

Europeiska unionens officiella tidning

L 182

Svensk utgåva

Lagstiftning

fyrtionionde årgången

4 juli 2006

Innehållsförteckning

I Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk

- ★ **Kommissionens direktiv 2006/56/EG av den 12 juni 2006 om ändring av bilagorna till rådets direktiv 93/85/EEG om bekämpning av ljus ringröta på potatis** 1

I

(Rättsakter vilkas publicering är obligatorisk)

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2006/56/EG

av den 12 juni 2006

om ändring av bilagorna till rådets direktiv 93/85/EEG om bekämpning av ljus ringröta på potatis

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DETTA DIREKTIV

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 93/85/EEG av den 4 oktober 1993 ⁽¹⁾ om bekämpning av ljus ringröta på potatis, särskilt artikel 12, och

av följande skäl:

- (1) En av de viktigaste skadegörarna på potatis är *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, den sjukdomsalstrande organism som orsakar ljus ringröta på potatis (nedan kallad "skadegöraren").
- (2) Den här skadegöraren förekommer fortfarande i vissa delar av gemenskapen.
- (3) I direktiv 93/85/EEG fastställs detaljerade åtgärder som skall vidtas inom medlemsstaterna mot skadegöraren för att lokalisera den och kartlägga dess utbredning, förhindra dess förekomst och spridning, samt, om den konstateras, förhindra dess spridning och bekämpa den i syfte att utrota den.
- (4) Sedan dess har en betydande utveckling skett när det gäller förståelsen av skadegörarens biologi samt av förfarandena för att upptäcka och identifiera den. Erfarenheterna från bekämpning av skadegöraren i praktiken visar dessutom att det fordras en översyn av ett flertal tekniska bestämmelser knutna till bekämpningsåtgärderna.
- (5) Därför förefaller det nödvändigt att se över och uppdatera bestämmelserna i bilagorna till direktiv 93/85/EEG.

(6) När det gäller förfarandena för upptäckt och identifiering har dels nyutvecklade förfaranden, såsom FISH ("fluorescent *in-situ* hybridization") och PCR ("polymerase chain reaction"), dels förbättringar av olika tekniska komponenter i nuvarande förfaranden för upptäckt och identifiering tagits med.

(7) När det gäller de tekniska komponenterna i bekämpningsåtgärderna har följande förbättrade bestämmelser fastställts: det sätt som proverna förvaras på för att möjliggöra spårning av skadegöraren, de beståndsdelar som krävs för att fastställa omfattningen hos den troliga smittan, närmare uppgifter om varje anmälan om bekräftad närvaro av skadegöraren och om det relevanta smittade området, åtgärder att vidta på produktionsplatser som har förklarats smittade inom de avgränsade områdena.

(8) De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för växtskydd.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagorna till direktiv 93/85/EEG skall ersättas med motsvarande bilagor till det här direktivet.

Artikel 2

1. Medlemsstaterna skall senast den 31 mars 2007 anta och offentliggöra de lagar och andra författningar som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall genast överlämna texterna till dessa bestämmelser till kommissionen tillsammans med en jämförelsetabell för dessa bestämmelser och bestämmelserna i detta direktiv.

De skall tillämpa dessa bestämmelser från och med den 1 april 2007.

När en medlemsstat antar dessa bestämmelser skall de innehålla en hänvisning till detta direktiv eller åtföljas av en sådan hänvisning när de offentliggörs. Närmare föreskrifter om hur hänvisningen skall göras skall varje medlemsstat själv utfärda.

⁽¹⁾ EGT L 259, 18.10.1993, s. 2.

2. Medlemsstaterna skall omgående till kommissionen överlämna texten till de centrala bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv.

Artikel 3

Detta direktiv träder i kraft den tredje dagen efter det att det har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Artikel 4

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 12 juni 2006.

På kommissionens vägnar
Markos KYPRIANOU
Ledamot av kommissionen

BILAGA I

TESTPROGRAM FÖR ATT DIAGNOSTICERA, UPPTÄCKA OCH IDENTIFIERA DEN BAKTERIE SOM ORSAKAR LJUS RINGRÖTA, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* (Smith) Davis *et al.* ssp. *SEPEDONICUS* (Spieckermann *et Kotthoff*) Davis *et al.***TESTPROGRAMMETS OMFATTNING**

I programmet beskrivs de olika förfaranden som ingår i

- i) diagnos av ljus ringröta på potatisknölar och potatisplantor,
- ii) upptäckt av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prover av potatisknölar och potatisplantor,
- iii) identifiering av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* ssp. *sepedonicus*).

ALLMÄNNA PRINCIPER

Optimerade protokoll för de olika metoderna, validerade reagenser och närmare uppgifter om beredningen av test- och kontrollmaterial finns i tilläggen. En förteckning över de laboratorier som togs med i optimeringen och valideringen av protokoll finns i tillägg 1.

Eftersom protokollen omfattar upptäckt av en karantänsorganism och användning av *C. m.* subsp. *sepedonicus* som kontrollmaterial, är det nödvändigt att förfarandena tillämpas under lämpliga karantänförhållanden med lämpliga anordningar för avfallshantering och i enlighet med lämpliga licenser utfärdade av de officiella växtinspektionsmyndigheterna.

Testparametrarna skall utformas så att de säkerställer enhetliga och reproducerbara upptäckter av halter av *C. m.* subsp. *sepedonicus* på de fastställda tröskelvärdena i de valda metoderna.

En noggrann förberedning av de positiva kontrollerna är av största vikt.

Testning i enlighet med de föreskrivna tröskelvärdena fordrar även att utrustningen ställs in, underhålls och kalibreras på ett korrekt sätt, att reagenserna handhas och förvaras varsamt och att samtliga åtgärder för att förhindra nedsmittning mellan prover vidtas, t.ex. separering av positiva kontroller från prover. Standarder för kvalitetskontroll skall tillämpas för att undvika administrativa och andra fel, särskilt när det gäller märkning och dokumentering.

En misstänkt förekomst enligt artikel 4.2 i direktiv 93/85/EEG innebär ett positivt resultat vid diagnostiska tester eller screeningtester som utförs på ett prov i enlighet med vad som anges i flödesdiagrammen.

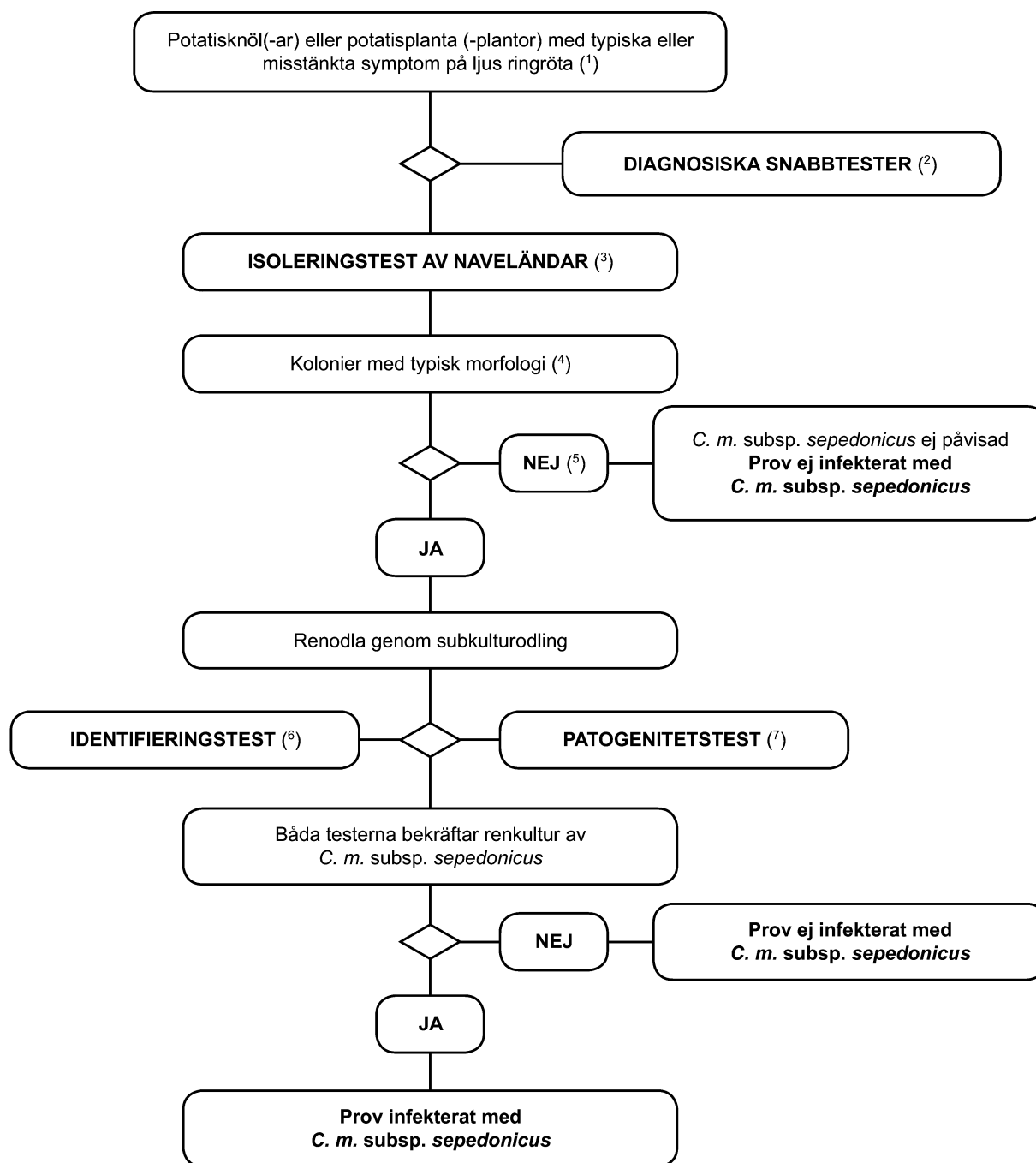
Om det första screeningtestet (IF eller PCR/FISH) är positivt, misstänks nedsmittning med *C. m.* subsp. *sepedonicus* och ett andra screeningtest skall göras. Om det andra screeningtestet är positivt bekräftas misstanken (misstänkt förekomst) och testerna i enlighet med programmet skall fortsätta. Om det andra screeningtestet är negativt betraktas provet som icke smittat med *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Ett positivt IF-test enligt artikel 4.2 definieras som en positiv IF-avläsning verifierad av ett andra screeningtest (PCR/FISH).

Bekräftad närvaro enligt artikel 5.1 i direktiv 93/85/EEG innebär isolering och identifiering av en renkultur av *C. m.* subsp. *sepedonicus* med bekräftad patogenitet.

1. FRAMSTÄLLNING VIA FLÖDESDIAGRAM**1.1 Program för diagnos på ljus ringröta på potatisknölar och potatisplantor med symptom på ljus ringröta**

Testförfarandet är avsedd för potatisknölar och potatisplantor som uppvisar typiska eller misstänkta symptom på ljus ringröta. Den omfattar ett snabbscreeningstest, isolering av patogenet från infekterad kärllingsvävnad på diagnostiskt substrat och vid positivt utslag identifiering av kulturen som *C. m.* subsp. *sepedonicus*.



(1) Symptomen beskrivs i avsnitt 2.

(2) Lämpliga förfaranden:
— IF-test (avsnitt 4),
— PCR-test (avsnitt 6),
— FISH-test (avsnitt 5).

(3) Även om patogenet lätt kan isoleras genom plattspridning av olika utspädningar från plantor med typiska symptom, kan odling i kultur från långt framskridna infektionsstadier misslyckas. Saprophytiska bakterier som växer på sjuk vävnad kan kväva eller hämma patogenet på isoleringssubstratet. Därför rekommenderas att både icke-selektiva och selektiva substrat används, företrädesvis MTNA (avsnitt 8) eller biotest (avsnitt 7).

(4) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.

(5) Om isoleringstestet är negativt men sjukdomssymptomen är typiska skall isoleringen upprepas.

(6) En renkultur av *C. m. subsp. sepedonicus* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt 9.

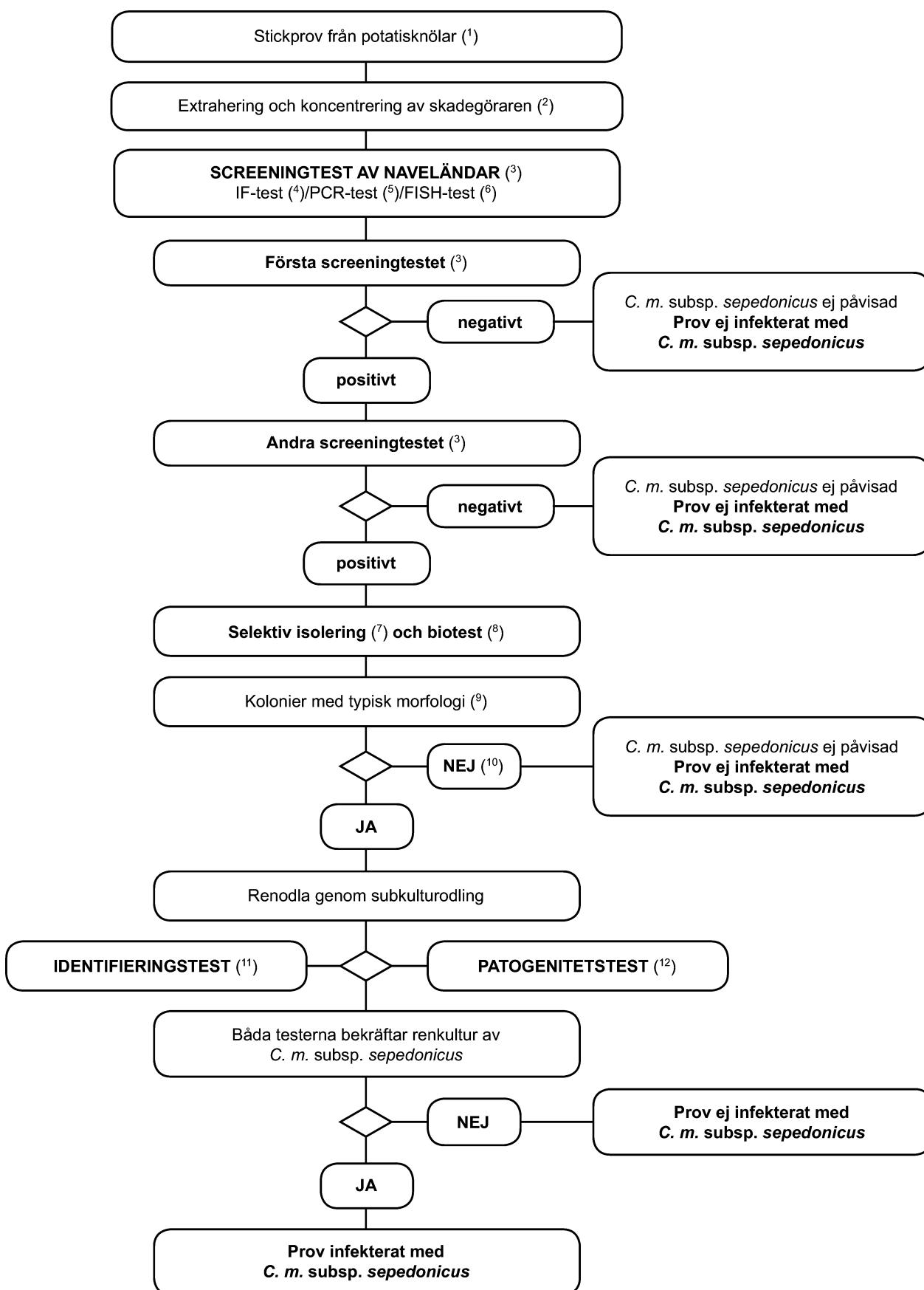
(7) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

1.2 **Program för upptäckt och identifiering av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prover av asymptomatiska potatisknölar**

Princip

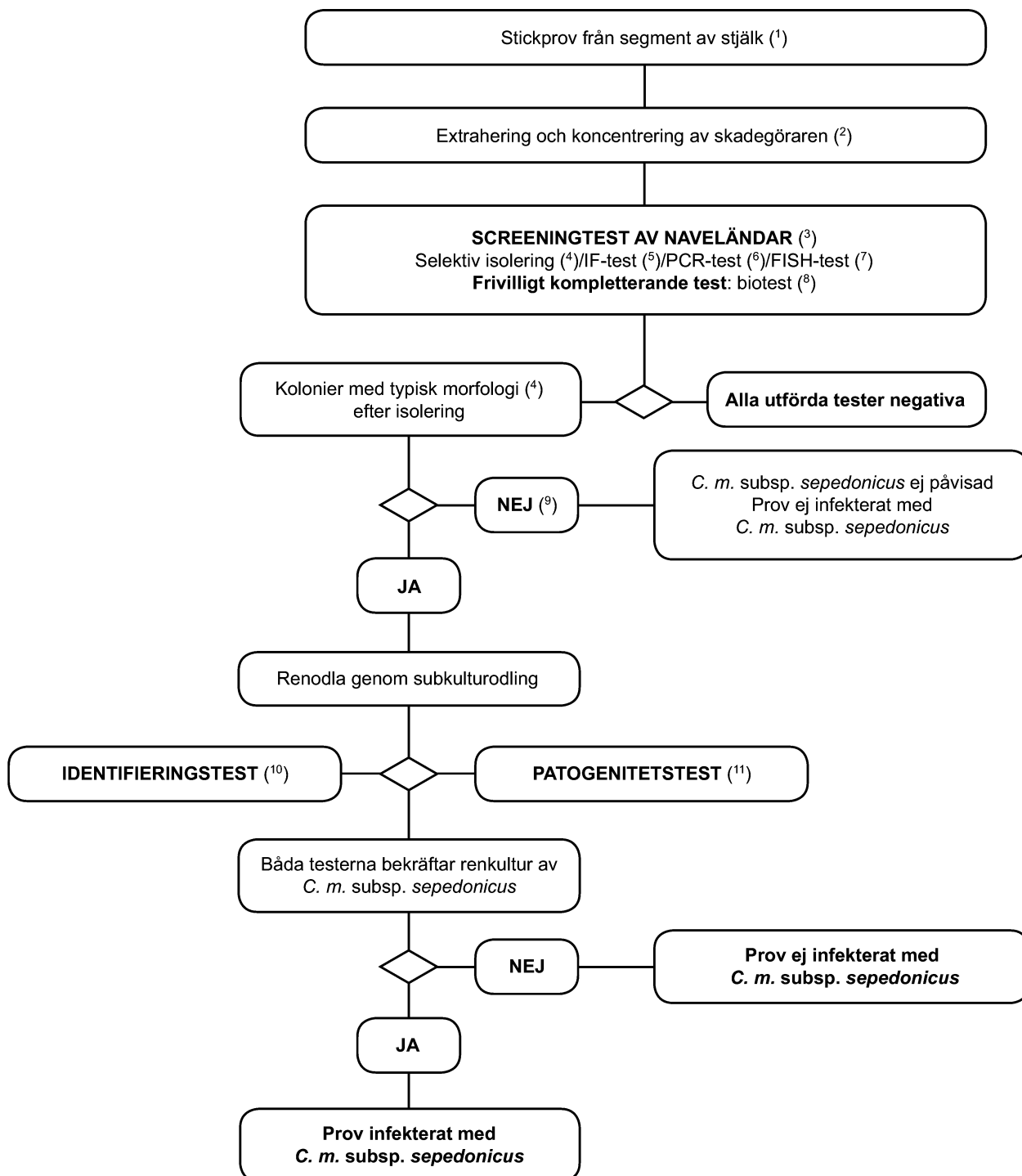
Syftet med testförfarandet är att upptäcka latent infektioner i potatisknölar. Minst två positiva screeningtest baserade på olika biologiska principer skall verifieras genom isolering av patogenet, vid isolering av typiska kolonier följt av identifiering av en renkultur som *C. m. subsp. sepedonicus*. Endast ett positivt screeningtest är inte tillräckligt för att provet skall kunna betraktas som misstänkt.

Screening- och isoleringstesterna skall möjliggöra en bestämningsgräns på 10^3 – 10^4 celler/ml återsuspenderade pellet, som är medtagna som positiva kontroller i varje testserie.



- (¹) Standardiserad provmängd är 200 knölar. Färre prover kan emellertid användas till detta förfarande om det inte finns 200 knölar.
- (²) Metoder för extrahering och koncentrerering av patogen beskrivs i avsnitt 3.1.
- (³) Om minst två tester baserade på olika biologiska principer är positiva, krävs isolering och bekräftelse. Utför minst ett screeningtest. Om testet är negativt, betraktas provet som negativt. Om testet är positivt krävs ytterligare ett eller flera screeningtester baserade på olika biologiska principer för att verifiera det första positiva resultatet. Om det andra testet eller övriga tester är negativa, betraktas provet som negativt. Det är inte nödvändigt att utföra ytterligare tester.
- (⁴) Immunofluorescenstest (IF-test).
Använd alltid en polyklonal antikropp vid IF-test. Ytterligare monoklonala antikroppar kan ge högre specificitet (se avsnitt 4).
- (⁵) PCR-test.
Använd korrekt validerade PCR-reagens och PCR-protokoll (se avsnitt 6).
- (⁶) Fish-test.
Använd validerade reagens och protokoll (se avsnitt 5).
- (⁷) Selektiv isolering.
Med substraten MTNA eller NCP-88, och med en utspädning på 1/100 av den återsuspenderade pelleten, är detta i många fall en godtagbar metod för direkt isolering av *C. m. subsp. sepedonicus*. Typiska kolonier kan erhållas 3–10 dagar efter odlingen. Patogenet kan sedan renas och identifieras. För fullt utnyttjande av testets potential krävs noggrann preparering av naveländarna för att undvika sekundära bakterier som följer med potatisknölen och som konkurrerar med *C. m. subsp. sepedonicus* på substratet och kan växa över patogenet. Om odlingstestet misslyckas skall isolering ske från de plantor som använts för biotestet (se avsnitt 8).
- (⁸) Biotestet används för isolering av *C. m. subsp. sepedonicus* från potatisextraktpellets genom selektiv anrikning i äggplantor (*Solanum melongena*). Testet kräver optimala inkubationsförhållanden enligt metodens specifikation. Bakterier som hämmar *C. m. subsp. sepedonicus* på MTNA- eller NCP-88-substratet kommer sannolikt inte att interferera i detta test (se avsnitt 7).
- (⁹) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.
- (¹⁰) Odling i kultur eller biotester kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om positiva resultat erhålls vid screeningtester men isoleringstesterna är negativa, upprepa isoleringstesterna från samma pellet eller genom att ta ytterligare kärningvävnad nära naveländan från genomsurna knölar från samma prov. Gör vid behov tester på ytterligare prover.
- (¹¹) En förmodad renkultur av *C. m. subsp. sepedonicus* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt 9.
- (¹²) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

1.3 Program för upptäckt och identifiering av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prover av asymptomatiska potatisplantor



- (¹) Rekommenderade provstorlekar, se avsnitt 3.2.
- (²) Metoder för extrahering och koncentrerering av patogen beskrivs i avsnitt 3.2.
- (³) Om minst två tester baserade på olika biologiska principer är positiva, krävs isolering och bekräftelse. Utför minst ett screeningtest. Om testet är negativt betraktas provet som negativt. Om testet är positivt krävs ytterligare ett eller flera tester baserade på olika biologiska principer för att styrka det första positiva resultatet. Om det andra testet eller övriga tester är negativa, betraktas provet som negativt. Det är inte nödvändigt att utföra ytterligare tester.
- (⁴) Selektivt isoleringstest och typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.
- (⁵) IF test beskrivs i avsnitt 4.
- (⁶) PCR test beskrivs i avsnitt 6.
- (⁷) FISH test beskrivs i avsnitt 5.
- (⁸) Biotest beskrivs i avsnitt 7.
- (⁹) Odling i kultur eller biotester kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om ett positivt resultat erhålls vid screeningtester men isoleringstesterna är negativa, upprepa isoleringstesterna och testa, vid behov, ytterligare prover.
- (¹⁰) En renkultur av förmodad *C. m. subsp. sepedonicus* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt 9.
- (¹¹) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

2. OKULÄR UNDERSÖKNING AVSEENDE SYMPTOM PÅ LJUS RINGRÖTA

2.1 Potatisplantor

På grund av de klimatförhållanden som råder i Europa påträffas symptom sällan på ute på fältet och ofta endast i slutet av säsongen. Dessutom är symptomen ofta dolda eller förväxlas med andra sjukdomar, åldrande eller mekaniska skador. Därför kan symptom lätt förbigås vid fältinspektioner. Vissningssymptomen skiljer sig avsevärt från symptomen på mörk ringröta. Vissningen är vanligtvis långsam och begränsad till bladkanterna. Unga infekterade blad fortsätter ofta att utvecklas, om än i mindre utsträckning i infekterade områden. Detta ger upphov till blad med oregelbundna former. Blad vars kärlringvävnad blockerats längre ned på stjälken utvecklar ofta bleka områden på bladytan i olika nyanser av gul och orange. Småblad och blad, och även stjälkar, kan till slut dö. Ofta krymper blad och knölar emellertid endast i storlek. Ibland försvagas plantornas tillväxt. Färgbilder av en rad symptom finns på kommissionens webbplats (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

2.2 Potatisknölar

De första symptomen är lätt glasaktighet eller genomskinlighet hos vävnaden, särskilt nära naveländan, utan att området runt kärlsystemet har mjukats upp. Kärlringen vid naveländan kan vara en aning mörkare än normalt. Det första klart identifierbara symptomet är att kärlringen har en gulaktig färg, och då knölen pressas försiktigt tränger strängar av ostliknande material fram ur kärlringen. Denna utsöndring innehåller miljontals bakterier. Kärlringvävnaden kan bli brunaktig, och symptomen hos knölar är på detta stadium snarlika dem på mörk ringröta orsakad av *Ralstonia solanacearum*. Först kan dessa symptom begränsas till en del av ringen, inte nödvändigtvis nära naveländan, och de kan gradvis breda ut sig till hela ringen. Då infektionen fortsätter förstörs kärlringen, och yttre cortex kan skiljas från inre cortex. I ett framskridet stadium av infektionen uppträder sprickor på ytan av knölen, som ofta är rödbrun vid kanterna. I Europa har nyligen ett flertal fall inträffat där inre cortex ruttnar på samma gång som kärlringen, vilket leder till ett sekundärt angrepp med inre urgröning och nekros. Sekundära svamp- eller bakterieangrepp kan dölja symptomen, och det kan vara svårt, till och med omöjligt, att skilja symptom på framskriden ljus ringröta från andra former av röta hos knölar. Atypiska symptom kan förekomma. Färgbilder på en rad symptom finns på kommissionens webbplats (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

3. PREPARERING AV PROVER

3.1 Potatisknölar

Anmärkning:

- Den standardiserade provmängden är 200 knölar per test. Vid intensivare provtagning krävs fler tester på prover av denna storlek. Ett större antal knölar i provet medför inhihering eller svårighet att tolka resultaten. Förfarandet kan emellertid användas för prover med färre än 200 knölar, om det endast finns färre knölar tillgängliga.
- Valideringen av samtliga nedan behandlade metoder för upptäckt har skett på grundval av test av stickprover på 200 knölar.
- Det nedan beskrivna potatisextraktet kan även användas för upptäckt av den bakterie som orsakar mörk ringröta hos potatis, *Ralstonia solanacearum*.

Frivillig förbehandling före provpreparering:

Tvätta knölar. Använd lämpliga desinfektionsmedel (vid PCR-test klorföreningar för att avlägsna eventuellt patogent DNA) och tvättmedel mellan varje stickprov. Lufttorka knölar. Detta rengöringsförfarande är användbart (men det inte är obligatoriskt) i synnerhet vid jordiga prover och om ett PCR-test eller ett direkt isoleringstest skall göras.

- 3.1.1 Avlägsna med en ren, desinficerad skalpell eller grönsakskniv epidermis från varje knöls navelända så att kärlvävnaden blir synlig. Skär försiktigt ur en liten kärna av kärlringvävnad i naveländan och minimera mängden icke-kärlringvävnad (se kommissionens webbplats på adress <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Anmärkning:

Lägg undan alla knölar med misstänkta symptom på brunröta och testa dem separat.

Om misstänkta symptom på ljus ringröta iaktas vid avlägsnandet av naveländan bör en okulär inspektion av denna knöl ske efter det att knölen skurits av nära naveländan. Alla skurna knölar med misstänkta symptom bör förvaras i två dagar i rumstemperatur och lagras under karantänförhållanden (4–10 °C) tills alla tester slutförts. Alla knölar i provet, inklusive dem med misstänkta symptom, bör förvaras i enlighet med bilaga II.

3.1.2 Samla naveländarna i oanvända avfallsbehållare som kan tillslutas och/eller förseglas (om behållare återanvänds bör de rengöras noggrant och desinficeras med klorföreningar). Naveländarna bör helst behandlas omedelbart. Om detta inte är möjligt bör de förvaras i behållaren, utan tillsats av buffert, nedkylda under högst 72 timmar eller i rumstemperatur under högst 24 timmar. Torkning och förkorkning av ändarna samt framväxt av saprophyter under förvaringen kan hindra att den bakterie som orsakar ljus ringröta upptäcks.

3.1.3 Behandla naveländarna enligt något av följande förfaranden: antingen

a) täck naveländarna genom att tillsätta en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml) extraktionsbuffert (tillägg 3) och skaka på en rotationsskak (50–100 r/min) under 4 timmar vid en temperatur lägre än 24 °C eller under 16–24 timmar nedkylt,

eller

b) homogenisera naveländarna i en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml) extraktionsbuffert (tillägg 3), antingen i en mixer (t.ex. Waring mixer eller Ultra Thurrax) eller genom att krossa dem i en förseglad engångspåse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse eller stark polyten från Bioreba, 150 × 250 mm, steriliserad genom strålning) med en gummihammare eller lämplig malapparat (t.ex. Homex).

Anmärkning:

Risken för korskontaminering av proverna är hög när de homogeniseras med en mixer. Vidta försiktighetsåtgärder så att det inte alstras aerosoler eller uppkommer spill under extraheringen. Se till att nyligen steriliserade mixerblad och behållare används för varje prov. Om PCR-test skall användas, undvik överföring av DNA till behållare eller malapparat. Krossning i engångspåsar och användning av engångsrör rekommenderas när PCR-test används.

3.1.4 Dekantera supernatanten. Om den är mycket grumlig, separera genom långsam centrifugering (högst 180 g under 10 minuter vid en temperatur på 4–10 °C) eller genom vakuumsfiltrering (40–100 µm), varvid filtret tvättas med ytterligare (ca 10 ml) extraktionsbuffert (tillägg 3).

3.1.5 Koncentrera bakteriedelen genom centrifugering vid 7 000 g under 15 minuter (eller 10 000 g under 10 minuter) vid en temperatur av 4–10 °C och håll bort supernatanten utan att störa pelleten.

3.1.6 Återsuspendera pelleten i 1,5 ml pelletbuffert (tillägg 3). Använd 500 µl för att testa för *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl för *Ralstonia solanacearum* och 500 µl i referenssyfte. Tillsätt steril glycerol till en slutkoncentrationen av 10–25 volymprocent till 500 µl av referensdelprovet och till det återstående testdelprovet. Skaka och förvara vid –16 till –24 °C (veckor) eller vid –68 till –86 °C (månader). Förvara testdelproven vid 4–10 °C under testningen.

Upprepade nedfrysningar och upptiningar är inte tillrädliga.

Om transport av extraktet krävs, se till att leveransen sker i en kall behållare inom 24–48 timmar.

3.1.7 Det är absolut nödvändigt att alla *C. m. subsp. sepedonicus*-positiva kontroller och prover hanteras separat för att undvika nedsmittning. Detta gäller även för IF-glas och samtliga test.

3.2 Potatisplantor

Anmärkning:

För upptäckt av latent populationer av *C. m. subsp. sepedonicus* rekommenderas testning av blandprover. Förfarandet kan även lätt användas för blandprover bestående av upp till 200 stjälkdelar. (Om undersökningar görs bör dessa grundas på ett statistiskt representativt prov av den plantpopulation som undersöks.)

3.2.1 Med en ren, desinficerad kniv eller sekator avlägsnas ett 1–2 cm långt segment av basen på varje stjälk strax ovanför markytan.

Desinficera stjälksegmentet hastigt i 70-procentig etanol och torka omedelbart med mjukpapper.

Samla stjälksegmenten i en tillsluten steril behållare enligt följande provtagningsförfaranden:

- 3.2.2 Behandla stjälksegmenten enligt något av följande förfaranden: antingen
- a) täck segmenten genom att tillsätta en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml) extraktionsbuffert (appendix 3) och skaka på en rotationskak (50–100 r/min) under 4 timmar vid en temperatur under 24 °C eller under 16–24 timmar nedkylt,

eller
 - b) behandla omedelbart segmenten genom att krossa dem i en kraftig förseglad engångspåse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse eller Bioreba) i en tillräcklig mängd extraktionsbuffert (tillägg 3) med en gummihammare eller lämplig malapparat (t.ex. Homex). Om detta inte är möjligt, förvara stjälksegmenten under högst 72 timmar nedkylda eller under högst 24 timmar i rumstemperatur.
- 3.2.3 Dekantera supernatanten efter det att blandningen fått stå och sjunka under 15 minuter.
- 3.2.4 Ytterligare klarnande av extraheringen eller koncentrationen av bakteriedelen krävs vanligtvis inte men kan åstadkommas genom filtrering och/eller centrifugering enligt avsnitten 3.1.4–3.1.6.
- 3.2.5 Dela det utspädda eller koncentrerade provextraktet i två lika stora delar. Bibehåll ena hälften vid en temperatur av 4–10 °C under testet och lagra den andra hälften med 10–25-procentig (v/v) steril glycerol vid en temperatur av – 16 till – 24 °C (veckor) eller – 68 till – 86 °C (månader) för det fall att ytterligare tester krävs.

4. IF-TEST

Princip

Det rekommenderas att IF-test används som huvudsakligt screeningtest på grund av dess dokumenterade effektivitet när det gäller att uppnå de föreskrivna bestämningsgränserna.

Om IF-testet används som huvudsakligt screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest med PCR- eller FISH-tester göras. Om IF-testet används som ett andra screeningtest och resultatet är positivt, krävs ytterligare testning enligt flödesschemat för att analysen skall bli fullständig.

Anmärkning:

Använd alltid en polyklonal antikropp om IF-test används som huvudsakligt screeningtest. Om ett IF-test med en polyklonal antikropp är positivt, kan ytterligare screening av provet med en monoklonal antikropp ge högre specificitet men vara mindre känsligt.

Använd antikroppar till en referensstam av *C. m. subsp. sepedonicus*. Det rekommenderas att titer bestäms för varje nytt parti antikroppar. Titern definieras som den högsta utspädning vid vilken en optimal reaktion sker när en suspension av 10^5 – 10^6 celler per ml av den homologa stammen av *C. m. subsp. sepedonicus* testas och när ett lämpligt fluorescein isothiocyanat konjugat (FITC) i överensstämmelse med tillverkarens rekommendationer används. De monoklonala eller polyklonala antikropparna bör ha en IF-titer av minst 1:2000. Vid testningen bör antikropparna användas vid en arbetsutspädning (arbetsutspädningar) nära eller vid titern. Använd validerade antikroppar (se kommissionens webbplats på adress <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Testet bör göras på nypreparerade provextrakt. Vid behov kan det göras på extrakt som lagrats i glycerol vid en temperatur på – 68 till – 86 °C. Glycerolen kan avlägsnas från provet genom tillsats av 1 ml pelletbuffert (tillägg 4), omcentrifugering under 15 minuter vid 7 000 g och återsuspension i en lika stor volym av pelletbuffert. Detta krävs vanligtvis inte, särskilt inte om glasproverna har fixerats på glasen med flambering (se 2.2).

Bered separata positiva kontrollglas av den homologa stammen eller någon annan referensstam av *C. m. subsp. sepedonicus*, som suspenderats i potatisextrakt, såsom anges i tillägg 2, alternativt i en buffert.

Naturligt infekterad vävnad (som har bevarats genom frystorkning eller nedfrysning vid en temperatur av – 16 till – 24 °C) bör om möjligt användas som en liknande kontroll på samma glas.

Som negativ kontroll använd delprover av provextrakt som tidigare givit negativt svar när de testats.

Använd multispot-objektglas med helst 10 fönster av minst 6 mm diameter.

Testa kontrollmaterialen på exakt samma sätt som provet (proven).

4.1 Preparera testobjektglasen enligt något av följande förfaranden:

i) För pelletar med relativt litet stärkelsesediment:

Pipettera på det första glaset en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av en 1/100-utspädning av den återsuspenderade potatispelleten. Pipettera en motsvarande volym av koncentrerad pellet (1/1) på de återstående fönstren på raden. Den andra raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 1.

ii) För andra pelletar:

Preparera decimala utspädningar (1/10 och 1/100) av den återsuspenderade pelleten i pelletbuffert. Pipettera en uppmätt standardvolym (15 µl är lämpligt för 6 mm fönsterdiameter – öka volymen för större fönster) av den återsuspenderade pelleten och varje utspädning på en fönsterrad. Den andra raden kan användas som duplikat eller för ett andra prov enligt figur 2.

4.2 Torka dropparna i omgivande temperatur eller genom uppvärmning vid en temperatur av 40–45 °C. Fixera bakteriecellerna på glaset antingen genom upphettning (15 minuter vid 60 °C), flambering med 95-procentig etanol eller enligt särskilda instruktioner från leverantören av antikropparna.

Vid behov får fixerade glas lagras frysta i en torkad låda under så kort tid som möjligt (maximalt 3 månader) innan vidare testning sker.

4.3 IF-förfarande

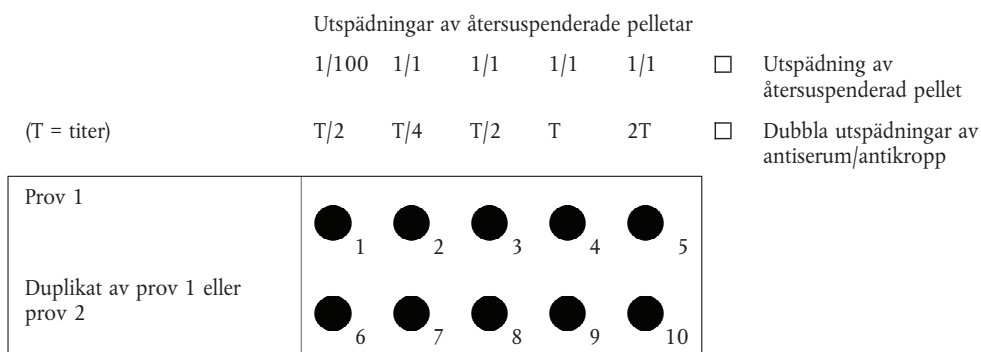
i) Enligt testglaspreparering i 4.1 i:

Bered en serie dubbla utspädningar av antikroppen i IF-buffert. Den första brunnen bör ha 1/2 av titern (T/2), de övriga 1/4 av titern (T/4), 1/2 av titern (T/2), titern (T) och två gånger titern (2T).

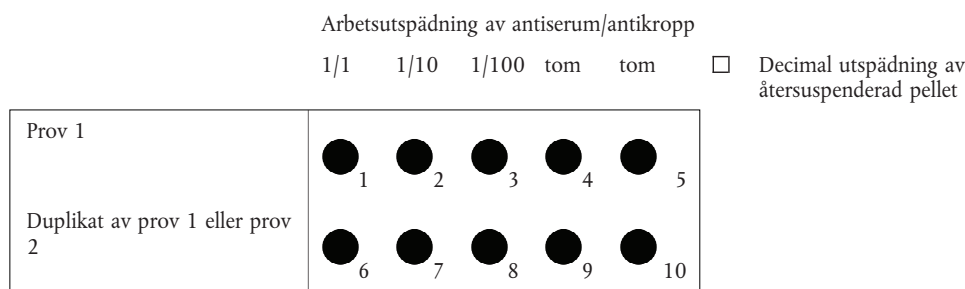
ii) Enligt testglaspreparering i 4.1 ii:

Preparera arbetsutspädningen av antikropp i IF-buffert. Arbetsutspädningen påverkar specificiteten.

Figur 1. Preparering av testglaset enligt 4.1 i och 4.3 i.



Figur 2. Preparering av testglaset enligt 4.1 ii och 4.3 ii.



- 4.3.1 Ordna glaset på fuktigt mjukpapper. Täck varje testfönster fullständigt med antikroppsutspädning(ar). Den volym antikroppar som tillsätts varje fönster skall vara minst lika stor som volymen tillsatt extrakt.

Följande förfarande bör följas om det saknas särskilda instruktioner från leverantören av antikropparna:

- 4.3.2 Inkubera objektglaset på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).
- 4.3.3 Skaka av dropparna från glaset och skölj glaset noga med IF-buffert. Tvätta genom att under 5 minuter sänka ned i IF-buffert – Tween (tillägg 3) och därefter under 5 minuter i IF-buffert. Undvik uppkomst av aerosoler eller överföring av droppar som kan orsaka korskontaminering. Avlägsna noga överskottsfukt genom att försiktigt torka med läskpapper.
- 4.3.4 Ordna glaset på fuktigt mjukpapper. Täck testfönstren med den utspädning av FITC-konjugat som används för att bestämma titern. Den volym konjugat som tillsätts fönstren skall vara lika med volymen tillsatt antikropp.
- 4.3.5 Inkubera glaset på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).
- 4.3.6 Skaka av konjugatdropparna från glaset. Skölj och tvätta som ovan (4.3.3).

Avlägsna noga överskottsfukt.

- 4.3.7 Pipettera 5–10 µl 0,1 M fosfatbuffrad glycerol (tillägg 3) eller en inbäddningslösning som motverkar blekning som finns tillgänglig i handeln på varje fönster och lägg på ett täckglas.
- 4.4 Avläsning av IF-testet:

- 4.4.1 Undersök testglaset i ett epifluorescensmikroskop med filter lämpliga för FITC under olje- eller vattenimmersion vid 500–1 000 gångers förstoring. Scanna fönstren utefter två diametrar i rät vinkel och runt perimetern. Om proverna inte uppvisar några eller ett litet antal celler, observera minst 40 mikroskopfält.

Kontrollera glaset med positiv kontroll först. Cellerna skall vara klart fluorescerande och helt färgade vid den fastställda antikroppstiter eller arbetsutspädningen. IF-testet (avsnitt 4) skall återupprepas om färgningen är avvikande.

- 4.4.2 Sök efter ljusa fluorescerande celler med morfologi som är karakteristisk för *C. m. subsp. Sepedonicus* i testfönstren på testglaset (se kommissionens webbplats med adress <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescensintensiteten skall minst motsvara den positiva kontrollstammens vid samma antikroppsutspädning. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens skall ej beaktas.

Om smitta misstänks skall testet upprepas. Detta kan vara fallet om alla glas i ett parti uppvisar positiva celler på grund av smitta av en buffert eller om positiva celler påträffas (utanför glasets fönster) på objektglasöverdraget.

- 4.4.3 Immunofluorescens-testets specificitet ger upphov till ett flertal problem. Bestånd av fluorescerande celler med atypisk morfologi och korsreagerande saprofytiska bakterier som har en liknande storlek och morfologi som *C. m. sepedonicus* kan förekomma hos potatisar i naveländarna och i pelletar av stjälksegment.

4.4.4 Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi vid titern eller vid arbetsutspädningen av antikropparna skall beaktas, såsom i 4.3.

4.4.5 Tolkning av IF-testet:

- i) För varje prov med ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi, bestäm medeltalet typiska celler per mikroskopfält och beräkna antal typiska celler per ml återsuspenderad pellet (tillägg 4).

IF-testet är positivt om proven innehåller minst 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet. Provet betraktas som potentiellt smittat och ytterligare tester krävs.

- ii) IF-testet är negativt om proven innehåller färre än 5×10^3 celler per ml återsuspenderad pellet och provet betraktas som negativt. Inga ytterligare tester krävs.

5. FISH-TEST

Princip

Om FISH-testet används som första screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest i form av ett IF-test göras. Om FISH-testet används som andra screeningtest och resultatet är positivt, krävs ytterligare testning enligt flödesschemat för att diagnosen skall bli fullständig.

Anmärkning:

Använd validerade *C. m. subsp. sepedonicus*-specifika oligo-prober (tillägg 7). Preliminär testning med denna metod bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av minst 10^3 – 10^4 celler av *C. m. subsp. sepedonicus* per ml som tillsätts till provextrakt som tidigare testats och gett negativt svar.

Följande förfarande bör helst tillämpas på nypreparerade provextrakt men kan även tillämpas på provextrakt som lagrats i glycerol vid en temperatur av -16 till -24 °C eller -68 till -86 °C.

Som negativa kontroller använd delprover av provextrakt som tidigare givit negativt svar när de testats avseende *C. m. subsp. sepedonicus*.

Som positiva kontroller preparera suspensioner innehållande 10^5 – 10^6 celler per ml av *C. m. subsp. sepedonicus* (dvs. stam NCPPB 4053 eller PD 406) i 0,01 M fosfatbuffert från en 3–5 dagar gammal kultur (preparering se tillägg 2). Preparera separata positiva kontrollglas av den homologa stammen eller någon annan referensstam av *C. m. subsp. sepedonicus*, som suspenderats i potatisextrakt, såsom anges i tillägg 2.

Användningen av FITC-märkt eubakteriell prob fungerar som en kontroll av hybridiseringsprocessen, eftersom den färgar alla eubakterier som finns i provet.

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

5.1 Fixering av potatisextrakt

Följande protokoll utgår ifrån Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1 Preparera fixeringslösningen (se tillägg 7).

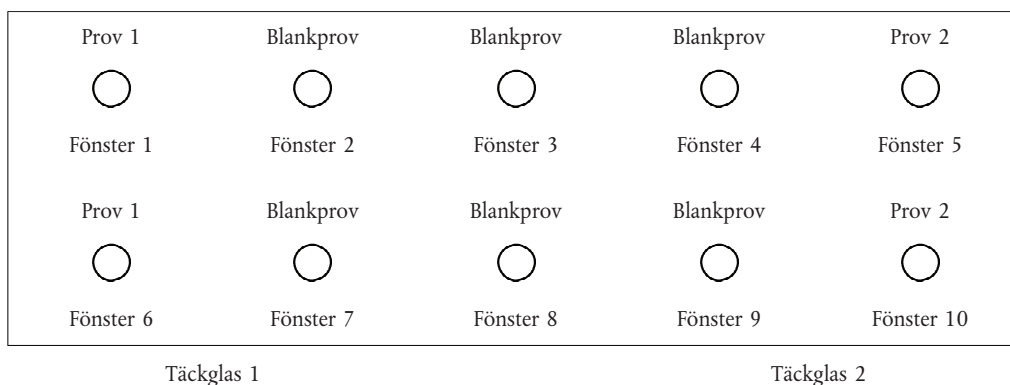
5.1.2 Pipettera 100 µl av varje provextrakt i ett Eppendorf-rör och centrifugera under 8 minuter på 7 000 g.

5.1.3 Avlägsna supernatanten och lös pelleten i 500 µl fixeringsvätska som preparerats < 24 timmar tidigare. Skaka och inkubera över natten i 4 °C.

En alternativ fixeringsvätska är 96-procentig etanol. Vid användning av denna, lös pelleten från steg 5.1.2 i 50 µl 0,01 M fosfatbuffert och 50 µl 96-procentig etanol. Skaka och inkubera vid 4 °C under 30–60 minuter.

- 5.1.4 Centrifugera under 8 minuter på 7 000 g, avlägsna supernatanten och återsuspendera pelleten i 75 µl 0,01 M fosfatbuffert (se tillägg 3).
- 5.1.5 Droppa 16 µl av de fixerade suspensionerna på ett rent multitest-objektglas, såsom anges i fig. 3. Förse varje glas med två olika prover som är utspädda, och använd 10 µl för att göra en 1:100 utspädning (i 0,01 M fosfatbuffert). Den återstående provlösningen (49 µl) kan lagras vid -20 °C efter tillsats av 1 volym 96-procentig etanol. Om FISH-testet skall upprepas, avlägsna etanolen genom centrifugering, och tillsätt en lika stor volym 0,01 M fosfatbuffert (omskakas).

Figur 3. FISH-glasets layout



- 5.1.6 Lufttorka glasen (eller torka på objektglastork vid 37 °C) och fixera dem genom flambering.

Förfarandet kan på detta stadium avbrytas, och hybridiseringen kan fortsätta följande dag. Glasen bör förvaras dammfritt och torrt i rumstemperatur.

5.2 Förhybridisering och hybridisering

- 5.2.1 Preparera en lysozymlösning innehållande 10 mg lysozym (Sigma L-6876) i 10 ml buffert (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0). Denna lösning kan lagras men bör nedfrysas och upptinas endast en gång. Täck varje prov väl med ungefär 50 µl lysozymlösning och inkubera under 10 minuter vid rumstemperatur. Doppa därefter glasen i demineraliserat vatten en enda gång och torka med filterpapper.

Alternativt kan man i stället för lysozym tillsätta 50 µl av 40–400 µg ml⁻¹ proteas K i en buffert (20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) till varje brunn och inkubera vid 37 °C under 30 minuter.

- 5.2.2 Torka cellerna i en serie av etanol om 50 %, 80 % och 96 % under 1 minut vardera. Lufttorka glasen i en hållare för objektglas.
- 5.2.3 Preparera en fukt-kammare för inkubation genom att täcka botten av en lufttät behållare med mjuk- eller filterpapper doppat i 1x hybmix (tillägg 7). Preinkubera behållaren i hybridiseringsugn vid 55 °C under minst 10 minuter.
- 5.2.4 Preparera hybridiseringslösningen (tillägg 7) med 45 µl per glas, och preinkubera under 5 minuter vid 55 °C.
- 5.2.5 Placera glasen på en värmeplatta vid 45 °C och tillsätt 10 µl hybridiseringslösning till var och en av de 4 brunnarna på glaset (glasen).
- 5.2.6 Anbringa 2 täckglas (24 × 24 mm) på varje glas utan att låta någon luft komma emellan. Placera glasen i den redan uppvärmda fukt-kammaren och hybridisera över natten i ugn vid 55 °C i mörker.
- 5.2.7 Preparera 3 bägare innehållande 1 l ultrarent vatten, 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix och 666 ml ultrarent vatten) och 1 l av 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix och 833 ml ultrarent vatten). Preinkubera var och en i vattenbad vid 55 °C.
- 5.2.8 Avlägsna täckglasen från glasen och placera glasen i en hållare för objektglas.
- 5.2.9 Tvätta bort probe-överskott genom inkubation under 15 minuter i bägaren med 1x hybmix vid 55 °C.

- 5.2.10 För över hållaren för objektglas till 1/2 hybmix tvättlösning och inkubera under ytterligare 15 minuter
- 5.2.11 Doppa glaset hastigt i ultrarent vatten och placera dem på filterpapper. Avlägsna överskottsfukt genom att försiktigt täcka ytan med filterpapper. Pipettera 5–10 µl av inbäddningslösning som motverkar blekning (t.ex. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA eller liknande) på varje fönster och lägg ett stort täckglas (24 × 60 mm) över hela glaset.

5.3 Tolkning av FISH-testet

- 5.3.1 Observera glaset omedelbart i ett mikroskop utrustat för epifluorescensmikroskopi vid 630 eller 1000x förstoring under oljeimmersion. Med ett filter lämpligt för fluoresceinisothiocyanat (FITC) färgas eubakteriecellerna (inklusive de flesta gramnegativa cellerna) i provet fluorescerande gröna. Med ett filter för tetrametyldiamin-5-isotiocyanat framträder Cy3-infärgade celler av *C. m. subsp. sepedonicus* som fluorescerande röda. Jämför cellmorfologin med de positiva kontrollernas cellmorfologi. Cellerna skall vara klart fluorescerande och helt färgade. FISH-testet (avsnitt 9.4) skall återupprepas om färgningen är avvikande. Scanna fönstren utefter två diametrar i rät vinkel och runt perimetern. På de prover som inte uppvisar några celler eller endast ett litet antal celler, observera minst 40 mikroskopfält.
- 5.3.2 Sök efter klart fluorescerande celler med karakteristisk morfologi av *C. m. subsp. sepedonicus* i fönstren på glaset med prover (se kommissionens webbplats med adress <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Intensiteten hos fluorescensen skall vara likvärdig med eller större än fluorescensen hos den positiva kontrollstammen. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens beaktas inte.
- 5.3.3 Om smitta misstänks skall testet upprepas. Detta kan vara fallet om alla glas i ett parti uppvisar positiva celler på grund av smitta av en buffert eller om positiva celler påträffas (utanför glasets fönster) på objektglasöverdraget.
- 5.3.4 FISH-testets specificitet medför flera problem. Bestånd av fluorescerande celler med atypisk morfologi och korsreagerande saprofytiska bakterier som har en liknande storlek och morfologi som *C. m. subsp. sepedonicus* kan förekomma hos potatisar, dels i naveländarna, dels i pelletar av stjälksegmentet, även om de är mycket mer lågfrekventa än i IF-test.
- 5.3.5 Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi tas i beaktande (se 5.3.2).
- 5.3.6 Tolkning av resultaten från FISH-test:
- Giltiga resultat från FISH-test erhålls om klart fluorescerande gröna celler med storlek och morfologi som är typiskt för *C. m. subsp. sepedonicus* observeras när ett FITC-filter används respektive klart fluorescerande röda celler när ett rodamin-filter används i alla positiva kontroller och inte i någon av de negativa kontrollerna. För varje prov med ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi, bestäm medeltalet typiska celler per mikroskopfält och beräkna antal typiska celler per ml återsuspenderad pellet (tillägg 4). Prover som innehåller minst 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet betraktas som potentiellt smittade. Ytterligare provtagning krävs. Prover som innehåller färre än 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet betraktas som negativa.
 - FISH-testet är negativt om klart fluorescerande röda celler med storlek och morfologi som är typiskt för *C. m. subsp. sepedonicus* inte observeras när rodamin-filtret används, förutsatt att typiska klart fluorescerande röda celler observeras i de positiva kontrollpreparaten när rodamin-filtret används.

6. PCR-TEST

Principer

Om ett PCR-test används som huvudsakligt screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest i form av ett IF-test göras. Om PCR-testet används som andra screeningtest och resultatet är positivt, krävs ytterligare testning enligt flödesschemat för att diagnosen skall bli fullständig.

Fullt utnyttjande av denna metod som huvudsakligt screeningtest rekommenderas endast när särskild fackkompetens har uppnåtts.

Anmärkning:

Preliminär testning med denna metod bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av 10^3 – 10^4 celler av *C. m. subsp. sepedonicus* per ml som tillsätts till provextrakt som tidigare testats och gett negativt svar. Optimeringsexperiment kan krävas för att uppnå maximal sensitivitets- och specificitetsnivå i alla laboratorier.

Använd validerade PCR-reagens och PCR-protokoll. Välj helst en metod med internkontroll.

Vidta lämpliga åtgärder för att undvika nedsmittning av prover med mål-DNA. PCR-testerna bör utföras av erfarna tekniker i specialiserade molekylärbioologiska laboratorier för att minimera risken för nedsmittning av mål-DNA.

Negativa kontroller (för DNA-extraktions- och PCR-förfaranden) bör alltid behandlas som slutliga prov i förfarandet för att tydligt kunna visa om överföring till mål-DNA har inträffat eller ej.

Följande negativa kontroller bör ingå i PCR-testet:

- Provextrakt som tidigare givit negativt svar när det testats med avseende på *C. m. subsp. Sepedonicus*.
- Buffertkontroller som används för extrahering av bakterien och DNA från provet.
- PCR-reaktionsblandningen.

Följande positiva kontroller bör tas med:

- Delprover av återsuspenderad pellet till vilka *C. m. subsp. sepedonicus* har tillsatts (information om preparering finns i tillägg 2).
- En suspension av 10^6 celler per ml av *C. m. subsp. sepedonicus* i vatten från ett virulent isolat (t.ex. NCPPB 2140 eller NCPPB 4053).
- Om möjligt använd dessutom DNA från positiva kontrollprover i samband med att PCR-test.

För att undvika risk för smitta, preparera positiva kontroller i en separat omgivning från de prover som skall testas.

Provextrakten bör vara så fria från jord som möjligt. Om PCR-protokoll skall användas kan det därför i vissa fall vara tillrådligt att preparera extraheringar från tvättade potatisar.

6.1 Metoder för rening av DNA

Använd positiva och negativa kontrollprover såsom beskrivs ovan.

Preparera kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

Det finns en rad olika metoder för att rena mål-DNA från komplexa provsubstrat och på så sätt avlägsna inhibitorer av PCR och andra enzymreaktioner och koncentrera mål-DNA i provextraktet.

Följande metod har optimerats för att användas tillsammans med den validerade PCR-metod som visas i tillägg 6.

6.1 a) Metod enligt Pastrik (2000)

1. Pipettera 220 μ l av lyseringsbuffert (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) i ett 1,5 ml Eppendorf-rör.
2. Tillsätt 100 μ l provextrakt och placera i värmeblock eller vattenbad vid 95 °C under 10 minuter.
3. Ställ röret på kylning under 5 minuter.
4. Tillsätt 80 μ l Lysozym utgångslösning (50 mg lysozym per ml i 10 mM Tris HCl, pH 8,0) och inkubera vid 37 °C under 30 minuter.
5. Tillsätt 220 μ l Easy DNA[®] lösning A (Invitrogen), blanda väl genom skakning och inkubera vid 65 °C under 30 minuter.

6. Tillsätt 100 µl Easy DNA[®] lösning B (Invitrogen), skaka kraftigt tills fällningen svävar fritt i röret och provet är jämnt trögflytande.
7. Tillsätt 500 µl kloroform och skaka tills viskositeten ökar och blandningen är homogen.
8. Centrifugera vid 15 000 g under 20 minuter vid 4 °C för att separera faserna och bilda interfasen.
9. För över den övre fasen till ett rent Eppendorf-rör.
10. Tillsätt 1 ml 100-procentig etanol (– 20 °C), skaka snabbt och inkubera under nedkyllning under 10 minuter.
11. Centrifugera vid 15 000 g under 20 minuter vid 4 °C och avlägsna etanolen från pelleten.
12. Tillsätt 500 µl 80-procentig etanol (– 20 °C) och blanda genom att vända upp och ned på röret.
13. Centrifugera vid 15 000 g under 10 minuter vid 4 °C, spara pelleten och avlägsna etanolen.
14. Låt pelleten lufttorka eller torka i en DNA speed vac.
15. Återsuspendera pelleten i 100 µl sterilt ultrarent vatten och låt stå i rumstemperatur under minst 20 minuter.
16. Lagra vid – 20 °C fram till användning för PCR.
17. Blanda ned alla eventuella vita fällningar genom centrifugering och använd 5 µl av supernatanten innehållande DNA till PCR.

6.1 b) Andra metoder

Andra metoder för extraktion av DNA (t.ex. Qiagen DNeasy Plant Kit) skulle kunna användas, förutsatt att det är belagt att de har lika stor inverkan när det gäller att rena DNA från kontrollprover innehållande 10^3 – 10^4 patogena celler per ml.

6.2 PCR

- 6.2.1 Preparera test- och kontrolltemplat för PCR enligt det validerade protokollet (tillägg 6). Preparera en decimal utspädning av DNA-provextrakt (1:10 i ultrarent vatten).
- 6.2.2 Preparera lämplig PCR-reaktionsblandning i en omgivning fri från smitta enligt det offentliggjorda protokollet (tillägg 6). Det validerade PCR-protokollet är en multiplexreaktion som även omfattar en intern PCR-kontroll.
- 6.2.3 Tillsätt 5 µl DNA-extrakt per 25 µl PCR-reaktion i sterila PCR-rör.
- 6.2.4 Blanda i ett negativt kontrollprov innehållande PCR-reaktionsblandning och tillsätt ultrarent vatten av samma ursprung som det som användes i PCR-blandningen i stället för provet.
- 6.2.5 Placera rören i samma termocykellapparat som användes vid föregående testning och kör lämpligt optimerat PCR-program (tillägg 6).

6.3 Analys av PCR-produkten

- 6.3.1 Lös PCR-produkten med agarosgelelektrofores. Använd minst 12 µl av amplifierad DNA-reaktionsblandning från varje prov blandat med 3 µl laddningsbuffert (tillägg 6) i 2,0 % (w/v) agarosgel i tris-acetat-EDTA (TAE)-buffert (tillägg 6) vid 5–8 V per cm. Använd en lämplig DNA-markör, t.ex. 100 bp storleksmarkör.
- 6.3.2 Påvisa DNA-band genom att färga i etidiumbromid (0,5 mg per l) under 30–45 minuter, varvid lämpliga försiktighetsåtgärder bör vidtas vid hanteringen av mutagenen etidiumbromid.
- 6.3.3 Observera det färgade gelet i kortvågs-UV-genomlysning (t.ex. $\lambda = 302$ nm) och sök efter amplifierade DNA-produkter av förväntad storlek (tillägg 6) och dokumentera.

- 6.3.4 För varje ny upptäckt/nytt fall verifiera autenticiteten hos PCR-produkten genom att utföra restriktionsenzymanalys på ett prov av det återstående amplifierade DNA genom inkubation vid optimal temperatur och under optimal tid med en lämplig enzym och buffert (se tillägg 6). Lös de uppdelade fragmenten genom agarosgelelektrofores, som ovan, och observera det karakteristiska restriktionsfragmentsmönstret vid UV-genomlysning efter färgning i etidiumbromid, och jämför med den ouppdelade och uppdelade positiva kontrollen.

Tolkning av PCR-resultaten:

PCR-testet är negativt om det *C. m. subsp. sepedonicus*-specifika PCR-produkten av den förväntade storleken inte upptäcks i provet, men upptäcks i alla positiva kontrollprover (i fallet multiplex-PCR med plantspecifika interna kontrollprimrar skall en andra PCR-produkt av förväntad storlek amplifieras med provet i fråga).

PCR-testet är positivt om det *C. m. subsp. sepedonicus*-specifika PCR-produkten av den förväntade storleken och det förväntade restriktionsmönstret (vid behov) upptäcks, förutsatt att det inte amplifierats från någon av de negativa kontrollproven. Tillförlitlig bekräftelse av ett positivt resultat kan även erhållas genom att testet upprepas med en andra uppsättning PCR-primrar (avsnitt 9.3).

Anmärkning:

Inhibering av PCR kan misstänkas om den förväntade produkten erhålls från det positiva kontrollprovet innehållande *C. m. subsp. sepedonicus* i vatten men negativa resultat erhålls från positiva kontroller med *C. m. subsp. sepedonicus* i potatisextrakt. I multiplexa PCR-protokoll med interna PCR-kontroller anges inhibering av reaktionen när inget av de båda produkterna erhålls.

Smitta kan misstänkas om den förväntade produkten erhålls från en eller flera av de negativa kontrollerna.

7. BIOTEST

Anmärkning:

Preliminär testning med denna metod bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av 10^3 – 10^4 koloniformande enheter av *C. m. subsp. sepedonicus* per ml som tillsätts till provextrakt som tidigare testats och gett negativt svar (information om prepareringen finns i tillägg 2).

Högst känslighetsnivå för upptäckt kan förväntas då nyligen preparerade provextrakt används och optimala tillväxtförhållanden tillämpas. Metoden kan emellertid med framgång tillämpas på extrakt som har lagrats i glycerol vid –68 till –86 °C.

Vissa sorters äggplantor utgör ett utmärkt selektivt förökningssubstrat för tillväxt av *C. m. subsp. sepedonicus*, även i avsaknad av symptom, och är också utmärkta för bekräftande värdtest.

Tillväxtförhållandena bör vara optimala för att minska risken för falska negativa testresultat.

Detaljerad information om odling finns i tillägg 8.

- 7.1 Fördela hela det återstående testdelprovet av den återsuspenderade pelleten från avsnitt 3.1.6 eller 3.2.5 mellan äggplantorna genom att tillämpa en av nedan angivna metoder (7.3 eller 7.4). Använd endast plantor på bladstadium 2–3 upp till full utveckling av trebladsstadiet. För att säkerställa fullständig användning av den återsuspenderade pelleten och effektiv inokulation kommer de nedan beskrivna förfarandena att kräva 15–25 äggplantor per prov.
- 7.2 Undvik att vattna äggplantorna 1–2 dagar före inokulationen för att minska saftspänningen.
- 7.3 Inokulation genom skåra
- 7.3.1 Håll plantan mellan två fingrar, droppa med hjälp av en pipett en droppe (ca 5–10 µl) av det uppslammade koncentrerade extraktet på stjälken mellan hjärtbladen och det första bladet.
- 7.3.2 Med en steril skalpell görs en diagonal skåra ungefär 1,0 cm lång och ungefär lika djup som två tredjedelar av stjälkens diameter med början vid droppen med det koncentrerade extraktet.
- 7.3.3 Förslut skåran med sterilt vaselin från en spruta.

- 7.4 Inokulation med en spruta
- 7.4.1 Inokulera äggplantornas stjälkar precis ovanför hjärtbladen med en spruta som är försedd med injektionsnål (minst 23G). Fördela provet mellan äggplantorna.
- 7.5 Som positiva kontroller, inokulera 5 plantor med en vattensuspension av 10^5 till 10^6 celler per ml av känd kultur av *C. m. subsp. sepedonicus* och, vid behov, med naturligt angripen knölvävnad (se avsnitt 4) genom samma inokuleringsmetod (7.3 eller 7.4).
- 7.6 Som negativa kontroller, inympa 5 plantor med steril pelletbuffert genom samma inokuleringsmetod (7.3 eller 7.4).
- 7.7 Inkubera plantorna i karantänsanläggningar upp till 4 veckor vid 18–24 °C. Inkubera plantorna med tillräckligt ljus och fuktighet (70–80 %) och vatten för att förhindra vattenmättnad eller vissnande på grund av vattenbrist. *C. m. sepedonicus* celler dör vid temperaturer över 30 °C, och den optimala temperaturen är 21 °C. För att undvika nedsmittning, inkubera positiva och negativa kontrollplantor på strikt separata bänkar i ett växthus eller odlingsrum eller, vid platsbrist, se till att hanteringen sker strikt separat. Om plantor från olika prover skall inkuberas tätt tillsammans, separera dem med lämpliga skärmar. Vid gödning, bevattning, inspektion och annan behandling, var noga med att undvika korskontaminering. Det är mycket viktigt att hålla växthus och odlingsrum fria från alla skadeinsekter eftersom de kan överföra bakterien från prov till prov.
- 7.8 Efter en vecka undersöks plantorna på vanligt sätt efter symptom. Räkna antalet plantor som uppvisar symptom. *C. m. subsp. sepedonicus* orsakar vissnade blad hos äggplantor, vilket kan börja som slapphet längs kanterna eller mellan nerverna. Vissnad vävnad kan till en början se mörkgrön eller fläckig ut, men bleknar innan den blir nekrotisk. Vissnade områden mellan bladnerverna ser ofta feta och vattenfyllda ut. Nekrotisk vävnad har ofta en klart gul kant. Plantorna dör nödvändigtvis inte; ju längre tid som går innan symptomen visar sig, desto större är chansen för överlevnad. Plantorna kan kväva infektionen. Unga äggplantor är mycket mottagligare för små populationer av *C. m. subsp. sepedonicus* än äldre plantor. Därför är det nödvändigt att använda plantor på eller lite före bladstadium 3.
- Vissnandet kan också orsakas av andra bakterie- eller svamppopulationer som finns i det koncentrerade extraktet av knölarnas vävnad. Dessa kan utgöras av *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* och *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia chrysanthemi*, *Phoma exigua* var. *foveata* och stora bestånd av saprofytiska bakterier. Särskilt *Erwinia chrysanthemi* kan orsaka bladsymptom och vissnande som är mycket lika symptomen på *C. m. sepedonicus*. Den enda skillnaden är svartnandet av stjälkarna vid infektion med *Erwinia chrysanthemi*. Andra typer av vissnande kan skiljas från det vissnande som orsakas av *C. m. subsp. sepedonicus* eftersom hela blad eller hela plantor vissnar snabbt. Även gramfärgning kan göras: detta test skiljer *C. m. subsp. sepedonicus* från *Erwinia* spp.
- 7.9 Så snart symptom observeras på äggplantorna bör en reisolation göras, varvid segment av vissnad bladvävnad eller stjälvvävnad används (information om finfördelning av vävnad finns i 3.1.3). Desinficera ytan på äggplantornas blad och stjälkar genom att torka av dem med 70-procentig etanol. Gör ett IF-test eller PCR-test på äggplantans växtsaft och isolera på lämpliga (selektiva) substrat (se avsnitt 8). Även gramfärgning (tillägg 9) kan prepareras. Identifiera renkulturer av presumtiv *C. m. subsp. sepedonicus* och bekräfta skadegöraren (se avsnitten 9 och 10).
- 7.10 Under vissa omständigheter, i synnerhet då tillväxtförhållandena inte är optimala, är det möjligt för *C. m. subsp. sepedonicus* att existera som en latent infektion i äggplantorna, till och med efter inkubationsperioder på upp till 4 veckor. Om inga symptom observeras efter 4 veckor: utför IF/PCR på ett blandprov av 1 cm stjälksegment från varje testplanta taget ovanför inokuleringsstället. Om testet är positivt bör en omisolering på lämpliga (selektiva) substrat göras enligt förfarandet i avsnitt 8. Identifiera renkulturer av presumtiv *C. m. subsp. sepedonicus* och bekräfta patogenitet (avsnitten 9 och 10).

Tolkning av resultatet av biotestet

Giltiga resultat från biotest erhålls om plantor från den positiva kontrollen uppvisar typiska symptom, bakterier kan omisoleras från dessa plantor och inga symptom återfinns på de negativa kontrollerna.

Biotestet är negativt om testplantorna inte är infekterade med *C. m. subsp. sepedonicus* och under förutsättning att *C. m. subsp. sepedonicus* påvisas i de positiva kontrollerna.

Biotestet är positivt om testplantorna är infekterade med *C. m. subsp. sepedonicus*.

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

Anmärkning:

Diagnosen är endast fullständig om *C. m. subsp. sepedonicus* isoleras, därefter identifieras (se avsnitt 9) och bekräftas av ett patogenitetstest (avsnitt 10). Trots att *C. m. subsp. sepedonicus* är en skadegörare som är svår att hantera är det möjligt att isolera den utgående från vävnad som visar symptom på angrepp.

Den kan emellertid kvävas av snabbt växande saprofytiska bakterier och därför är det svårt att utföra isolering direkt från pelleten av stjälk- eller knölvävnad (avsnitt 3.1.6 eller 3.2.5). Med ett selektivt substrat och lämplig utspädning av den återsuspenderade pelleten från potatisarnas naveländar eller stjälkar kan det vara möjligt att utföra direkt isolering av *C. m. subsp. sepedonicus*.

Isolering bör göras från alla potatisknölar och stjälksegment och från äggplantor som visserligen inte uppvisat symptom vid observation men vars blandprov givit negativt svar vid IF-/PCR-test (se avsnitt 7.10). Om nödvändigt bör bifördelning av äggplantsstjälkar utföras som i avsnitt 3.1.3.

Som positiva kontroller preparera decimala utspädningar från en suspension av 10^6 kolonibildande enheter per ml av *C. m. subsp. sepedonicus* (t.ex. NCPPB 4053 eller PD 406). För att undvika risk för nedsmittning, preparera positiva kontroller som är fullständigt åtskilda från de prover som skall testas.

För varje nyligen preparerat parti av selektivt substrat bör dess lämplighet för tillväxt av patogenet testas innan det används för att testa rutinprover.

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

8.1 Odling på selektivt substrat

8.1.1 Från ett delprov på 100 µl från ett återsuspenderat potatispelletprov eller äggplantsväxtsaft gör exponentiella utspädningar i en pelletbuffert (tillägg 3).

8.1.2 Isolering från outspädd potatispelletet misslyckas vanligen på grund av den komplicerade tillväxtkaraktären hos *C. m. subsp. sepedonicus* och konkurrens från saprofyterna. Eftersom bakterien vanligen förekommer i stora populationer i infekterade vävnader kan saprofyter vanligen spädas, samtidigt som patogenet kvarstår. Det rekommenderas därför att 100 µl från varje prov, 1/100 till 1/10 000 utspädningar sprids ut på MTNA-substrat eller NCP-88-substrat (tillägg 5) (om en 90 mm petriskål används, anpassa volymen efter alternativa skålstorlekar), varvid racklor och racklingsteknik används.

Anmärkning:

Ett alternativt tillvägagångssätt är att sprida ut den ursprungliga 100 µl potatispelletdelprovet på en första agarplatta med en rackla och därefter överföra racklan till en andra agarplatta, där alla eventuella rester på racklan stryks ut. Upprepa slutligen förfarandet på en tredje platta för att på så sätt få till stånd en utspädningsplatt-effekt med hjälp av racklan.

8.1.3 Inkubera plattorna i mörker vid 21–23 °C.

8.1.4 Inledande undersökningar av plattorna, inklusive, genom hänvisning till kontrollplattorna, räkning av alla *C. m. subsp. sepedonicus*-liknande kolonier sker efter 3 dagar, och ytterligare räkning sker efter 5, 7 och slutligen 10 dagar.

8.2 Rening av misstänkta kolonier

Anmärkning:

Subkulturodling av *C. m. subsp. sepedonicus*-liknande kolonier bör ske på YGM-substrat för inokulering av äggplantor och/eller efterföljande identifiering. Detta bör ske innan plantorna blir alltför stora, det vill säga helst efter 3–5 dagar.

8.2.1 Stryk *C. m. subsp. sepedonicus*-liknande kolonier på ett av följande substrat (formler anges i tillägg 5):

Näringsagar med dextros (endast för renkultur).

Agar med jäst, pepton och glukos.

Agar med jästextrakt och mineralsalter.

Inkubera i 21–24 °C i upp till 10 dagar.

C. m. subsp. *sepedonicus* växer långsamt och producerar knappnålsliknande, krämfärgade, kupolformade kolonier inom 10 dagar. (Foton på typiska kolonier av *C. m.* subsp. *sepedonicus* finns på kommissionens webbplats med adress <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

8.2.2 Stryk på nytt för att uppnå renhet.

Tillväxttakten förbättras genom renkulturodling. Typiska kolonier är krämvita eller elfenbensvita, ibland gula, runda, släta, upphöjda, kupolkonvexa, slemaktiga till flytande, har hela kanter och är vanligtvis 1–3 mm i diameter.

En enkel gramfärgning (tillägg 9) kan utföras för att underlätta att välja kolonier för ytterligare testning.

8.2.3 Identifiera presumtiva kulturer (se avsnitt 9) och gör ett patogenitetstest (se avsnitt 10).

9. IDENTIFIERING

Identifiera renkulturer av presumtiva *C. m.* subsp. *sepedonicus*-isolat genom att utföra minst två av följande tester baserade på olika biologiska principer.

Ta med kända referensstammar när så är lämpligt vid varje test som utförs.

9.1 Nutrient- och enzymatiska identifikationstester

Fastställ följande fenotypiska egenskaper som alltid är närvarande eller frånvarande i *C. m.* subsp. *sepedonicus* enligt metoderna Lelliott och Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001), anonym (1987).

Alla substrat bör inkuberas vid 21 °C och undersökas efter 6 dagar. Om ingen tillväxt har skett, inkubera i upp till 20 dagar.

Alla tester skall inbegripa en känd *C. m.* subsp. *sepedonicus*-kontroll. Näringstester och fysiologiska tester skall utföras med inokulat från subkulturer på näringsagar. De morfologiska jämförelserna skall göras på grundval av odlingar på näringsagar med dextros.

Försök	Förväntat resultat
Oxidations-/fermenteringstest (O/F-test)	Inert eller svagt oxidativa
Oxidasaktivitet	–
Tillväxt vid 37 °C	–
Ureasaktivitet	–
Hydrolys av aesculin	+
Hydrolys av stärkelse	– eller svag
Tolerans hos 7-procentig NaCl	–
Produktion av indol	–
Katalasaktivitet	+
Produktion av H ₂ S	–
Utnyttjande av citrat	–
Smältning av gelatin	–
Syra från glycerol	–
Syra från laktos	– eller svag
Syra från ramnos	–
Syra från salicin	–
Gramfärgning (tillägg 9)	+

9.2 IF-test

- a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i IF-buffert (tillägg 3).
- b) Preparera en serie dubbla utspädningar av ett lämpligt antiserum.
- c) Tillämpa IF-förfarandet (avsnitt 4).
- d) Ett positivt IF-test erhålls om kulturen har samma IF-titer som den positiva kontrollen.

9.3 PCR-test

- a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.
- b) Upphetta 100 µl av cellsuspensionen i tillslutna rör i värmeblock eller kokande vattenbad i 100 °C under 4 minuter. Vid behov, tillsats av nyligen preparerad NaOH till en slutkoncentration av 0,05 M kan bidra till lysering av cellen. Proverna kan därefter lagras i -16 till -24 °C fram till användning.
- c) Tillämpa lämpliga PCR-förfaranden för att amplifiera *C. m. subsp. sepedonicus*-specifika PCR-produkter (t.ex. Pastrik, 2000; se tillägg 4; Li och de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik och Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).
- d) En positiv identifiering av *C. m. subsp. sepedonicus* erhålls om PCR-produkterna har samma storlek och samma RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) som den positiva kontrollstammen.

9.4 FISH-test

- a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.
- b) Tillämpa FISH-förfarandet (avsnitt 5).
- c) Ett positivt FISH-test föreligger om samma reaktioner erhålls från kulturen och den positiva kontrollen.

9.5 Fettsyraprofilering (FAP)

- a) Odla kulturen på trypticase-soja-agar (Oxoid) under 72 timmar i 21 °C (+/- 1°).
- b) Tillämpa ett lämpligt FAP-förfarande (Janse, 1991; Stead, 1992).
- c) Ett positivt FAP-test erhålls om den presumtiva kulturen har samma profil som den positiva kontrollen. Förekomsten av karakteristiska fettsyror är 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso samt 16:0 och 17:0 Anteiso, vilket i hög grad tyder på *C. m. sepedonicus*. Andra sorter, såsom *Curtobacterium*, *Arthrobacter* and *Micrococcus*, innehåller också vissa av dessa syror, men 15:1 Anteiso A är en ovanligt syra i dessa bakterier. Den uppträder emellertid i alla *Clavibacter* spp. med en andel på 1–5 %. I *C. m. sepedonicus* är andelen vanligtvis omkring 5 %.

9.6 BOX-PCR

- a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.
- b) Utför testet enligt förfarandet (Smith *et al.*, 2001).

10. VERIFIERINGSTEST

Patogenitetstestet skall utföras som en slutlig bekräftelse på en diagnos av *C. m. subsp. sepedonicus* och för att bedöma virulensen hos kulturer identifierade som *C. m. subsp. sepedonicus*.

- 10.1 Preparera ett inokulat av ca 10^6 celler per ml av 3-dagarskulturer av det isolat som skall kontrolleras och en lämplig positiv kontrollstam av *C. m. subsp. sepedonicus*.

- 10.2 Inokulera 5–10 äggplantsstjälkar av unga småplantor i bladstadium 3 (avsnitt 7.3 eller 7.4).
- 10.3 Inkubera i 18–24 °C med tillräckligt ljus och hög relativ luftfuktighet med lämplig bevattning för att undvika vattenmättnad eller stress till följd av torka (avsnitt 7.7). Med renkulturer bör typiskt vissnande uppnås inom 2 veckor, men plantor som inte visar symptom (se avsnitt 7.8) efter denna tid bör inkuberas i upp till 3 veckor vid temperaturer som främjar äggplantornas tillväxt men som inte överstiger 25 °C (tillägg 8). Om inga symptom föreligger efter 3 veckor, kan det inte fastslås att kulturen är en patogen form av *C. m.* subsp. *sepedonicus*.
- 10.4 Isolera från plantor med symptom genom att avlägsna ett segment från stjälken på 2 cm ovanför inokuleringspunkten. Finfördela och suspendera i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert (tillägg 3). Isolera från suspensionen genom utspädning. Rackla eller stryk därefter på MTNA och YPGA (tillägg 5), inkubera under 3–5 dagar i 21–23 °C och observera bildandet av kolonier typiska för *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

Tillägg 1

Laboratorier som utför optimering och validering av protokoll

Laboratorium ⁽¹⁾	Plats	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien och Linz	Österrike
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgien
Plantedirektoratet	Lyngby	Danmark
Central Science Laboratory	York	England
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skottland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankrike
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankrike
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Tyskland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Tyskland
State Laboratory	Dublin	Irland
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederländerna
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Ås	Norge
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slovenien
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien

(¹) Kontaktuppgifter för personalen finns på kommissionens webbplats (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Tillägg 2

Preparering av positiva och negativa kontroller för screeningstesterna av naveländar PCR/IF och FISH

Framställ en 72-timmarskultur av en virulent stam av *C. m. subsp. sepedonicus* (NCPBP 4053 eller PD 406) på MTNA och suspendera i 10 mM fosfatbuffert för att erhålla en celltäthet av omkring $1-2 \times 10^8$ kolonibildande enheter per ml. Detta erhålls vanligtvis genom en svagt grumlig suspension med en optisk densitet av 0,20 vid 600 nm.

Avlägsna naveländarna från 200 knölar tagna från en odling som är känd för att vara fri från *C. m. subsp. sepedonicus* och där potatis med vitt skal odlas.

Behandla naveländarna på vanligt sätt och suspendera pelleten i 10 ml.

Preparera 10 sterila 1,5 ml mikrorör med 900 µl av den återsuspenderade pelleten.

Överför 100 µl av suspensionen av *C. m. subsp. sepedonicus* till det första mikroröret. Skaka.

Fastställ decimala kontamineringsnivåer genom ytterligare spädning i de andra fem mikrorören.

De sex smittade mikrorören används som positiva kontroller. De fyra icke-smittade mikrorören används som negativa kontroller. Märk mikrorören i överensstämmelse härmed.

Preparera delprover på 100 µl i steril 1,5 ml mikrorör och erhåll på så sätt 9 repliker av varje kontrollprov. Lagra i -16 till -24 °C fram till användning.

Förekomsten och kvantifieringen av *C. m. subsp. sepedonicus* i kontrollproverna bör först bekräftas via IF.

För PCR-testet, gör DNA-extraktion från de positiva och negativa kontrollproven för varje serie av testprover.

För IF- och FISH-testen, gör testerna på de positiva och negativa kontrollproven för varje serie av testprover.

För IF-, FISH- and PCR-testerna skall *C. m. subsp. sepedonicus* påvisas i minst 10^6-10^4 celler/ml i de positiva kontrollerna och inte i någon i de negativa kontrollerna.

Tillägg 3

Buffertar för testförfarandena

ALLMÄN ANMÄRKNING: Öppnade steriliserade buffertar kan förvaras i upp till ett år.

1. Buffertar för extraktionsförfarande**1.1 Extraktionsbuffert (50 mM fosfatbuffert, pH 7,0)**

Denna buffert används för extraktion av bakterien från plantvävnader genom homogenisering eller skakning.

Na ₂ HPO ₄ (vattenfri)	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Destillerat vatten	1,00 l

Lös upp ingredienserna, kontrollera pH och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

Ytterligare komponenter kan vara av nytta enligt följande:

	Syfte	Kvantitet (per l)
Lubrolflingor	Deflockulering (*)	0,5 g
DC-silikonskumdämpning	Skumdämpningsmedel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfat	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP-40)	Bindning av PCR-inhibitorer	50 g

(*) Används med homogeniseringsextraktionsmetoden.

1.2 Pelletbuffert (10 mM fosfatbuffert, pH 7,2)

Denna buffert används för återsuspension och utspädning av extrakt av naveländar från potatisknölar efter koncentration till en pellet följt av centrifugering.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
Destillerat vatten	1,00 l

Lös upp ingredienserna, kontrollera pH och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

2. Buffertar för IF-test**2.1 IF-buffert (10 mM fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,2)**

Denna buffert används för utspädning av antikroppar.

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

Lös upp ingredienserna, kontrollera pH och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

2.2 IF-buffert – Tween

Denna buffert används för att tvätta objektglas.

Tillsätt 0,1 % Tween 20 till IF-bufferten.

2.3 Fosfatbuffrad glycerol, pH 7,6

Denna buffert används som monteringsvätska på fönstren av IF-glas för att förbättra fluorescensen.

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

Inbäddningslösning som motverkar blekning finns i handeln, t.ex. Vectashield® (Vector Laboratories) och Citifluor® (Leica).

Tillägg 4

Bestämning av kontamineringsnivå i IF- och FISH-tester

1. Räkna medeltalet typiska fluorescerande celler per synligt fält (c).
2. Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per objektglasfönster (C).

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

där S = multispotglasets fönsteryta, och
s = objektivfältets yta

$s = \pi^2/4G^2K^2$ där i = synfältskoefficient (varierar från 8 till 24 beroende på typen av okular)
K = tubkoefficient (1 eller 1,25)
G = objektivets förstoring (100×, 40× osv.).

3. Beräkna antalet typiska fluorescerande celler per ml återsuspenderad pellet (N)

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

där y = volym av återsuspenderad pellet på varje fönster, och
F = den återsuspenderade pelletens utspädningsfaktor.

Tillägg 5

Substrat för isolering och odling av *C. m. subsp. sepedonicus*a) *Allmänna odlingssubstrat*

Näringsagar (NA)

Näringsagar (Difco)	23,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

Lös upp ingredienserna och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

Näringsagar med dextros (NDA)

Difco Bacto näringsagar innehållande 1-procentig D(+)-glukos (monohydrat). Steriliseras i autoklav vid 115 °C i 20 minuter.

Agar med jäst, pepton och glukos (YPGA)

Jästextrakt (Difco)	5,0 g
Bacto pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-glukos (monohydrat)	10,0 g
Bacto agar (Difco)	15,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

Lös upp ingredienserna och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

Agar med jästextrakt och mineralsalter (YGM)

Bacto jästextrakt (Difco)	2,0 g
D(+)-glukos (monohydrat)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Bacto agar (Difco)	18 g
Destillerat vatten	1,0 l

Lös upp ingredienserna och sterilisera 0,5 liter av substrat i autoklav vid 115 °C under 20 minuter.

b) *Validerade selektiva odlingssubstrat*

MTNA-substrat

Om inte annat anges kommer substratens beståndsdelar från BDH

Jästextrakt (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g

KH ₂ PO ₄	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,015 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,005 g
Agar (Oxoid nr 1)	16,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

Lös upp ingredienserna, justera pH till 7,2. Efter sterilisering i autoklav vid 121 °C i 15 minuter och nedkylning till 50 °C, tillsätt följande antibiotika: trimetoprim 0,06 g, nalidixinsyra 0,002 g och amfotericin B 0,01 g.

Antibiotiska utgångslösningar: trimetoprim (Sigma) and nalidixinsyra (Sigma) (båda vid 5 mg/ml), i 96-procentig metanol, amfotericin B (Sigma) (1 mg/ml) i dimetylsulfoxid. Utgångslösningarna är filtersteriliserade.

Anmärkning:

Bassubstratens hållbarhet är 3 månader. Efter tillsats av antibiotika är hållbarheten 1 månad vid förvaring nedkylt.

NCP-88-substrat

Näringsagar (Difco)	23 g
Jästextrakt (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Destillerat vatten	1,0 l

Lös upp ingredienserna, justera pH till 7,2. Efter sterilisering i autoklav och nedkylning till 50 °C, tillsätt följande antibiotika: polymyxin B-sulfat (Sigma) 0,003 g, nalidixinsyra (Sigma) 0,008 g och cykloheximid (Sigma) 0,2 g.

Lös antibiotikan i utgångslösningarna enligt följande: nalidixinsyra i 0,01 M NaOH, cykloheximid i 50 % etanol, polymyxin B-sulfat i destillerat vatten. Utgångslösningarna är filtersteriliserade.

Anmärkning:

Bassubstratens hållbarhet är 3 månader. Efter tillsats av antibiotika är hållbarheten 1 månad vid förvaring nedkylt.

Tillägg 6

Validerade PCR-protokoll och PCR-reagens

Anmärkning:

Preliminär testning bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av minst 10^3 - 10^4 celler av *C. m. subsp. sepedonicus* per ml provextrakt.

Den preliminära testningen bör dessutom inte visa några falska positiva resultat med en grupp utvalda bakteriestammar.

1. Multiplexa PCR-protokoll med intern PCR-kontroll (Patrik, 2000)

1.1 Oligonukleotidprimrar

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

Förväntad storlek på produkter från DNA-templat från *C. m. subsp. sepedonicus* = 502 bp (PSA-primerset).

Förväntad storlek på produkter från 18S rRNA intern PCR-kontroll = 377 bp (NS-primerset).

1.2 PCR-reaktionsblandningen

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	15,725 µl	
10× PCR-buffert ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 × (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP-blandning (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10µM) ⁽²⁾	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymerase (5U/µl) ⁽¹⁾	0,2 µl	1,0 U
Provolym	5,0 µl	
Total volym	25,0 µl	

⁽¹⁾ Metoderna validerades med Taq polymeras från Perkin Elmer (AmpliTaQ eller Gold) och Gibco BRL.

⁽²⁾ Koncentrationen av primrarna NS-7 F och NS-8-R optimerades för extraktion av potatisars naveländar med användning av homogeniseringsmetoden och DNA-rening enligt Patrik (2000) (se avsnitt 6.1 a och 6.2). Reoptimering av reagenskoncentrationerna krävs om extraktion genom skakning eller andra metoder för isolering av DNA används.

1.3 PCR-reaktionsbetingelser

Kör följande program:

1 cykel:	i)	3 minuter vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
10 cykler:	ii)	1 minut vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
	iii)	1 minut vid 64 °C (påkoppling av primers)
	iv)	1 minut vid 72 °C (förlängning av kopia)

25 cykler:	v)	30 sekunder vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
	vi)	30 sekunder vid 62 °C (påkoppling av primers)
	vii)	1 minut vid 72 °C (förlängning av kopia)
1 cykel:	viii)	5 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)
	ix)	håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning:

Det här programmet är optimerat för användning med en MJ Research PTC 200 termocykelapparat. Vid användning av andra modeller kan det komma att krävas modifiering av cyklerna ii, iii, iv, v, vi och vii.

1.4 Restriktionsenzymanalys av produkten

PCR-produkter som amplifierats från DNA från *C. m. subsp. sepedonicus* producerar distinkt RFLP ("restriction fragment length polymorphism") med enzymet *Bgl* II efter inkubation vid 37 °C under 30 minuter. De restriktionsfragment som erhållits från fragment specifika för *C. m. subsp. sepedonicus* är 282 bp och 220 bp i storlek.

2. Preparering av laddningsbuffert

2.1 Bromtymolblått (10-procentig utgångslösning)

Bromtymolblått	5 g
Destillerat vatten (dubbeldestillerat)	50 ml

2.2 Laddningsbuffert

Glycerol (86 %)	3,5 ml
Bromtymolblått (5,1)	300 µl
Destillerat vatten (dubbeldestillerat)	6,2 ml

3. 10× Tris-Acetat-EDTA (TAE) buffert, pH 8,0

Tris-buffert	48,4 g
Iskall ättiksyra	11,42 ml
EDTA (dinatriumsalt)	3,72 g
Destillerat vatten	1,00 l

Späd till 1x före användning.

Finns även att köpa i handeln (t.ex. Invitrogen eller motsvarande).

Tillägg 7

Validerade reagens för FISH-test

1. Oligo-prober

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

2. Fixeringslösning

(VARNING! FIXERINGSVÄTSKAN INNEHÅLLER PARAFORMALDEHYD, SOM ÄR GIFTIG. BÄR HANDSKAR OCH ANDAS INTE IN GASEN. DET ÄR TILLRÅDLIGT ATT ARBETA I ETT DRAGSKÅP.)

- i) Upphetta 9 ml vatten av molekylärbilogisk kvalitet (t.ex. ultrarent vatten) till ca 60 °C och tillsätt 0,4 g paraformaldehyd. Paraformaldehyden löses efter tillsats av 5 droppar 1N NaOH och omrörning med magnetomrörare.
- ii) Justera pH till 7,0 genom tillsats av 1 ml 0,1 M fosfatbuffert (pH 7,0) och 5 droppar 1N HCl. Kontrollera pH med indikatorpapper och justera vid behov med HCl eller NaOH.

(VARNING! ANVÄND INTE EN PH-MÄTARE I VÄTSKOR MED PARAFORMALDEHYD.)

- iii) Filtrera lösningen genom ett 0,22 µm membranfilter och förvara dammfritt i 4 °C fram till användning.

- iv) Anmärkning:

Alternativ fixeringslösning: 96-procentig etanol.

3. 3x Hybmix

NaCl 2,7 M
 Tris-HCl 60 mM (pH 7,4)
 EDTA (filter steriliserat och autoklaverat) 15 mM

Späd till 1x i enlighet med kraven.

4. Hybridiseringslösning

1× Hybmix

Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,01 %
 prob EUB 338 5 ng/µl
 prob CMSCY301 5 ng/µl

Preparera de kvantiteter av hybridiseringslösning som anges i beräkningarna i tabell 1. För varje glas (innehållande 2 olika prover i duplikat) krävs 90 µl hybridiseringslösning.

Tabell: Föreslagna kvantiteter för preparering av hybridiseringslösning.

	2 glas	8 glas
Sterilt ultrarent vatten	50,1	200,4
3x hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Probe CMSCY301 (100 ng/µl)	4,5	18,0
Total volym (µl)	90,0	360,0

Anmärkning: Lagra alla lösningar innehållande ljuskänsliga oligo-prober mörkt i - 20 °C. Skydda mot direkt solljus eller elektriskt ljus vid användning.

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

Na ₂ HPO ₄	8,52 g
KH ₂ PO ₄	5,44 g
Destillerat vatten	1,00 l

Lös upp ingredienserna, kontrollera pH och sterilisera i autoklav i 121 °C under 15 minuter.

Tillägg 8**Odling av äggplantor**

Så fröer av äggplanta (*Solanum melongena*) i steril såjord. Plantera ut fröplantorna i steril planteringsjord då hjärtbladen är helt utvecklade (10 till 14 dagar).

Äggplantor bör odlas i växthus under följande miljöförhållanden:

Dagslängd	14 timmar eller naturlig dagslängd om längre
Temperatur:	dag: 21–24 °C
	natt: 15 °C

Mottagliga äggplantssorter:	"Black Beauty"
	"Long Tom"
	"Rima"
	"Balsas"

Information om leverantören finns på kommissionens webbplats (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Tillägg 9

Förfarande vid gramfärgning (Huckers modifikation) (Doetsch, 1981) ⁽¹⁾*Lösning med kristallviolett*

Lös upp 2 g kristallviolett i 20 ml 95-procentig etanol.

Lös upp 0,8 g ammoniumoxalat i 80 ml destillerat vatten.

Blanda de två lösningarna.

Lugols jod

Jod	1 g
Kalciumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 ml

Sönderdela de fasta ämnena tillsammans i en mortel. Tillsätt till vattnet och rör om i en stängd behållare så att ämnena upplöses.

Färgande lösning med saffranin

Utgångslösning:

Safranin O	2,5 g
95-procentig etanol	100 ml

Blanda och lagra.

Spädes i förhållandet 1:10 för att få en arbetslösning.

Förfarande vid färgning

1. Preparera utstrykningspreparaten, lufttorka och värmefixera dem.
2. Dränk objektglaset i kristallviolettlösning i en minut.
3. Tvätta snabbt med kranvatten.
4. Dränk objektglaset i Lugols jod i en minut.
5. Tvätta i rinnande vatten och torka med läskpapper.
6. Avfärga genom att tillsätta 95-procentig etanol droppvis tills ingen färg längre avlägsnas eller doppa glaset i etanol i 30 sekunder under försiktig omrörning.
7. Tvätta med rinnande vatten och torka med läskpapper.
8. Dränk objektglaset i saffraninlösning i 10 sekunder.
9. Tvätta i rinnande vatten och torka med läskpapper.

Grampositiva bakterier färgas violett-blå; gramnegativa bakterier färgas rosa-röda.

(¹) I handeln tillgängliga lösningar och färgningskit kan även användas.

REFERENSER

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bull.* 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14; 335-345.
7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. *EPPO Bull.*, No 17, 1987, pp. 1-10.
8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 590-601.
9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.
11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. appl. Bact.*, 29, 114-118.
12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. appl. Bact.*, 29, 470-489.
13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Koth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bull.*, 6 (2), 101-106.
14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, 85, 837-842.
15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology*, 87, 8, 853-861.
16. Pastrok, K. -H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibactermichiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathology* 147; 687-693.
17. Pastrok, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 155-165.
18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83; 1095-1100.
20. Schaad, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Schaad [Hrsg.]. — 3. ed.; St. Paul, Minnesota; 373 pp.
21. Skerman, V. B. D., 1967. *A guide to the identification of the genera of bacteria*. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.
22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology*, 107 (7), 739-748.
23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 481-527.
24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42; 281-295.
25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent *in situ* hybridization with 23s rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4546-4554.

BILAGA II

1. Vid varje misstänkt förekomst för vilken ett eller flera positiva screeningtester har utförts enligt de metoder som avses i bilaga I bör, i avvaktan på bekräftelse eller vederläggning genom slutförande av den nämnda metoden, följande föremål bevaras och förvaras på lämpligt sätt till dess att metoderna har slutförts:

- Alla de knölar, och om möjligt plantor, från vilka prover har tagits.
- Allt kvarvarande extrakt och ytterligare förberett material för screeningtest(er), t.ex. immunofluorescensglas.
- All relevant dokumentering.

Genom bevaring av knölarerna kan vid behov sorttester göras.

2. Om förekomst av skadegöraren bekräftas, bör följande bevaras och förvaras på lämpligt sätt under åtminstone en månad efter anmälningsförfarandet enligt artikel 5.2:

- Det material som specificeras i punkt 1.
 - Ett prov av det infekterade äggplantematerialet inokulerat med knöl- eller plantextrakt.
 - Den isolerade kulturen av skadegöraren.
-

BILAGA III

1. Följande skall beaktas vid bestämningen av hur omfattande den troliga smitta som avses i artikel 5.1 b är:
 - Knölar och plantor som har odlats på en produktionsplats som förklaras smittad enligt artikel 5.1 a.
 - Den eller de produktionsplatser med någon anknytning till produktionen av de knölar eller plantor som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a, inklusive anknytning via produktionsutrustning eller produktionsanordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör.
 - Knölar eller plantor som har producerats på en sådan plats (sådana platser) som avses i föregående strecksats, eller som har förvarats på en sådan plats (sådana platser) under den tid då de knölar eller plantor som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a befann sig på den produktionsplats som avses i första strecksatsen.
 - Anläggningar som hanterar potatis från produktionsplatserna i ovannämnda strecksatser.
 - Alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterial, som kan ha kommit i kontakt med de knölar eller plantor som har förklarats angripna i enlighet med artikel 5.1 a.
 - Alla knölar eller plantor som har lagrats i, eller kommit i kontakt med, någon av de platser eller något av föremål som anges i föregående strecksats innan dessa platser eller föremål hade rengjorts och desinficerats.
 - Till följd av den undersökning som avses i artikel 6, de knölar eller plantor som har ett syster- eller moderförhållande genom kloning till de knölar eller plantor som har förklarats angripna i enlighet med artikel 5.1 a och som, trots att de kan ha givit negativt svar när de testats för skadegöraren, sannolikt är angripna via ett klonings samband. Sorttester kan göras för att styrka identiteten hos de knölar eller plantor som är smittade och som kommer ur kloner som är närbesläktade.
 - Den eller de produktionsplatser för de knölar eller plantor som avses i föregående strecksats.
2. Följande skall beaktas vid bestämningen av den möjliga spridning som avses i artikel 5.1 c:
 - Närheten till andra produktionsplatser där det odlas potatis eller andra värdväxter.
 - Den gemensamma produktionen och användningen av partierna av utsädespotatis.
3. Den anmälan som avses i artikel 5.2 första stycket skall uppfylla följande:
 - Den skall avges omedelbart efter det att förekomst av skadegöraren har bekräftats av laboratorietester, vilka utförts med tillämpning av de metoder som anges i bilaga I, och omfatta minst
 - potatispartiets sortnamn,
 - potatispartiets typ (matpotatis, utsädespotatis m.m.) och i förekommande fall utsädeskategori.
 - Om det föreligger risk för smitta i potatis från eller i en annan medlemsstat (andra medlemsstater) skall den medlemsstat i vilken förekomst har bekräftats genast ge den berörda medlemsstaten eller de berörda medlemsstaterna de upplysningar som krävs för att iakttas artikel 5.3, såsom
 - potatispartiets sortnamn,
 - exportörens respektive mottagarens namn och adress,
 - potatispartiets leveransdatum,

- storleken på det potatisparti som levereras,
- om så är lämpligt kopia av växtpasset eller åtminstone växtpassnumret, och om så är lämpligt odlarens eller handlarens registreringsnummer och en kopia av leveransbeskedet.

När denna information har tillhandahållits skall kommissionen genast underrättas om detta.

- Anmälan skall avges efter det att alla undersökningar har avslutats, och varje undersökning skall innehålla
 - det datum då smittan bekräftades,
 - en kort beskrivning av den undersökning som gjorts för att identifiera källa och möjlig spridning av smittan, samt på vilken nivå provtagningen har skett,
 - information om smittans identifierade eller misstänkt källa (misstänkta källor),
 - detaljerade uppgifter om den angivna smittans omfattning, inklusive antalet produktionsställen och antalet partier med uppgifter om sort och, i fall av utsädespotatis, kategori,
 - detaljerade uppgifter om det område som har avgränsats, inklusive det antal produktionsplatser som inte har förklarats smittade men inkluderats i området.
 - annan information som bekräftar förekomsten (förekomsterna) av smitta och som kommissionen kan kräva.

—

BILAGA IV

1. De officiellt övervakade åtgärder som avses i artikel 7.1 skall vara någon av följande:
 - Användning som djurfoder efter värmebehandling så att det inte finns någon risk för att skadegöraren har överlevt.
 - Bortskaffande på en officiellt godkänd specialiserad upplagsplats för avfall där det inte finns någon identifierbar risk för att patogenen sprids till omgivningen, t.ex. genom läckage till jordbruksmark.
 - Förbränning.
 - Användning för industriell bearbetning genom direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning med officiellt godkända anordningar för avfallshantering för vilken det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas, och med ett system för rengöring och desinfektion av åtminstone avgående fordon.
 - Andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. Dessa åtgärder skall anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.

Allt kvarvarande avfall som berörs av eller har uppkommit på grund av ovannämnda åtgärder skall bortskaffas genom officiellt godkända metoder i överensstämmelse med bilaga V till detta direktiv.

2. För att under tillsyn av de berörda medlemsstaternas ansvariga officiella organ använda eller bortförskaffa de knölar eller plantor som har förklarats som troligen smittade enligt artikel 5.1 b och som avses i artikel 7.2, med lämplig kommunikation mellan ansvariga officiella organ för att alltid säkerställa sådan tillsyn och godkännande av ansvariga officiella organ i den medlemsstat där potatisen skall förpackas eller bearbetas med hänsyn till de anordningar för avfallshantering som avses i första och andra strecksatsen, är något av följande sätt lämpliga:
 - Användning som matpotatis avsedd för konsumtion och packad på platser med lämpliga anordningar för avfallshantering, klar för direkt leverans och användning utan ompaketering. Potatisar avsedda för sättnings får behandlas på samma plats endast om detta sker separat eller efter rengöring och desinfektion.
 - Användning som industripotatis, och avsedd för direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning som har lämpliga anordningar för avfallshantering och ett system för rengöring och desinfektion av åtminstone avgående fordon.
 - Annan användning eller annat bortförskaffande, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids och under förutsättning att nämnda ansvariga officiella organ lämnat sitt tillstånd.
3. Lämpliga metoder för att rengöra och desinficera de föremål som avses i artikel 7.3 skall vara de för vilka det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. De skall användas under övervakning av medlemsstaternas ansvariga officiella organ.

4. Den serie åtgärder som medlemsstaterna skall vidta inom det avgränsade område som upprättas i enlighet med artikel 5.1 c och som avses i artikel 7.4 skall inkludera följande:

- 4.1. På produktionsplatser som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a:

- a) På ett fält som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a, gäller antingen att
- i) — under åtminstone de tre odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat
 - skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren,
 - och
 - får inga knölar, plantor eller frön av potatis, eller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, eller grödor som medför en identifierad risk för att skadegöraren kommer att överleva eller spridas, sättas, planteras eller sås,
 - under den första växtsäsongen efter den period som specificeras i föregående strecksats, och på villkor att fältet har befunnits vara fritt från plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering skall endast odling av annan potatis än utsädespotatis tillåtas, och de skördade knölarerna skall testas enligt det förfarande som anges i bilaga I,
 - under den växtsäsong som följer på den som avses i föregående strecksats och efter en lämplig växtföljds cykel, som skall omfatta minst två år om det gäller odling av utsädespotatis, får det sättas potatis avsedd för produktion av utsädespotatis eller annan potatis, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1, eller
- ii) — under de fyra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat
- skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren,
 - och
 - skall fältet antingen läggas i och bibehållas som hel träda eller som permanent betesmark som slås ofta eller som betas intensivt,
 - under den första växtsäsongen efter den period som specificeras i föregående strecksats, och på villkor att fältet har befunnits vara fritt från plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering, skall odling av utsädespotatis eller annan potatis tillåtas, och de skördade knölarerna skall testas enligt det förfarande som anges i bilaga I.
- b) På alla andra fält tillhörande den smittade produktionsplatsen, och på villkor att de ansvariga officiella organen har förvissat sig om att risken för plantor från övervintrande potatis och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren har undanröjts gäller att
- under det odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat skall antingen inga knölar, plantor eller frön av potatis, och inte heller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, sättas, planteras eller sås, eller
 - skall endast certifierad utsädespotatis som är avsedd för produktion av annan potatis än utsädespotatis odlas,
 - under det andra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat, får endast certifierat utsäde eller utsädespotatis som genomgått officiella tester avseende ljus ringröta och som odlats under officiell kontroll på andra produktionsställen än de som anges i 4.1 planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,
 - under åtminstone det tredje odlingsår som följer på det år då fältet förklarades angripet får endast certifierad utsädespotatis eller utsädespotatis som odlats under officiell kontroll och kommer från certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,

- under vart och ett av de odlingsår som avses i de föregående strecksatserna skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren om en sådana konstaterats, och i varje potatisfält skall officiella tester av den skördade potatisen från varje potatisfält göras i enlighet med förfarandena i bilaga I.
- c) Omedelbart efter det att produktionsplatsen har förklarats för smittad enligt artikel 5.1 a och efter det första därpå följande odlingsåret skall alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts vid potatisproduktionen rengöras och desinfekteras på lämpligt sätt med lämpliga metoder enligt punkt 3.
- d) I en enhet med skyddad växtproduktion där det är möjligt att fullständigt byta ut odlingssubstratet
 - får knölar, plantor eller frön sättas, planteras eller sås endast om produktionsenheten har underkastats officiellt övervakade åtgärder för att utrota skadegöraren och avlägsna allt material från värdväxter, inklusive åtminstone ett totalt byte av odlingssubstrat och rengöring och desinfektion av produktionsenheten och all utrustning, och därefter av de ansvariga officiella organen har godkänts för potatisproduktion,och
 - skall potatisproduktionen komma från certifierad utsädespotatis eller från miniknölar eller mikroplantor som härstammar från undersökta källor.

4.2. Utan att det påverkar tillämpningen av punkt 4.1, skall medlemsstaterna inom det avgränsade området

- a) omedelbart efter det att fältet förklarades smittat se till att alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts vid potatisproduktionen rengörs och desinfekteras på lämpligt sätt och med lämpliga metoder enligt punkt 3,
- b) omedelbart, och åtminstone under tre vegetationsperioder efter det att området har förklarats smittat
 - säkerställa övervakning genom sina ansvariga officiella organ av platser där potatisknölar odlas, lagras eller hanteras, och av företag som bedriver entreprenadverksamhet inom potatissektorn,
 - kräva att endast certifierat utsäde eller utsäde som odlats under officiell kontroll för alla potatisgrödor inom det området planteras, samt att utsädespotatis som har odlats på produktionsplatser som har fastställts som troligen angripna enligt artikel 5.1 b, testas efter skörden,
 - kräva att skördade partier av utsädespotatis från alla produktionsplatser inom det avgränsade området hanteras skilt från potatis avsedd för annat ändamål, eller att det införs ett system för rengöring och desinfektion mellan hanteringen av partier av utsädespotatis och partier av potatis avsedd för annat ändamål,
 - genomföra en officiell undersökning i enlighet med artikel 2.1,
- c) upprätta ett program för att vid behov byta ut alla partier av utsädespotatis under en lämplig period.

BILAGA V

De officiellt godkända metoder för avfallshantering som anges i första stycket i bilaga IV skall uppfylla kraven i följande bestämmelser så att varje identifierbar risk för spridning av skadegöraren undanröjs:

- i) Potatisavfall (även kasserad potatis och skal) och allt annat fast avfall som kommit i kontakt med potatisen (även jord, stenar och annat skräp) skall bortskaffas på något av följande sätt:
- Bortskaffande på officiellt godkänd för ändamålet avsedd upplagsplats för avfall där det inte finns någon identifierbar risk för att patogenen sprids till omgivningen, t.ex. genom läckage till jordbruksmark. Avfallet skall föras direkt till platsen under så säkra omständigheter att det inte finns någon risk för att någon del av avfallet förloras.
 - Förbränning.
 - Andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. Dessa åtgärder skall anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.
- ii) Flytande avfall: Innan det bortskaffas skall flytande avfall som innehåller uppslammade fasta ämnen genomgå filtrering eller sedimentering så att dessa fasta ämnen tas bort. Dessa ämnen skall bortförskaffas på det sätt som föreskrivs i punkt i.

Därefter skall det flytande avfallet bortskaffas på något av följande sätt:

- Upphettning av hela volymen till minst 60 °C under minst 30 minuter. Därefter bortskaffande.
- Bortskaffande på annat sätt, förutsatt att det sker efter officiellt godkännande och under officiell kontroll så att det inte finns någon identifierbar risk för att avfallet kan komma i kontakt med jordbruksmark. Uppgifterna om detta skall meddelas de andra medlemsstaterna och kommissionen.

De alternativ som anges i denna bilaga gäller även avfall med anknytning till hantering, bortskaffande och bearbetning av smittade partier.