bodem van een luchtdicht vat te bedekken met tissue- of filtreerpapier, doordrenkt met 1× hybmix (aanhangel 7). Pre-incubeer het vat in de hybridisatieoven gedurende ten minste 10 minuten bij 45 °C.

7.2.3. Breng 10 µl hybridisatieoplossing (aanhangel 7) aan op acht venstertjes (1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 en 10; figuur 7.1) van elk glaasje en laat de twee middelste venstertjes (3 en 8) blanco.

7.2.4. Leg zonder lucht in te sluiten een dekglasje (24 × 24 mm) op de eerste en laatste vier venstertjes. Zet de objectglaasjes in de voorverwarmde incubatiekamer en hybridiseer 5 uur in de oven in het donker bij 45 °C.

7.2.5. Bereid drie bekers met 1 l Milli Q (water van moleculair-biologische kwaliteit), 1 l 1X hybmix (334 ml 3× hybmix en 666 ml Milli Q) en 1 l 1/8× hybmix (42 ml 3× hybmix en 958 ml Milli Q). Pre-incubeer elk bekersglas in een waterbad bij 45 °C.

7.2.6. Verwijder de dekglasjes van de objectglaasjes en doe de objectglaasjes in een houder.

7.2.7. Verwijder de overmaat probe door 15 minuten bij 45 °C te incuberen in het bekersglas met 1X hybmix.

7.2.8. Zet de houder in de 1/8X hybmix (wasoplossing) en incubeer nogmaals 15 minuten.

7.2.9. Dompel de objectglaasjes even in Milli Q en leg ze op filtreerpapier. Verwijder overtollige vloeistof door het oppervlak voorzichtig met filtreerpapier te bedekken. Pipetteer 5-10 µl antifading inbedmiddel (bv. Vectashield van Vecta Laboratories, CA, USA of gelijkwaardig) op elk venstertje en leg een groot dekglasje (24 × 60 mm) op het objectglaasje.

7.3. Aflezen van de FISH-test

7.3.1. Bekijk de objectglaasjes onmiddellijk met een microscoop die geschikt is voor epifluorescentiemicroscopie bij een vergroting van 630 of 1 000 × en olie-immersie. Met een filter dat geschikt is voor fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) lichten eubacteriële cellen (waaronder de meeste gramnegatieve cellen) in het monster groen op. Met een filter voor tetramethylrodamine-5-isothiocyanaat lichten Cy3-gekleurde cellen van *R. solanacearum* rood op. Vergelijk de celmorfologie met die van de positieve controles. De cellen moeten helder fluoresceren en volledig gekleurd zijn. Bij afwijkende kleuring moet de FISH-test herhaald worden (VI.A.7). Bekijk de venstertjes langs twee diameters in een rechte hoek en rond de omtrek. Onderzoek bij monsters zonder of met een gering aantal cellen ten minste 40 microscopvelden.

7.3.2. Kijk vervolgens in de testvenstertjes van de objectglaasjes uit naar helder fluorescerende cellen met een voor *R. solanacearum* kenmerkende morfologie (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). De intensiteit van de fluorescentie moet gelijkwaardig zijn aan, of beter dan, die van de positieve controlestam. Cellen met onvolledige kleuring of met een zwakke fluorescentie moeten genegeerd worden.

7.3.3. Als contaminatie wordt vermoed, moet de test herhaald worden. Dit kan het geval zijn als alle glaasjes in een partij positieve cellen vertonen doordat de buffer gecontamineerd is, of als er positieve cellen worden aangetroffen op de coating van het glaasje buiten de venstertjes.

- 7.3.4. Aan de FISH-test zijn verschillende problemen verbonden wat de specificiteit betreft. In pellets van naveleindstukjes en stengeldelen van aardappel worden soms, maar veel minder vaak dan bij de IF-test, achtergrondpopulaties van fluorescerende cellen met atypische morfologie en kruisreagerende saprofytische bacteriën waargenomen die qua grootte en morfologie lijken op *R. solanacearum*.
- 7.3.5. Besteed alleen aandacht aan fluorescerende cellen met een karakteristieke grootte en morfologie.
- 7.3.6. Interpretatie van het resultaat van de FISH-test
- i) De resultaten van de FISH-test zijn valide als in alle positieve controles en in geen van de negatieve controles met het FITC-filter heldergroen fluorescerende cellen met een voor *R. solanacearum* karakteristieke grootte en morfologie worden waargenomen en met het rodaminefilter helderrood fluorescerende cellen. Wanneer er helder fluorescerende cellen met een karakteristieke morfologie worden aangetroffen, bepaal dan het gemiddelde aantal typische cellen per microscopveld en bereken het aantal typische cellen per ml geresuspendeerde pellet (aanhangsel 4). Monsters met ten minste 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet worden als mogelijk besmet aangemerkt. Er is dan verder onderzoek nodig. Monsters met minder dan 5×10^3 typische cellen per ml geresuspendeerde pellet worden als negatief aangemerkt.
 - ii) De FISH-test is negatief als met het rodaminefilter geen helderrood fluorescerende cellen met een voor *R. solanacearum* kenmerkende grootte en morfologie worden waargenomen, mits die met dat filter wel in de positieve controlepreparaten zijn waargenomen.

8. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)-tests

Principe

ELISA mag wegens de relatief lage gevoeligheid alleen als facultatieve test naast IF, PCR of FISH worden gebruikt. Bij de DAS-ELISA-test zijn ophoping en monoklonale antilichamen verplicht (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Voorafgaande ophoping van de monsters kan de gevoeligheid van ELISA verhogen, maar dit mislukt soms wegens concurrentie van andere organismen in het monster.

NB: Gebruik gevalideerde antilichamen tegen *R. solanacearum* (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Aanbevolen wordt van elke nieuwe partij antilichamen de titer te bepalen. De titer wordt gedefinieerd als de hoogste verdunning waarbij een optimale reactie optreedt bij het testen van een suspensie met 10^5 - 10^6 cellen/ml van de homologe stam van *R. solanacearum* met een geschikt conjugaat met het tweede antilichaam overeenkomstig de aanbevelingen van de fabrikant. Bij het onderzoek moeten de antilichamen worden gebruikt in werkverduningen rond de titer van de commerciële formulering.

Bepaal de titer van de antilichamen op een suspensie van 10^5 - 10^6 cellen/ml van de homologe stam van *R. solanacearum*.

Gebruik als negatieve controle een monsterextract waarbij eerdere tests op *R. solanacearum* negatief waren en een suspensie van een niet-kruisreagerende bacterie in fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS).

Gebruik als positieve controle aliquots monsterextract waarbij eerdere tests negatief waren, gemengd met 10^3 - 10^4 cellen/ml van *R. solanacearum* biovar 2 (bv. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; aanhangsel 3, onder A en B). Gebruik een standaardsuspensie van 10^5 - 10^6 cellen/ml van *R. solanacearum* in PBS om de resultaten op elke plaat te vergelijken.

Zie aanhangsel 3, onder A, voor gestandaardiseerd materiaal voor positieve en negatieve controles voor deze test.

Onderzoek het controlemateriaal op dezelfde wijze als de monsters.

Er zijn twee gevalideerde ELISA-protocollen.

a) Indirecte ELISA (Robinson-Smith e.a. (1995))

- 1) Gebruik aliquots van 100-200 μ l monsterextract. (Soms worden niet-specifieke resultaten gereduceerd door 4 minuten verwarming bij 100 °C in een waterbad of verwarmingsblok.)
- 2) Voeg een gelijk volume coatingbuffer van dubbele sterkte toe (aanhangsel 4) en vortex.
- 3) Doe telkens 100 μ l in ten minste twee putjes van een microtiterplaat (bv. Nunc-Polysorp of gelijkwaardig) en incubeer 1 uur bij 37 °C of overnacht bij 4 °C.

- 4) Schud het extract uit de putjes. Spoel de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangsel 4) en laat de laatste spoelvloeistof minstens 5 minuten in de putjes.
 - 5) Bereid de benodigde verdunning van antilichamen tegen *R. solanacearum* in blokkeerbuffer (aanhangsel 4). Gebruik de aanbevolen verdunningen voor gevalideerde in de handel verkrijgbare antilichamen (doorgaans tweemaal de titerconcentratie).
 - 6) Doe 100 µl in elk putje en incubeer 1 uur bij 37 °C.
 - 7) Schud de antilichaamoplossing uit de putjes en spoel zoals onder 4.
 - 8) Bereid in blokkeerbuffer de benodigde verdunning conjugaat (tweede antilichaam met alkalische fosfatase). Doe 100 µl in elk putje en incubeer 1 uur bij 37 °C.
 - 9) Schud het conjugaat uit de putjes en spoel als onder 4.
 - 10) Doe 100 µl oplossing van alkalischefosfatasesubstraat (aanhangsel 4) in elk putje. Incubeer in het donker bij kamertemperatuur en lees gedurende 90 minuten periodiek de extinctie bij 405 nm af.
- b) DASI (Double-Antibody Sandwich Indirect)-ELISA
- 1) Bereid de benodigde verdunning van polyklonale immunoglobulines tegen *R. solanacearum* in coatingbuffer (pH 9,6) (aanhangsel 4). Doe 200 µl in elk putje. Incubeer 4-5 uur bij 37 °C of 16 uur bij 4 °C.
 - 2) Spoel de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangsel 4).

Doe in ten minste twee putjes 190 µl monsterextract. Doe in telkens twee putjes per plaat ook een positieve en een negatieve controle. Incubeer 16 uur bij 4 °C.
 - 3) Spoel de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangsel 4).
 - 4) Bereid een geschikte verdunning van specifieke monoklonale antilichamen tegen *R. solanacearum* in PBS (aanhangsel 4) met 0,5 % bovien serumalbumine (BSA) en doe 190 µl in elk putje. Incubeer 2 uur bij 37 °C.
 - 5) Spoel de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangsel 4).
 - 6) Bereid een geschikte verdunning van conjugaat van anti-muis-immunoglobulines met alkalische fosfatase in PBS. Doe 190 µl in elk putje. Incubeer 2 uur bij 37 °C.
 - 7) Spoel de putjes drie keer met PBS-Tween (aanhangsel 4).
 - 8) Bereid een oplossing van alkalischefosfatasesubstraat met 1 mg *p*-nitrofenylfosfaat per ml substraatbuffer (aanhangsel 4). Doe 200 µl in elk putje. Incubeer in het donker bij kamertemperatuur en lees gedurende 90 minuten periodiek de extinctie bij 40 nm af.

Interpretatie van de ELISA-testresultaten

De ELISA-test is negatief als de gemiddelde optische dichtheid (OD) in de duplomonsterputjes kleiner is dan $2 \times OD$ in het putje met de negatieve monsterextractcontrole, mits de OD voor de positieve controles altijd groter is dan 1,0 (na 90 minuten incubatie met substraat) en groter is dan $2 \times OD$ voor de negatieve monsterextracten.

De ELISA-test is positief als de gemiddelde OD in de duplomonsterputjes groter is dan $2 \times OD$ voor het negatieve monsterextract, mits de OD in elk putje voor negatieve controle kleiner is dan $2 \times OD$ voor de positieve controles.

Negatieve ELISA-aflezings in putjes voor positieve controle wijzen op een slechte uitvoering of op remming van de test. Positieve ELISA-aflezings in putjes voor negatieve controle wijzen op kruisbesmetting of niet-specifieke antilichaambinding.

9. Bioassay

NB: Bij de voorbereidende tests met deze methode moeten 10^3 - 10^4 kolonievormende eenheden *R. solanacearum* per ml, toegevoegd aan monsterextracten waarbij een eerdere test negatief was, reproduceerbaar gedetecteerd kunnen worden (voor de bereiding zie aanhangsel 3).

De grootste detectiegevoeligheid wordt verkregen met vers bereid monsterextract en optimale groeiomstandigheden. De methode kan echter ook goed worden toegepast op extracten die tussen -68 en -86 °C in glycerol zijn bewaard.

Het volgende protocol is gebaseerd op Janse (1988).

- 9.1. Neem voor elk monster tien testplanten van een vatbaar tomatenras (bv. Moneymaker of een door het testlaboratorium even vatbaar bevonden ras) in het volgroeid 3-bladstadium. Voor nadere bijzonderheden over de teelt zie aanhangsel 8. Aubergines (bv. Black Beauty of een even vatbaar ras) in het 2- tot volgroeid 3-bladstadium kunnen ook worden gebruikt. De symptomen zijn bij aubergines minder ernstig en ontwikkelen zich trager. Gebruik daarom zo mogelijk tomatenplanten.

- 9.2. Verdeel 100 µl monsterextract over de testplanten.

9.2.1. Injectie-inoculatie

Inoculeer de stengels net boven de zaadlobben met een injectiespuit voorzien van een hypodermische naald (minimaal 23G). Verdeel het monster over de testplanten.

9.2.2. Snede-inoculatie

Houd de plant tussen twee vingers en pipetteer een druppel (5-10 µl) gesuspendeerde pellet op de stengel tussen de zaadlobben en het eerste blad.

Maak met een steriel scalpel vanaf de pelletdruppel een diagonale snede van ongeveer 1,0 cm lang en ongeveer 2/3 van de stengeldikte diep.

Stop de snede dicht met steriele vaseline uit een injectiespuit.

- 9.3. Inoculeer met dezelfde techniek vijf zaailingen met een waterige suspensie van 10^5 - 10^6 cellen/ml, bereid uit een 48 uur oude kweek van een virulente stam van *R. solanacearum* biovar 2 als positieve controle en met pelletbuffer (aanhangsel 4) als negatieve controle. Houd de positieve en negatieve controleplanten gescheiden van de andere om kruisbesmetting te vermijden.

- 9.4. Teelt de testplanten maximaal vier weken in quarantaine bij 25-30 °C en hoge luchtvochtigheid met aangepaste bewatering zodat geen oververzadiging of verwelking optreedt. Incubeer positieve en negatieve controleplanten op van elkaar gescheiden plaatsen in een broeikas of groeikamer om contaminatie te vermijden; is dat wegens ruimtegebrek niet mogelijk, zorg er dan voor dat de verschillende behandelingen strikt gescheiden gehouden worden. Als planten voor verschillende monsters dicht bij elkaar geïncubeerd moeten worden, moeten ze met geschikte schermen gescheiden gehouden worden. Bij het bemesten, bewateren en onderzoeken en bij alle overige handelingen moet de uiterste zorg in acht genomen worden om kruisbesmetting te vermijden. De kassen en groeikamers moeten absoluut vrij van insecten gehouden worden, aangezien die de bacterie van het ene monster naar het andere kunnen overbrengen.

Let op symptomen van verwelking, epinastie, chlorose en/of verminderde groei.

- 9.5. Isoleer reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan uit geïnfecteerde planten (II.3) en identificeer ze (VI. B).
- 9.6. Als na drie weken geen symptomen zijn waargenomen, voer dan een IF-, PCR- of isolatietest uit op een samengesteld monster van stengeldelen van 1 cm lang van elke testplant, die boven de inoculatieplaats zijn afgesneden. Als de test positief is, verdunnen en uitplaten (4.1).
- 9.7. Identificeer eventuele reïnculturen die vermoedelijk uit *R. solanacearum* bestaan (VI. B).

Interpretatie van het resultaat van de bioassay

De met de bioassay verkregen resultaten zijn valide als de planten van de positieve controle karakteristieke symptomen vertonen, de bacteriën weer uit deze planten geïsoleerd kunnen worden en op de negatieve controles geen symptomen worden gevonden.

De bioassay is negatief als de testplanten niet met *R. solanacearum* geïnfecteerd zijn, mits *R. solanacearum* in de positieve controles wel wordt gedetecteerd.

De bioassay is positief als de testplanten wel met *R. solanacearum* geïnfecteerd zijn.

B. IDENTIFICATIE TESTS

Identificeer reïnculturen van vermoedelijke *R. solanacearum*-isolaten aan de hand van ten minste twee van de volgende, op verschillende biologische principes gebaseerde tests.

Voorzover van toepassing moet elke test ook worden uitgevoerd op bekende referentiestammen (aanhangel 3).

1. Voedingstests en enzymatische identificatietests

Bepaal de volgende fenotypische eigenschappen, die universeel aan- dan wel afwezig zijn in *R. solanacearum*, volgens de methoden van Lelliott en Stead (1987), Klement e.a. (1990) en Schaad (2001):

Test	Verwacht resultaat
vorming van fluorescerend pigment	–
poly- β -hydroxybutyraatkorrels	+
oxidatie/fermentatietest (O/F)	O+/F–
katalaseactiviteit	+
oxidasetest van Kovac	+
nitraatreductie	+
citraatassimilatie	+
groei bij 40 °C	–
groei in NaCl 1 %	+
groei in NaCl 2 %	–
argininedihydrolaseactiviteit	–
gelatineafbraak	–
zetmeelhydrolyse	–
esculinehydrolyse	–
levanvorming	–

2. IF-test

- 2.1. Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in IF-buffer (aanhangel 4).
- 2.2. Bereid een tweevoudige verdunningsreeks van een geschikt antiserum (zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3. Pas de IF-procedure toe (VI.A.5).
- 2.4. De IF-test is positief als de IF-titer van de kweek gelijkwaardig is aan die van de positieve controle.

3. ELISA-test

NB: Als naast deze test slechts één andere identificatietest wordt uitgevoerd, mag dat geen serologische test zijn.

- 3.1. Bereid een suspensie van ongeveer 10^8 cellen/ml in 1X PBS (aanhangel 4).
- 3.2. Voer een geschikte ELISA-procedure uit met een specifiek monokonaal antilichaam tegen *R. solanacearum*.
- 3.3. De ELISA-test is positief als de ELISA-aflezing voor de cultuur ten minste de helft van die voor de positieve controle bedraagt.

4. PCR-tests

- 4.1. Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in steriel water van moleculair-biologische kwaliteit.
- 4.2. Verwarm 100 µl van de celsuspensie 4 minuten in gesloten buisjes in een verwarmingsblok of waterbad bij 100 °C. Hierna kunnen de monsters bij – 16 tot – 24 °C worden opgeslagen tot zij nodig zijn.
- 4.3. Pas geschikte PCR-procedures toe voor de amplificatie van voor *R. solanacearum* specifieke amplicons (bv. Seal e.a. (1993), Pastrik en Maiss (2000), Pastrik e.a. (2002), Boudazin e.a. (1999), Opina e.a. (1997), Weller e.a. (1999)).
- 4.4. De identificatie van *R. solanacearum* is positief als de PCR-amplicons van dezelfde lengte zijn en dezelfde restrictie-fragmentlengtepolymorfismen hebben als bij de positieve controlestam.

5. FISH-test

- 5.1. Bereid een suspensie van ongeveer 10^6 cellen/ml in UPW.
- 5.2. Voer de FISH-procedure uit (VI.A.7) met ten minste twee *R. solanacearum*-specifieke oligo-probes (aanhangel 7).
- 5.3. De FISH-test is positief als de kweek en de positieve controle dezelfde reacties vertonen.

6. Vetzuurprofiel (FAP)

- 6.1. Laat de kweek 48 uur bij 28 °C groeien op trypticasesoja-agar (Oxoid).
- 6.2. Voer een geschikte FAP-procedure uit (Janse (1991), Stead (1992)).
- 6.3. De FAP-test is positief als het profiel van de vermoedelijke cultuur identiek is aan dat van de positieve controle. De aanwezigheid van kenmerkende vetzuren (14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH en 18:1 2OH) en de afwezigheid van 16:0 3OH wijzen sterk op *Ralstonia* sp.

7. Stamkarakterisatie

Voor elke nieuwe isolatie van *R. solanacearum* wordt stamkarakterisatie met een van de volgende methoden aanbevolen.

Voorzover van toepassing moet elke test ook worden uitgevoerd op bekende referentiestammen (aanhangel 3).

7.1. Biovarbepaling

R. solanacearum wordt ingedeeld in biovars op basis van het vermogen drie disachariden en twee hexosealcoholen te assimileren of oxideren (Hayward (1964), Hayward e.a. (1990)). Het kweekmedium voor de biovar-test staat in aanhangsel 2. Voer de test uit door steekenting van het medium met reïnculturen van isolaten van *R. solanacearum* en incubatie bij 28 °C. Breng het medium over op steriele platen met 96 putjes (200 µl per putje). De test is positief bij een verkleuring van olijfgroen naar geel binnen 72 uur.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Assimilatie van:					
maltose	–	+	+	–	+
lactose	–	+	+	–	+
d(+)-cellobiose	–	+	+	–	+
mannitol	–	–	+	+	+
sorbitol	–	–	+	+	–
dulcitol	–	–	+	+	–

Subfenotypen van biovar 2 worden met aanvullende tests onderscheiden:

	Biovar 2A (wereldwijd)	Biovar 2A (in Chili en Colombia)	Biovar 2T (tropen)
Trehaloseassimilatie	–	+	+
meso-Inositolassimilatie	+	–	+
d-Riboseassimilatie	–	–	+
Pectolytische activiteit ⁽¹⁾	laag	laag	hoog

⁽¹⁾ Zie Lelliott en Stead (1987).

7.2. Genetische vingerafdruk

Er zijn diverse technieken voor moleculaire differentiatie van stammen van *R. solanacearum*, waaronder:

- 7.2.1. RFLP-analyse (restriction fragment length polymorphism, polymorfisme van de lengte van restrictiefragmenten) (Cook e.a. (1989));
- 7.2.2. PCR van repetitieve DNA-sequenties met REP-, BOX- en ERIC-primers (Louws e.a. (1995), Smith e.a. (1995));
- 7.2.3. AFLP-analyse (amplified fragment length polymorphism, polymorfisme van de lengte van geamplificeerde fragmenten) (Van der Wolf e.a. (1998)).

7.3. PCR-methoden

Specifieke PCR-primers (Patrik e.a. (2002), zie aanhangsel 6) kunnen worden gebruikt om een onderscheid te maken tussen stammen van groep 1 (biovars 3, 4, 5) en 2 (biovars 1, 2A, 2T) van *R. solanacearum*, zoals oorspronkelijk bepaald met RFLP-analyse (Cook e.a. (1989)) en analyse van de 16S-rDNA-sequentie (Taghavi e.a. (1996)).

C. BEVESTIGINGSTEST

De pathogeniteitstest moet worden uitgevoerd voor de definitieve bevestiging van een diagnose van *R. solanacearum* en voor de bepaling van de virulentie van culturen die als *R. solanacearum* geïdentificeerd zijn.

- 1) Bereid een inoculum van ongeveer 10^6 cellen/ml van een 24-48 uur oude kweek van het te testen isolaat en van een geschikte positieve controlestam van *R. solanacearum* (bv. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; aanhangsel 3).
- 2) Inoculeer vijf à tien vatbare tomaten- of aubergineplanten in het volgroeid 3-bladstadium (VI.A.9).

- 3) Incubeer maximaal twee weken bij 25-28 °C en hoge luchtvochtigheid met aangepaste bewatering om oververzadiging en droogtestress te voorkomen. Met reïnculturen treedt binnen 14 dagen een typische verwelking op. Als er dan nog geen symptomen zijn, kan niet worden bevestigd dat het om een pathogene vorm van *R. solanacearum* gaat.
 - 4) Let op symptomen van verwelking, epinastie, chlorose en verminderde groei.
 - 5) Neem voor de isolatie een stuk stengel van symptomatische planten ongeveer 2 cm boven het inoculatiepunt. Maak dit fijn en suspendeer het in een klein volume steriel gedestilleerd water of steriele fosfaatbuffer 50 mM (aanhangel 4). Maak een isolaat uit de suspensie door uitplaten van verdunningen of uitstrijken op een geschikt, bij voorkeur selectief medium (aanhangel 2). Incubeer 48-72 uur bij 28 °C en kijk of er karakteristieke *R. solanacearum*-kolonies verschijnen.
-

Aanhangsel 1

Bij de optimalisering en validering van de protocollen ingeschakelde laboratoria

Laboratorium ⁽¹⁾	Plaats	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wenen en Linz	Oostenrijk
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	België
Plantedirektoratet	Lyngby	Denemarken
Central Science Laboratory	York	Engeland
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Schotland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankrijk
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankrijk
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Duitsland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Duitsland
State Laboratory	Dublin	Ierland
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italië
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italië
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nederland
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederland
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Centro Regional Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanje
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spanje
Sveriges lantbruksuniversitet	Uppsala	Zweden

⁽¹⁾ Voor contactpersonen zie website <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>.

Aanhangsel 2

Isolatie- en kweekmedia voor *R. solanacearum***a) Algemene kweekmedia***Nutriënt-agar (NA)*

Nutrient Agar (Difco)	23,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Gist-pepton-glucoseagar

Gistextract (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
d(+)-Glucose (monohydraat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Sucrose-peptonagar (SPA)

Sucrose	20,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

pH 7,2-7,4

Los de ingrediënten op en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Kelman's tetrazoliummedium

Casaminozuren (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Dextrose	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Laat afkoelen tot 50 °C en voeg een gefiltersteriliseerde oplossing van 2,3,5-trifenylnitroimidazoliumchloride (Sigma) toe tot een eindconcentratie van 50 mg/l.

b) Gevalideerde selectieve kweekmedia

SMSA-medium (Englebrecht (1994), gemodificeerd door Elphinstone e.a. (1996))

Basismedium

Casaminozuren (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptone (Difco)	10,0 g
Glycerol	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco); zie NB 2	15,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Laat afkoelen tot 50 °C en voeg gefiltersteriliseerde waterige voorraadoplossing van de volgende ingrediënten toe tot de aangegeven eindconcentratie:

Kristalviolet (Sigma)	5 mg/l
Polymixine-B-sulfaat (Sigma P-1004)	600 000 U (ongeveer 100 mg) per l
Bacitracine (Sigma B-0125)	1 250 U (ongeveer 25 mg) per l
Chlooramfenicol (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penicilline G (Sigma P-3032)	825 U (ongeveer 0,5 mg) per l
2,3,5-trifenylnitroimidazoliumchloride (Sigma)	50 mg/l

NB:

1. Wijziging van de samenstelling van de media kan de groei van *R. solanacearum* hinderen.
2. In plaats van Bacto-Agar (Difco) kan Agar No. 1 (Oxoid) worden gebruikt. *R. solanacearum* groeit dan trager, maar concurrerende saprophyten kunnen ook worden geremd. Het kan 1-2 dagen langer duren voor *R. solanacearum* karakteristieke kolonies vormt en de rode verkleuring kan lichter en diffuser zijn dan op Bacto-Agar.
3. Een verhoging van de bacitracineconcentratie tot 2 500 U/l kan concurrerende bacteriepopulaties remmen zonder de groei van *R. solanacearum* te hinderen.

Media en voorraadoplossingen antibiotica in het donker bij 4 °C bewaren en binnen de maand gebruiken.

De platen moeten voor gebruik vrij zijn van condens.

Droog ze echter niet te veel.

Controleer de kwaliteit van elke nieuw bereide charge medium door een suspensie van een referentiecultuur van *R. solanacearum* uit te platen (aanhangel 3) en te kijken of na 2-5 dagen incubatie bij 28 °C karakteristieke kolonies verschijnen.

c) Gevalideerde ophopingsmedia

SMSA-bouillon (Elphinstone e.a. (1996))

Zelfde recept als selectief agarmedium SMSA, maar zonder Bacto-Agar en 2,3,5-tetrazoliumchloride.

Gemodificeerde Wilbrink-bouillon (Caruso e.a. (2002))

Sucrose	10 g
Proteosepepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Gedestilleerd water	1 l

Steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C) en laat afkoelen tot 50 °C.

Voeg dezelfde antibioticavorraadoplossingen toe als voor SMSA-bouillon.

Aanhangsel 3

A. In de handel verkrijgbaar gestandaardiseerd controlemateriaal

a) Bacterie-isolaten

Als standaardreferentie voor positieve controle (tabel 1) of bij de optimalisering van de tests om kruisbesmetting te voorkomen (tabel 2) worden de volgende bacterie-isolaten aanbevolen. Alle stammen zijn verkrijgbaar bij:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, VK;
2. Cultuurcollectie van de Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, Nederland;
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA, Station de Phytobactériologie, Angers, Frankrijk.

Tabel 1 SMT-referenties voor isolaten van *R. solanacearum*

NCPBP-code	SMT-nr. #	Andere codes	Land van oorsprong	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypte	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turkije	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Engeland	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cyprus	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Zweden	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	België	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nederland	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Frankrijk	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Spanje	2
NCPBP 4161	76	B3B	Duitsland	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	VS	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brazilië	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australië	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filipijnen	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmpS2	China	5

(*) Gebruiken als standaardreferentiestam van *R. solanacearum* biovar 2 (ras 3).

NB: Alleen van een authentieke cultuurcollectie afkomstige stammen zijn gegarandeerd authentiek.

Tabel 2 SMT-referenties van serologisch of genetisch verwante bacteriën voor optimalisering van de detectietests

NCPBP-code	SMT-nr. #	Andere code	Identificatie
NCPBP 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> ⁽¹⁾
NCPBP 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ⁽¹⁾
NCPBP 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽²⁾
NCPBP 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽²⁾
NCPBP 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> ⁽¹⁾
NCPBP 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. ⁽¹⁾
NCPBP 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> ⁽¹⁾
NCPBP 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> ⁽¹⁾
NCPBP 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> ⁽¹⁾
NCPBP 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> ⁽¹⁾
NCPBP 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> ⁽¹⁾
NCPBP 3726	59	CFBP 3568	„ <i>Pseudomonas celebensis</i> ” (<i>Banana Blood Disease Bacterium</i>) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽³⁾
NCPBP 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPBP 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. ⁽¹⁾
NCPBP 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPBP 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾
NCPBP 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. ⁽¹⁾
NCPBP 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. ⁽²⁾
NCPBP 4174	81	IVIA 1 844,06	<i>Flavobacterium</i> sp. ⁽¹⁾ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Kruisreactie in serumtests (IF, ELISA) met polyklonale antiserums mogelijk.

⁽²⁾ Stam waaruit in sommige laboratoria PCR-product kan worden geamplificeerd tot een lengte die vergelijkbaar is met de bij gebruik van de specifieke primers OLI-1 en Y-2 verwachte lengte (zie aanhangsel 6).

⁽³⁾ Waarschijnlijk kruisreagerend in de meeste tests, maar alleen op banaan in Indonesië waargenomen.

b) *In de handel verkrijgbaar gestandaardiseerd controlemateriaal*

Het onderstaande controlemateriaal is verkrijgbaar bij de NCPBP.

Gevriesdroogde pellet van extract van 200 gezonde aardappelknollen, als negatieve controle voor alle tests.

Gevriesdroogde pellet van extract van 200 gezonde aardappelknollen met 10^3 - 10^4 of 10^4 - 10^6 cellen *R. solanacearum* biovar 2 (stam NCPBP 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), als positieve controle voor serum- en PCR-tests. Niet geschikt als standaardcontrole voor isolatietests of bioassays, aangezien vriesdrogen de levensvatbaarheid van de cellen aantast.

Met formaline gefixeerde suspensies van 10^6 cellen/ml *R. solanacearum* biovar 2 (stam NCPBP 4156 = PD 2762 = CFBP 3857), als positieve controle voor serumtests.

B. Bereiding van positieve en negatieve controles voor de screeningstests (PCR/IF en FISH)

Maak een 48 uur oude cultuur van een virulente stam van *R. solanacearum* ras 3/biovar 2 (bv. NCPBP 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) op SMSA-basismedium en suspendeer deze in 10 mM fosfaatbuffer tot een celdichtheid van ongeveer 2×10^8 kve/ml. Dit wordt meestal bereikt met een licht troebele suspensie met een optische dichtheid van 0,15 bij 600 nm.

Neem stukjes uit het navelende van 200 knollen van een partij aardappelen met blanke schil waarvan bekend is dat deze vrij zijn van *R. solanacearum*.

Verwerk de stukjes op de gebruikelijke wijze en resuspendeer de pellet in 10 ml.

Doe in tien steriele microvaatjes van 1,5 ml telkens 900 µl geresuspendeerde pellet.

Breng 100 µl van de suspensie van *R. solanacearum* over in het eerste microvaatje. Vortex.

Doe in de volgende vijf microvaatjes telkens een decimale verdunning.

De zes microvaatjes met bacteriën worden als positieve controle gebruikt. De vier microvaatjes zonder bacteriën worden als negatieve controle gebruikt. Etiketteer de microvaatjes als zodanig.

Doe aliquots van 100 µl in steriele microvaatjes van 1,5 ml om van elk controlemonster negen duplicaten te maken. Bewaar deze tussen -16 en -24 °C tot gebruik.

De aanwezigheid en concentratie van *R. solanacearum* in de controlemonsters moet eerst met IF bevestigd worden.

Doe voor de PCR-test bij elke reeks analysemonsters een DNA-extractie van de positieve en negatieve controlemonsters.

Test voor de IF- en de FISH-test bij elke reeks analysemonsters ook de positieve en negatieve controlemonsters.

Bij de IF-, FISH- en PCR-tests moet *R. solanacearum* ten minste worden gedetecteerd in de positieve controles met 10^6 en 10^4 cellen/ml en mag de bacterie in geen van de negatieve controles worden gedetecteerd.

Aanhangsel 4

Buffers voor testprocedures

ALGEMEEN: Ongeopende gesteriliseerde buffers kunnen maximaal een jaar bewaard worden.

1. Buffers voor de extractieprocedure**1.1. Extractiebuffer (50 mM fosfaatbuffer, pH 7,0)**

Deze buffer wordt gebruikt voor de extractie van de bacterie uit plantenweefsel door homogenisatie of schudden.

Na ₂ HPO ₄ (watervrij)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

De volgende extra bestanddelen kunnen van pas komen:

	<i>Doel</i>	<i>Hoeveelheid (per l)</i>
Lubrol-vlokken	Ontvlokingsmiddel (*)	0,5 g
DC siliconen-antischuim	Antischuimmiddel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfaat	Antioxidans	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	Binding van PCR-remmers	50 g

(*) Voor gebruik bij de homogenisatie-extractiemethode.

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

Deze buffer wordt gebruikt om de extracten van de stukjes naveleinde te resuspenderen en te verdunnen nadat ze door centrifugeren in een pellet geconcentreerd zijn.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
Gedestilleerd water	1.0 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

2. Buffers voor de IF-test**2.1. IF-buffer (10 mM fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,2)**

Deze buffer wordt gebruikt voor het verdunnen van antilichamen.

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

2.2. IF-buffer-Tween

Deze buffer wordt gebruikt voor het wassen van de objectglaasjes.

Voeg 0,1 % Tween 20 aan de IF-buffer toe.

2.3. Fosfaatgebufferde glycerol, pH 7,6

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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,2 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Gedestilleerd water	100 ml

Antifading inbedmiddelen zijn in de handel verkrijgbaar, bv. Vectashield[®] (Vector Laboratories) of Citifluor[®] (Leica).

3. Buffers voor de indirecte ELISA

3.1. Coatingbuffer van dubbele sterkte, pH 9,6

Na_2CO_3	6,36 g
NaHCO_3	11,72 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Natriumsulfiet 0,2 % kan zo nodig als antioxidans worden toegevoegd om de vorming van geoxideerde aromatische verbindingen tegen te gaan.

3.2. 10X fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29,0 g
KCl	2,0 g
Gedestilleerd water	1,0 l

3.3. PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Gedestilleerd water	895 ml

3.4. Blokkeerbuffer (voor antilichamen) (moet vers bereid worden)

10X PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Melkpoeder	0,5 g
Gedestilleerd water	aanvullen tot 100 ml

3.5. Oplossing van alkalischefosfatasesubstraat, pH 9,8

Diethanolamine	97 ml
Gedestilleerd water	800 ml

Meng en breng de pH met geconcentreerd HCl op 9,8.

Vul met gedestilleerd water aan tot 1 l.

Voeg 0,2 g $MgCl_2$ toe.

Los per 15 ml oplossing twee fosfatasesubstraattabletten van 5 mg (Sigma) op.

4. **Buffers voor DASI-ELISA**

4.1. Coatingbuffer, pH 9,6

Na_2CO_3	1,59 g
$NaHCO_3$	2,93 g
Gedestilleerd water	1 000 ml

Los de ingrediënten op en controleer de pH (9,6).

4.2. 10X fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing (PBS), pH 7,2-7,4

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

4.3. PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Gedestilleerd water	950 ml

4.4. Substraatbuffer, pH 9,8

Diethanolamine	100 ml
Gedestilleerd water	900 ml

Meng en breng de pH met geconcentreerd HCl op 9,8.

Aanhangsel 5

Bepaling van het besmettingsniveau met de IF- en de FISH-test

1. Tel het gemiddelde aantal typische fluorescerende cellen per veld (c).
2. Bereken het aantal typische fluorescerende cellen per venstertje van het objectglaasje (C).

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

waarbij S = oppervlakte van een venstertje van het objectglaasje

en s = oppervlakte van het objectiefveld

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{waarbij} \quad i = \text{veldcoëfficiënt (tussen 8 en 24, afhankelijk van het type oculair),}$$

K = buiscoëfficiënt (1 of 1,25),

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

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

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

waarbij y = volume van de geresuspendeerde pellet op het venster,

en F = verdunningsfactor van de geresuspendeerde pellet.

Aanhangsel 6

Gevalideerde PCR-protocollen en -reagentia

NB: Bij de voorbereidende tests moeten 10^3 - 10^4 cellen *R. solanacearum* per ml monsterextract reproduceerbaar gedetecteerd worden.

De voorbereidende tests mogen verder geen fout-positieve uitslagen vertonen bij een selectie van bacteriestammen (aanhangsel 3).

1. PCR-protocol van Seal e.a. (1993)

1.1. Oligonucleotide-primers

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

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

Verwachte ampliconlengte voor template-DNA van *R. solanacearum* = 288 bp.

1.2. PCR-reactiemix

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	17,65 µl	
10X PCR-buffer ⁽¹⁾ (MgCl ₂ 15 mM)	2,5 µl	1X (MgCl ₂ 1,5 mM)
dNTP-mix (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Monstervolume	2,0 µl	
Totaalvolume:	25 µl	

⁽¹⁾ De methode is gevalideerd met Taq-polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq) en Gibco BRL.

1.3. PCR-reactiecondities

Werk het volgende programma af:

- 1 cyclus van: i) 2 minuten bij 96 °C (denaturatie van het template-DNA)
- 35 cycli van: ii) 20 seconden bij 94 °C (denaturatie van het template-DNA)
- iii) 20 seconden bij 68 °C (annealing van de primers)
- iv) 30 seconden bij 72 °C (extensie van de kopie)
- 1 cyclus van: v) 10 minuten bij 72 °C (laatste extensie)
- vi) koeling op 4 °C.

NB: Dit programma is geoptimaliseerd voor een Perkin Elmer 9600 thermal cycler. Bij gebruik van andere modellen moet de duur van de cycli ii), iii) en iv) wellicht gewijzigd worden.

1.4. Restrictie-enzymanalyse van de amplicons

Uit DNA van *R. solanacearum* geamplificeerde PCR-producten leveren met het enzym Ava II na incubatie bij 37 °C een kenmerkend polymorfisme van de restrictiefragmentlengte op.

2. PCR-protocol van Pastrik en Maiss (2000)

2.1. Oligonucleotide-primers

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

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

Verwachte ampliconlengte voor template-DNA van *R. solanacearum* = 553 bp.

2.2. PCR-reactiemix

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	16,025 µl	
10X PCR-buffer (1)	2,5 µl	1X (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fractie V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Monstervolume	5,0 µl	
Totaalvolume:	25,0 µl	

(1) De methode is gevalideerd met Taq-polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq) en Gibco BRL.

NB: Oorspronkelijk geoptimaliseerd voor een MJ Research PTC 200 thermal cycler met Gibco Taq-polymerase.

Perkin Elmer AmpliTaq en de buffer kunnen ook bij dezelfde concentratie worden gebruikt.

2.3. PCR-reactiecondities

Werk het volgende programma af:

- 1 cyclus van: i) 5 minuten bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- 35 cycli van: ii) 30 seconden bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- iii) 30 seconden bij 68 °C (annealing van de primers)
- iv) 45 seconden bij 72 °C (extensie van de kopie)
- 1 cyclus van: v) 5 minuten bij 72 °C (laatste extensie)
- vi) koeling op 4 °C.

NB: Dit programma is geoptimaliseerd voor een MJ Research PTC 200 thermal cycler. Bij gebruik van andere modellen moet de duur van de cycli ii), iii) en iv) wellicht gewijzigd worden.

2.4. Restrictie-enzymanalyse van de amplicons

Uit DNA van *R. solanacearum* geamplificeerde PCR-producten leveren met het enzym Taq I na 30 minuten incubatie bij 65 °C een kenmerkend polymorfisme van de restrictiefragmentlengte op. De uit *R. solanacearum*-specifiek fragment verkregen restrictiefragmenten zijn 457 en 96 bp lang.

3. Multiplex-PCR-protocol met interne PCR-controle (Pastrik e.a. (2002))

3.1. Oligonucleotide-primers

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

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

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

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

Verwachte ampliconlengte voor template-DNA van *R. solanacearum* = 718 bp (RS-primerset).

Verwachte ampliconlengte voor de 18S rRNA interne PCR-controle = 310 bp (NS-primerset).

3.2. PCR-reactiemix

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	12,625 µl	
10X PCR-buffer ⁽¹⁾ (MgCl ₂ 15 mM)	2,5 µl	1X (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fractie V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Monstervolume	5,0 µl	
Totaalvolume:	25,0 µl	

⁽¹⁾ De methode is gevalideerd met Taq-polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq) en Gibco BRL.

⁽²⁾ De concentratie van de primers NS-5-F en NS-6-R is geoptimaliseerd voor de extractie van stukjes navelinde van aardappel met de homogenisatiemethode en DNA-zuivering volgens Pastrik (2000) (VI.A.6.1.a). Als de extractie wordt uitgevoerd door schudden of andere DNA-isolatiemethoden moeten de reagensconcentraties opnieuw geoptimaliseerd worden.

3.3. PCR-reactiecondities

Werk het volgende programma af:

- 1 cyclus van: i) 5 minuten bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- 35 cycli van: ii) 30 seconden bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- iii) 30 seconden bij 58 °C (annealing van de primers)
- iv) 45 seconden bij 72 °C (extensie van de kopie)
- 1 cyclus van: v) 5 minuten bij 72 °C (laatste extensie)
- vi) koeling op 4 °C.

NB: Dit programma is geoptimaliseerd voor een MJ Research PTC 200 thermal cycler. Bij gebruik van andere modellen moet de duur van de cycli ii), iii) en iv) wellicht gewijzigd worden.

3.4. Restrictie-enzymanalyse van de amplicons

Uit DNA van *R. solanacearum* geamplificeerde PCR-producten leveren met het enzym Bsm I of een isoschizomeer (bv. Mva 1269 I) na 30 minuten incubatie bij 65 °C een kenmerkend polymorfisme van de restrictiefragmentlengte op.

4. Biovar-specifiek PCR-protocol voor *R. solanacearum* (Pastrik e.a. (2001))

4.1. Oligonucleotide-primers

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

Verwachte ampliconlengte voor template-DNA van *R. solanacearum*:

met Rs-1-F/Rs-1-R = 718 bp;

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

4.2. PCR-reactiemix

a) PCR specifiek voor biovar 1/2

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	12,925 µl	
10X PCR-buffer (1)	2,5 µl	1X (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fractie V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Monstervolume	5,0 µl	
Totaalvolume:	25,0 µl	

(1) De methode is gevalideerd met Taq-polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq) en Gibco BRL.

b) PCR specifiek voor biovar 3/4/5

Reagens	Hoeveelheid per reactie	Eindconcentratie
Steriel UPW	14,925 µl	
10X PCR-buffer (1)	2,5 µl	1X (MgCl ₂ 1,5 mM)
BSA (fractie V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq-polymerase (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Monstervolume	5,0 µl	
Totaalvolume:	25,0 µl	

(1) De methode is gevalideerd met Taq-polymerase van Perkin Elmer (AmpliTaq) en Gibco BRL.

4.3. PCR-reactiecondities

Werk het volgende programma af, zowel voor biovar 1/2 als voor biovar 3/4/5:

- 1 cyclus van: i) 5 minuten bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- 35 cycli van: ii) 30 seconden bij 95 °C (denaturatie van het template-DNA)
- iii) 30 seconden bij 58 °C (annealing van de primers)
- iv) 45 seconden bij 72 °C (extensie van de kopie)
- 1 cyclus van: v) 5 minuten bij 72 °C (laatste extensie)
- vi) koeling op 4 °C.

NB: Dit programma is geoptimaliseerd voor een MJ Research PTC 200 thermal cycler. Bij gebruik van andere modellen moet de duur van de cycli ii), iii) en iv) wellicht gewijzigd worden.

4.4. Restrictie-enzymanalyse van de amplicons

Met de primers Rs-1-F en Rs-1-R uit DNA van *R. solanacearum* geamplificeerde PCR-producten leveren met het enzym Bsm I of een isoschizomeer (bv. Mva 1269 I) na 30 minuten incubatie bij 65 °C een kenmerkend polymorfisme van de restrictiefragmentlengte op. Met de primers Rs-1-F en Rs-3-R uit DNA van *R. solanacearum* geamplificeerde PCR-producten hebben geen restrictiesites.

5. Bereiding van de laadbuffer

5.1. Broomfenolblauw (10 %, voorraadoplossing)

Broomfenolblauw	5 g
Gedestilleerd water (bidest)	50 ml

5.2. Laadbuffer

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Broomfenolblauw (zie 5.1)	300 µl
Gedestilleerd water (bidest)	6,2 ml

6. 10X TAE-buffer (Tris-acetaat-EDTA), pH 8,0

Tris-buffer	48,40 g
Ijszijn	11,42 ml
EDTA (dinatriumzout)	3,72 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Verdun tot 1× voor gebruik.

De buffer is ook in de handel verkrijgbaar (bv. Invitrogen of gelijkwaardig).

Aanhangsel 7

Gevalideerde reagentia voor de FISH-test

1. Oligo-probes

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

Niet-specifieke eubacteriële probe EUB-338-FITC: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

2. Fixatief

[LET OP! HET FIXATIEF BEVAT HET GIFTIGE PARAFORMALDEHYDE. DRAAG HANDSCHOENEN EN ADEM DE DAMPEN NIET IN. WERK IN EEN ZUURKAST.]

- i) Verwarm 9 ml water van moleculair-biologische kwaliteit (bv. ultrazuiver water, UPW) tot ongeveer 60 °C en voeg 0,4 g paraformaldehyde toe. Het paraformaldehyde lost op na toevoeging van 5 druppels NaOH 1 N en roeren met een magneetroerder.
- ii) Breng de pH op 7,0 door toevoegen van 1 ml fosfaatbuffer (PB) 0,1 M (pH 7,0) en 5 druppels HCl 1 N. Controleer de pH met indicatorpapier en corrigeer zo nodig met HCl of NaOH. [LET OP! GEBRUIK GEEN PH-METER IN OPLOSSINGEN DIE PARAFORMALDEHYDE BEVATTEN.]
- iii) Filtreer de oplossing over een membraanfilter van 0,22 µm en bewaar stofvrij bij 4 °C tot gebruik.

3. 3X hybmix

NaCl 2,7 M
 Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
 EDTA (gefiltersteriliseerd en geautoclaveerd) 15 mM

Verdun tot 1X voor gebruik.

4. Hybridisatieoplossing

1X hybmix
 Natriumdodecylsulfaat (SDS) 0,01 %
 Formamide 30 %
 probe EUB 338 5 ng/µl
 probe OLI-1 of OLI-2 5 ng/µl

Bereid hoeveelheden hybridisatieoplossing zoals in tabel 1 aangegeven. Voor elk objectglaasje (dat twee verschillende monsters in duplo bevat) is 90 µl hybridisatieoplossing nodig. BELANGRIJK: FORMAMIDE IS ZEER GIFTIG. DRAAG HANDSCHOENEN EN NEEM VOORZORGEN!

Tabel 1 Hoeveelheden te bereiden hybridisatieoplossing

Aantal glaasjes	1	4	6	8	10
Steriel UPW	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3X hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamide	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Probe OLI-1 of OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Totaalvolume (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

NB: Alle oplossingen die lichtgevoelige oligo-probes bevatten, moeten bij – 20 °C in het donker bewaard worden en tijdens het gebruik tegen direct zonlicht en kunstlicht worden beschermd.

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

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Gedestilleerd water	1,00 l

Los de ingrediënten op, controleer de pH en steriliseer in de autoclaaf (15 minuten, 121 °C).

Aanhangsel 8

Aubergine- en tomatenteelt

Zaai zaad van tomatenplanten (*Lycopersicon esculentum*) of aubergineplanten (*Solanum melongena*) in gepasteuriseerde zaai-grond. Zaailingen met volledig ontwikkelde zaadlobben (10-14 dagen) worden overgepoot in gepasteuriseerde potgrond.

Teel de aubergine- of tomatenplanten voor de inoculatie in een kas met de volgende omgevingsomstandigheden:

daglengte:	14 uur of natuurlijke daglengte indien groter;
temperatuur:	overdag: 21-24 °C, 's nachts: 14-18 °C;
Vatbaar tomatenras:	„Moneymaker”;
Vatbaar aubergineras:	„Black Beauty”;
Leveranciers:	zie website http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main .

LITERATUURVERWIJZINGEN

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

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

BIJLAGE III

1. Voor elke vermoede aanwezigheid van het organisme waarvoor de screeningstests voor in de lijst opgenomen plantaardig materiaal en voor alle andere gevallen volgens de methoden in bijlage II een positieve uitslag geven en waarvoor de bevestiging of de weerlegging na de volledige uitvoering van die methoden nog wordt afgewacht, moeten:

- alle bemonsterde knollen en voorzover mogelijk alle bemonsterde planten,
- het resterende extract en de daarbij gemaakte preparaten voor de screeningstests, bijvoorbeeld de immunofluorescentiepreparaten,

en
- alle relevante documentatie

bewaard en adequaat geconserveerd worden tot het onderzoek volgens de genoemde methoden is afgerond. Met de bewaarde knollen kunnen zo nodig rassenproeven worden uitgevoerd.

2. Als de aanwezigheid van het organisme wordt bevestigd, moeten:

- het in punt 1 genoemde materiaal,
 - eventueel een monster van het met het knol- of plantenextract besmette tomaten- of auberginemateriaal,

en
 - de geïsoleerde cultuur van het organisme
- gedurende ten minste één maand na de kennisgeving krachtens artikel 5, lid 2, bewaard en adequaat geconserveerd worden.

BIJLAGE IV

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

- i) de productieplaatsen waar
- aardappelen worden of zijn geteeld die klonaal verwant zijn aan de aardappelen waarvan is geconstateerd dat ze met het organisme besmet zijn;
 - tomaten worden of zijn geteeld uit dezelfde bron als die van de 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 is vastgesteld dat ze besmet zijn met het organisme;
 - aardappelen of tomaten worden geteeld en die dicht bij productieplaatsen liggen die besmet zijn of rechtstreeks of via loonwerkbedrijven in contact kunnen zijn geweest met dezelfde landbouwmachines of productievoorzieningen;
 - voor irrigatie of beregening oppervlaktewater wordt gebruikt waarvan vermoed wordt of bevestigd is dat het besmet is met het organisme;
 - voor irrigatie of beregening oppervlaktewater wordt gebruikt dat ook wordt gebruikt op productieplaatsen waarvan vermoed wordt of bevestigd is dat ze 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 voor irrigatie, beregening of overstroming van velden of productieplaatsen waarvan bevestigd is dat ze met het organisme besmet zijn.
-

BIJLAGE V

1. Voor het bepalen van de omvang van de waarschijnlijke besmetting als bedoeld in artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), en punt c), onder iii), moet rekening worden gehouden met de volgende elementen:
 - in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat is geteeld op een krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde productieplaats;
 - productieplaatsen die in contact kunnen zijn geweest met in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet is verklaard of die op rechtstreeks of via loonwerkbedrijven in contact kunnen zijn geweest met dezelfde landbouwmachines of faciliteiten;
 - in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat op de in het vorige streepje bedoelde productieplaatsen is geteeld of daar aanwezig was in de periode waarin krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaard in de lijst opgenomen plantaardig materiaal aanwezig was op in het eerste streepje bedoelde productieplaatsen;
 - plaatsen waar van in de voorgaande streepjes bedoelde productieplaatsen afkomstig in de lijst opgenomen plantaardig materiaal wordt opgeslagen;
 - machines, voertuigen, vaartuigen, opslagplaatsen, of delen daarvan, en alle andere voorwerpen, verpakkingsmateriaal inbegrepen, die met krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaard in de lijst opgenomen plantaardig 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 deze waren gereinigd en ontsmet;
 - op grond van de in artikel 5, lid 1, punt a), onder i), bedoelde onderzoeken en tests, voor aardappelen, alle knollen of planten met een klonale verwantschap via zuster- of uitgangsmateriaal met, en voor tomaat, alle planten uit dezelfde bron als, in de lijst opgenomen plantaardig materiaal dat krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet is verklaard, en waarvoor besmetting via een klonaal verband waarschijnlijk lijkt, ook bij een negatieve testuitslag. Er kunnen rassenproeven worden uitgevoerd om het ras van de besmette en klonaal verwante knollen of planten na te gaan;
 - plaatsen waar in de lijst opgenomen plantaardig materiaal bedoeld in het voorgaande streepje wordt geteeld;
 - plaatsen waar in de lijst opgenomen plantaardig materiaal wordt geteeld en waar voor irrigatie of beregning water wordt gebruikt dat krachtens 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 besmet is.
2. Bij het bepalen van de mogelijke verspreiding als bedoeld in artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), en punt c), onder iii), wordt rekening gehouden met:
 - i) in de gevallen bedoeld in artikel 5, lid 1, punt a), onder iv):
 - 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 gebruik op de productieplaatsen van oppervlaktewater voor irrigatie of beregning van in de lijst opgenomen plantaardig materiaal, wanneer er gevaar is of is geweest van oppervlaktewaterafvoer vanaf, of overstroming van, krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde productieplaatsen;

- ii) in gevallen waarin het oppervlaktewater besmet is verklaard krachtens artikel 5, lid 1, punt c), onder ii):
- plaatsen waar in de lijst opgenomen plantaardig materiaal wordt geteeld die in de nabijheid liggen van, of kunnen worden overstroomd met, besmet verklaard oppervlaktewater;
 - aparte irrigatiereservoirs waarin besmet verklaard oppervlaktewater kan zijn terechtgekomen;
 - waterlichamen die in verbinding staan met besmet verklaard oppervlaktewater, met inachtneming van:
 - stroomrichting en -snelheid van het besmet verklaarde water,
 - de aanwezigheid in het wild van waardplanten van de nachtschadefamilie.
3. De in artikel 5, lid 2, eerste alinea, bedoelde kennisgeving vindt als volgt plaats:
- onmiddellijk nadat de aanwezigheid van het organisme door laboratoriumtests met de in bijlage II beschreven methoden is bevestigd, worden ten minste medegedeeld:
 - voor aardappelen:
 - a) de rasnaam van de partij,
 - b) het soort aardappelen (poot-, consumptie- enz.) en voor pootaardappelen de categorie;
 - voor tomaat: de rasnaam van de partij en, indien van toepassing, de categorie;
 - onverminderd de kennisgevingsplicht bij vermoede aanwezigheid uit hoofde van artikel 4, lid 3, stelt de lidstaat waar de aanwezigheid is bevestigd de lidstaten waaruit of waarnaar de besmetting van in de lijst opgenomen plantaardig materiaal zich kan verspreiden of kan hebben verspreid onmiddellijk in kennis van de informatie die nodig is om aan artikel 5, lid 3, te voldoen, zoals:
 - a) de rasnaam van de partij aardappelen of tomaat;
 - b) naam en adres van de verzender en de ontvanger;
 - c) de datum van aflevering van de partij aardappelen of tomaat;
 - d) de omvang van de afgeleverde partij aardappelen of tomaat;
 - e) een kopie van het plantenpaspoort of ten minste het nummer daarvan indien van toepassing, het registratienummer van de teler of handelaar indien van toepassing en een kopie van de afleveringsbon.

De Commissie wordt er onmiddellijk van in kennis gesteld wanneer deze informatie is verstrekt.

4. De in artikel 5, lid 2, tweede alinea, bedoelde aanvullende kennisgeving omvat:

nadat alle onderzoeken zijn afgerond, voor elk geval:

- a) de datum waarop de besmetting is bevestigd;
- b) een korte beschrijving van het onderzoek dat is verricht om de bron en de mogelijke verspreiding van de besmetting te achterhalen, met vermelding van de gerealiseerde bemonsteringsintensiteit;
- c) informatie over de geïdentificeerde of vermoede besmettingsbronnen;
- d) informatie over de reikwijdte van de besmetverklaring, waaronder het aantal besmette productieplaatsen en voor aardappelen het aantal partijen, onder vermelding van het ras en voor pootaardappelen de categorie;

- e) gegevens over de zoneafbakening, met het aantal productieplaatsen in de zone die niet besmet verklaard zijn;
 - f) gegevens over het waterlichaam, waaronder naam, ligging en omvang van de besmetverklaring en het irrigatieverbod;
 - g) voor elke besmet verklaarde zending of partij tomatenplanten: de bij artikel 13, lid 1, onder ii), van Richtlijn 2000/29/EG voorgeschreven certificaten en het paspoortnummer, overeenkomstig de in bijlage V, deel A, rubriek I, punt 2.2, bij Richtlijn 2000/29/EG opgenomen lijst;
 - h) alle andere door de Commissie verlangde informatie over de geconstateerde besmetting(en).
-

BIJLAGE VI

1. De in artikel 6, lid 1, bedoelde maatregelen omvatten:

- gebruik als diervoeder na een warmtebehandeling die het risico dat het organisme overleeft, uitsluit,
of
- storting op een officieel erkende, speciale stortplaats waar er geen aanwijsbaar risico is dat het organisme in het milieu terechtkomt door bv. lekkage naar landbouwgrond of contact met water dat voor irrigatie van landbouwgrond kan worden gebruikt,
of
- verbranding,
of
- rechtstreekse en onverwijld levering, voor industriële verwerking, aan verwerkende bedrijven die over officieel erkende, adequate afvalverwijderingsinstallaties beschikken waarvoor is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico op verspreiding van het organisme bestaat, en die over een systeem beschikken om ten minste de uitgaande voertuigen te reinigen en te ontsmetten,
of
- andere maatregelen, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich kan verspreiden; van deze maatregelen moet onder opgave van de redenen ervoor aan de Commissie en de andere lidstaten kennis worden gegeven.

Afvalstoffen die overblijven na of voortkomen uit de bovengenoemde behandelingen, worden door middel van officieel erkende methoden verwijderd overeenkomstig bijlage VII.

2. De in artikel 6, lid 2, bedoelde adequate wijze van gebruik of verwijdering, onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de betrokken lidstaten, waarbij moet worden gezorgd voor een adequate communicatie tussen de betrokken verantwoordelijke officiële instanties, om te garanderen dat dergelijk toezicht te allen tijde plaatsvindt, alsmede voor erkenning, door de verantwoordelijke officiële instantie van de lidstaat waar de aardappels verpakt of verwerkt moeten worden, van de in het eerste en het tweede streepje bedoelde afvalverwijderingsinstallaties, omvat:

i) voor aardappelknollen:

- gebruik als consumptieaardappelen, verpakt voor rechtstreekse aflevering en voor gebruik zonder verdere ompakking, op een locatie met adequate afvalverwijderingsinstallaties. Handling van pootaardappelen op deze locatie is uitsluitend toegestaan als dat gescheiden of na reiniging en ontsmetting gebeurt,
of
- gebruik als aardappelen bestemd voor industriële verwerking, en bestemd voor rechtstreekse en onverwijld aflevering aan een verwerkend bedrijf met adequate afvalverwijderingsinstallaties en een systeem voor reiniging en ontsmetting van ten minste de uitgaande voertuigen,
of
- enige andere vorm van gebruik of verwijdering, mits vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich verspreidt, onder voorbehoud van goedkeuring door de genoemde verantwoordelijke officiële instanties;

ii) voor andere plantendelen, met inbegrip van stengel- en bladafval:

- vernietiging,
of
- enige andere vorm van gebruik of verwijdering, mits vaststaat dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich verspreidt, onder voorbehoud van goedkeuring door de genoemde verantwoordelijke officiële instanties.

3. De adequate desinfectiemethoden voor de in artikel 6, lid 3, bedoelde voorwerpen zijn reiniging en, zo nodig, ont-smetting, uitgevoerd op zulke wijze dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich verspreidt en onder toezicht van de verantwoordelijke officiële instanties van de lidstaten.
4. Onder de in artikel 6, lid 4, bedoelde maatregelen die de lidstaten in de krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), en punt c), onder iii), afgebakende zones moeten uitvoeren, zijn begrepen:
 - 4.1. op krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde productieplaatsen:
 - a) op een krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaard veld of besmet verklaarde eenheid voor beschermde teelt:
 - i) gedurende ten minste de vier teeltjaren na de verklaarde besmetting:
 - maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten alsook andere waardplanten van het orga-nisme, zoals onkruid van de nachtschadefamilie, te elimineren,
 - en
 - een verbod op het poten, planten of zaaien van:
 - aardappelknollen, -planten of -zaad,
 - tomatenplanten en -zaad,
 - naar gelang van de biologische eigenschappen van het organisme,
 - andere waardplanten,
 - *Brassica* spp., waarvoor een aangetoond risico bestaat dat het organisme erin kan overleven,
 - gewassen waarvoor een aangetoond risico bestaat dat het organisme zich van daaruit kan verspreiden;
 - in de eerste teeltperiode voor aardappelen of tomaten die volgt op de in het vorige streepje bedoelde periode, en op voorwaarde dat het veld bij officiële inspecties in ten minste de twee aan de opplant voorafgaande teeltjaren vrij is bevonden van opslag van aardappel- en tomatenplanten en van andere waardplanten, met inbegrip van onkruid van de nachtschadefamilie:
 - voor aardappelen: uitsluitend de teelt van consumptieaardappelen wordt toegestaan,
 - voor aardappelen en tomaat: de geoogste knollen of tomatenplanten worden getest volgens de procedure in bijlage II,
 - in de teeltperiode voor aardappelen of tomaten die volgt op de in het vorige streepje bedoelde teelt-periode en volgens een passende wisselcyclus, die ten minste twee jaar dient te zijn als het gaat om de teelt van pootaardappelen: er wordt een officieel onderzoek als bedoeld in artikel 2, lid 1 uitgevoerd;
 - of
 - ii) gedurende de vijf teeltjaren dat volgt op het jaar van besmetverklaring:
 - maatregelen om opslag van aardappel- en tomatenplanten alsook andere in het wild voorkomende waardplanten van het organisme, met inbegrip van onkruid van de nachtschadefamilie, te elimineren,
 - en
 - bestemming van het veld gedurende de eerste drie jaar als braakland of, naar gelang van het vastge-stelde risico, voor de graanteelt, of als blijvend grasland dat frequent kort wordt gemaaid of intensief wordt begraasd, of voor de productie van graszaad, met daarna twee jaar voor de teelt van niet-waardgewassen waarvoor geen risico is aangetoond dat het organisme erin overleeft of zich van daar-uit verspreidt,

- in de eerste teeltperiode voor aardappelen of tomaten die volgt op de in het vorige streepje bedoelde periode, en mits het veld bij officiële inspecties in ten minste de twee aan de opplant voorafgaande teeltjaren vrij is bevonden van opslag van aardappel- en tomatenplanten en van andere waardplanten, met inbegrip van onkruid van de nachtschadefamilie:
 - voor aardappelen: de teelt van poot- en consumptieaardappelen wordt toegestaan,
 - de geoogste aardappelknollen of de tomatenplanten worden getest volgens de procedure in bijlage II;
- b) op alle andere velden van de besmette productieplaats, mits ten overstaan van de verantwoordelijke officiële instanties is aangetoond dat de risico's van opslag van aardappel- en tomatenplanten en van in het wild voorkomende waardplanten van het organisme, met inbegrip van onkruid van de nachtschadefamilie, geëlimineerd zijn:
 - in het teeltjaar dat volgt op het jaar van besmetverklaring:
 - verbod op het planten of zaaien van aardappelknollen, aardappelplanten, aardappelzaad of andere waardplanten van het organisme,
 - of
 - voor aardappelknollen mag alleen gecertificeerd pootgoed worden gepoot en dan nog uitsluitend voor de teelt van consumptieaardappelen;
 - voor tomaat wordt uitsluitend de opplant van tomatenplanten afkomstig van zaad dat aan de voorschriften van Richtlijn 2000/29/EG voldoet, voor de teelt van tomatenvruchten toegestaan;
 - in het tweede teeltjaar dat volgt op het jaar van besmetverklaring:
 - voor aardappelen wordt uitsluitend de opplant toegestaan van gecertificeerde of officieel op afwezigheid van bruinrot geteste en onder officieel toezicht op andere dan de in punt 4.1 bedoelde productieplaatsen geteelde pootaardappelen voor de teelt van poot- of consumptieaardappelen,
 - voor tomaat wordt uitsluitend de opplant toegestaan van tomatenplanten afkomstig van zaad dat aan de voorschriften van Richtlijn 2000/29/EG voldoet, of, bij vegetatieve vermeerdering, van tomatenplanten die van dergelijk zaad afkomstig zijn en onder officieel toezicht op andere dan de in punt 4.1 bedoelde productieplaatsen geteeld zijn, voor de teelt van planten of vruchten;
 - gedurende ten minste het derde teeltjaar dat volgt op het jaar van besmetverklaring:
 - voor aardappelen wordt uitsluitend de opplant toegestaan van gecertificeerde of onder officieel toezicht uit gecertificeerd pootgoed afkomstige pootaardappelen voor de teelt van poot- of consumptieaardappelen,
 - voor tomaat wordt uitsluitend de opplant toegestaan van tomatenplanten afkomstig van zaad dat aan de voorschriften van Richtlijn 2000/29/EG voldoet, of van tomatenplanten die onder officieel toezicht uit dergelijke planten zijn geteeld, voor de teelt van planten of tomatenvruchten;
 - in elk van de in de vorige streepjes bedoelde teeltjaren worden maatregelen genomen om opslag van aardappelplanten en van in het wild voorkomende waardplanten van het organisme, indien aanwezig, te elimineren, wordt op passende tijdstippen een officiële inspectie van het gewas uitgevoerd en worden op elk aardappelveld officiële tests op de geoogste aardappelen uitgevoerd volgens de procedure in bijlage II;
- c) onmiddellijk na de besmetverklaring krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), en na het eerste daaropvolgende teeltjaar:
 - alle machines en opslagfaciliteiten op de productieplaats die voor de aardappel- of tomatenteelt zijn gebruikt worden gereinigd en zo nodig ontsmet volgens de in punt 3 bedoelde adequate methoden;
 - irrigatie- en beregeningsprogramma's worden officieel geïnspecteerd en zo nodig verboden, om de verspreiding van het organisme te voorkomen;

- d) in een krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder ii), besmet verklaarde eenheid voor beschermde teelt waarin het teeltmedium volledig kan worden vervangen:
- het planten of zaaien van aardappelknollen, -planten of -zaad of andere waardplanten van het organisme, met inbegrip van tomatenplanten en -zaad, wordt verboden tenzij in de productie-eenheid onder officieel toezicht maatregelen zijn genomen om het organisme uit te roeien en alle waardmateriaal te verwijderen, waarbij ten minste het teeltmedium volledig is vervangen en de productie-eenheid en alle gereedschappen en machines zijn gereinigd en zo nodig ontsmet, en de verantwoordelijke officiële instanties hierna toestemming hebben gegeven om er aardappelen of tomaten te telen,
- en
- bij de aardappelteelt worden gecertificeerde pootaardappelen, of miniknollen of microplanten van geteste bronnen, gebruikt,
 - bij de tomatenteelt wordt uitsluitend zaad gebruikt dat aan de voorschriften van Richtlijn 2000/29/EG voldoet, of, in geval van vegetatieve vermeerdering, planten die onder officieel toezicht uit dergelijk zaad zijn geteeld;
 - irrigatie- en beregeningsprogramma's worden officieel geïnspecteerd en zo nodig verboden, om verspreiding van het organisme te voorkomen;

4.2. In de afgebakende zones moeten de lidstaten, onverminderd de in punt 4.1 genoemde maatregelen:

- a) bepalen dat machines en opslaginrichtingen op dergelijke bedrijven die bij de aardappel- of tomatenteelt zijn gebruikt, onmiddellijk na de besmetverklaring worden gereinigd en zo nodig ontsmet volgens de in punt 3 aangegeven adequate methoden;
- b) onmiddellijk, en gedurende ten minste drie teeltjaren na de verklaarde besmetting:
- ba) wanneer de afgebakende zone krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iv), is vastgesteld:
- ervoor zorgen dat hun verantwoordelijke officiële instanties toezicht houden op de bedrijfsterreinen of -gebouwen waar aardappelknollen of tomaten worden geteeld, opgeslagen of gehanteerd, en op bedrijven waar contractueel machines voor de aardappel- of tomatenteelt worden gebruikt,
 - bepalen dat in die zone uitsluitend gecertificeerd of onder officieel toezicht geteeld pootgoed voor de aardappelteelt mag worden gebruikt, en dat pootgoed dat geteeld is op productieplaatsen die krachtens artikel 5, lid 1, punt a), onder iii), „waarschijnlijk besmet” zijn verklaard, na de oogst onderzocht wordt,
 - bepalen dat op alle bedrijfsinrichtingen in de zone de voorraden geoogste pootaardappelen gescheiden worden gehouden van die van consumptieaardappelen, of tussen het werken met pootaardappelen en met consumptieaardappelen een systeem van reiniging en zo nodig ontsmetting wordt toegepast,
 - bepalen dat bij de tomatenteelt in die zone uitsluitend tomaten worden geplant die afkomstig zijn van zaad dat aan de voorschriften van Richtlijn 2000/29/EG voldoet, of, in geval van vegetatieve vermeerdering, van planten die onder officieel toezicht uit dergelijk zaad zijn geteeld;
 - een officieel onderzoek verrichten als omschreven in artikel 2, lid 1;
- bb) als oppervlaktewater krachtens artikel 5, lid 1, punt c), onder ii), besmet is verklaard of overeenkomstig bijlage V, punt 2, is opgenomen in de lijst van elementen waarmee rekening moet worden gehouden om de mogelijke verspreiding van het organisme te bepalen:
- op geschikte tijdstippen een jaarlijks onderzoek uitvoeren, waarbij monsters van het oppervlaktewater en van eventuele waardplanten van de nachtschadefamilie in de waterbronnen worden genomen en getest volgens de methoden in bijlage II voor het in de lijst opgenomen plantaardige materiaal en voor andere gevallen;

- officiële inspecties uitvoeren op irrigatie- en beregeningsprogramma's, met een verbod op het gebruik van besmet verklaard water voor irrigatie of beregening van in de lijst opgenomen plantaardig materiaal en, waar relevant, andere waardplanten, om te voorkomen dat het organisme zich verspreidt. Op basis van het genoemde jaarlijkse onderzoek kan dit verbod worden herzien en de besmetverklaring worden ingetrokken als het oppervlaktewater volgens de verantwoordelijke officiële instanties niet langer besmet is. Gebruik van water waarop een verbod rust, kan worden toegestaan, onder officieel toezicht, voor irrigatie en beregening van waardplanten, mits officieel goedgekeurde technieken worden gebruikt die het organisme elimineren en zijn verspreiding voorkomen,
 - wanneer vloeibaar afval besmet is, officiële inspecties uitvoeren op de afvoer van vast of vloeibaar afval van industriële verwerkings- of verpakkingsinrichtingen waar in de lijst opgenomen plantaardig materiaal wordt behandeld;
- c) indien relevant een programma opstellen om alle pootaardappelvoorraden binnen een passende termijn te vervangen.
-

BIJLAGE VII

De officieel erkende afvalverwijderingsmethoden, bedoeld in bijlage VI, punt 1, moeten aan de volgende eisen voldoen om ieder aanwijsbaar risico dat het organisme zich kan verspreiden, weg te nemen:

- i) afval van aardappelen en tomaten (waaronder uitschot van aardappelen en tomaten, schillen) en al het andere vaste afval dat met de aardappelen en tomaten in contact is geweest (waaronder grond, stenen en ander materiaal), moet:
- worden gestort op een officieel erkende, speciale stortplaats waar er geen aanwijsbaar risico is dat het organisme in het milieu terechtkomt door bv. lekkage naar landbouwgrond of contact met water dat voor irrigatie van landbouwgrond kan worden gebruikt. Het afval wordt rechtstreeks naar de stortplaats vervoerd, op zodanige wijze dat geen afval kan worden verloren,
 - of
 - worden verbrand,
 - of
 - op andere wijze worden verwijderd, op voorwaarde dat is vastgesteld dat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het organisme zich verspreidt; van de genomen maatregelen moet aan de Commissie en aan de andere lidstaten kennis worden gegeven.
- ii) vloeibaar afval: vloeibaar afval dat gesuspendeerde vaste stoffen bevat moet, voordat het wordt verwijderd, worden gefiltreerd of een proces ondergaan waarbij dergelijke stoffen worden neergeslagen en verwijderd. De verkregen vaste stoffen moeten worden verwijderd als aangegeven onder i).

Het vloeibare afval wordt vervolgens:

- gedurende ten minste 30 minuten verhit tot minimaal 60 °C voordat het wordt afgevoerd,
- of
- op een andere officieel goedgekeurde wijze onder officieel toezicht verwijderd zodat er geen aanwijsbaar risico bestaat dat het afval in contact komt 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 meegedeeld.

De in deze bijlage beschreven methoden gelden ook voor het afval dat ontstaat bij de hantering, verwijdering en verwerking van besmette partijen.”
