

KOMMISSIONENS DIREKTIV 2006/63/EG

av den 14 juli 2006

om ändring av bilagorna II–VII till rådets direktiv 98/57/EG om bekämpning av *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *m.fl.*

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR ANTAGIT
DETTA DIREKTIV

med beaktande av fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 98/57/EG av den 20 juli 1998 ⁽¹⁾ om bekämpning av *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *m.fl.*, särskilt artikel 11, och

av följande skäl:

- (1) En av de allvarigaste skadegörarna på potatis och tomater är *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *m.fl.*, den sjukdomsalstrande organism som orsakar mörk ringröta på potatis och bakteriologisk vissnesjuka hos potatis och tomater (nedan kallad "skadegöraren").
- (2) Denna skadegörare förekommer fortfarande i vissa delar av gemenskapen.
- (3) I direktiv 98/57/EG 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 vissa av bilagorna till direktiv 98/57/EG.
- (6) När det gäller förfarandena för upptäckt och identifiering har FISH (*fluorescent in-situ hybridization*), en modern detektionsmetod, tagits med. Förbättringar av metoden polymerkedjereaktion (PCR), liksom förbättringar av olika

tekniska beståndsdelar i det nuvarande förfarandet för upptäckt och identifiering av skadegöraren i andra värdväxter än potatis och i vatten och jord, har också 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 behövs för att fastställa omfattningen hos den troliga nedsmittningen, 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. Dessutom har vissa bestämmelser rörande tomater tagits med för att tomatplantans betydelse som värdväxt för skadegöraren i högre grad skall beaktas.
- (8) De åtgärder som föreskrivs i detta direktiv är förenliga med yttrandet från ständiga kommittén för växtskydd.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Bilagorna II–VII till direktiv 98/57/EG skall ersättas med motsvarande texter som utgör bilaga 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 235, 21.8.1998, s. 1.

2. Medlemsstaterna skall omgående till kommissionen överlämna texterna 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 14 juli 2006.

På kommissionens vägnar
Markos KYPRIANOU
Ledamot av kommission

BILAGA

"BILAGA II

TESTPROGRAM FÖR ATT DIAGNOSTISERA, UPPTÄCKA OCH IDENTIFIERA RALSTONIA SOLANACEARUM (SMITH) YABUCHI M. FL.

Testprogrammets omfattning

I det framtagna programmet beskrivs de olika förfarandena för att:

- i) diagnostisera mörk ringröta i potatisknölar och bakteriologisk vissnesjuka på potatis- och tomatplantor och vissa andra värdväxter,
- ii) upptäcka *Ralstonia solanacearum* i prover av potatisknölar, potatis- och tomatplantor och andra värdväxter, vatten och jord,
- iii) identifiera *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

INNEHÅLL

	Sida
Allmänna principer	40
Avsnitt I: Tillämpning av testprogrammet	40
1. Program för diagnos på brun ringröta och bakteriologisk vissnesjuka (<i>R. solanacearum</i>) i potatisknölar och i potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter med symtom på brun ringröta eller bakteriologisk vissnesjuka.	40
2. Program för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i prover av asymtomatiska potatisknölar	43
3. Program för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i prover av asymtomatiska potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter.	46
Avsnitt II: Detaljerade metoder för att upptäcka <i>Ralstonia solanacearum</i> i potatisknölar och i potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter med symtom på brun ringröta eller bakteriologisk vissnesjuka	48
1. Symtom	48
2. Snabbscreeningstest	48
3. Isoleringsförfarande	49
4. Identifieringstest för <i>R. solanacearum</i>	49
Avsnitt III: 1. Detaljerade metoder för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i prover av asymtomatiska potatisknölar	49
1.1 Preparering av prover	49
1.2 Testning	51
2. Detaljerade metoder för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i prover av asymtomatiska potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter	51
2.1 Preparering av prover	51
2.2 Testning	52
Avsnitt IV: 1. Program för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i vatten	53
2. Metoder för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i vatten	55
2.1 Preparering av prover	55
2.2 Testning	55
Avsnitt V: 1. Program för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i jord	56
2. Metoder för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i> i jord	58
2.1 Preparering av prover	58
2.2 Testning	58
Avsnitt VI: Optimerade protokoll för att upptäcka och identifiera <i>R. solanacearum</i>	58

	Sida
A. Test för diagnos och upptäckt	58
1. Kärldrömningstest	58
2. Upptäckt av poly- β -hydroxibutyratkorn (PHB)	58
3. Serumagglutinationstest	59
4. Selektiv isolering	60
4.1 Odling på selektivt medium	60
4.2 Anrikningsförfarande	60
5. Immunofluorescenstest (IF-test)	61
6. Polymeraskedjereaktionstest (PCR-test)	64
6.1 Metoder för rening av DNA	65
6.1 a)Metod enligt Pastrik (2000)	65
6.1 b)Andra metoder	65
6.2 PCR	66
6.3 Analys av PCR-produkten	66
7. Fluorescerande in situ-hybridisering (FISH-test)	67
8. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA-test)	69
8 a) Indirekt ELISA	69
8 b) DASI (Double-Antibody Sandwich Indirect) ELISA	70
9. Biotest	71
B. Identifieringstest	72
1. Nutrient- och enzymatiskt identifieringstest	72
2. IF-test	72
3. ELISA-test	73
4. PCR-test	73
5. FISH-test	73
6. Fettsyraprofilering (FAP)	73
7. Metoder för stamkaraktärisering	73
7.1 Biovarbestämning	73
7.2 Genomiskt fingeravtryck	74
7.3 PCR-metoder	74
C. Verifieringstest	74
Tillägg 1 Laboratorier som utför optimering och validering av protokoll	76
Tillägg 2 Medier för isolering och odling av <i>R. solanacearum</i>	77
Tillägg 3 A) Standardiserade kontrollmaterial tillgängliga i handeln	79
B) Preparering av kontroller	80
Tillägg 4 Buffertar för testförfaranden	82
Tillägg 5 Bestämning av kontamineringsnivå i IF- och FISH-tester	85
Tillägg 6 Validerade PCR-protokoll och PCR-reagens	86
Tillägg 7 Validerade reagens för FISH-test	91
Tillägg 8 Odlingsbetingelser för tomater och äggplantor	93
Referenser	94

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 *R. solanacearum* 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 *R. solanacearum* vid de fastställda tröskelvärdena för 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 98/57/EG 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-test, PCR/FISH, selektiv isolering) är positivt, skall detta bekräftas genom ett andra screeningtest, baserat på en annan biologisk princip.

Om det första screeningtestet är positivt, misstänks nedsmittning med *R. solanacearum* 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 nedsmittat med *R. solanacearum*.

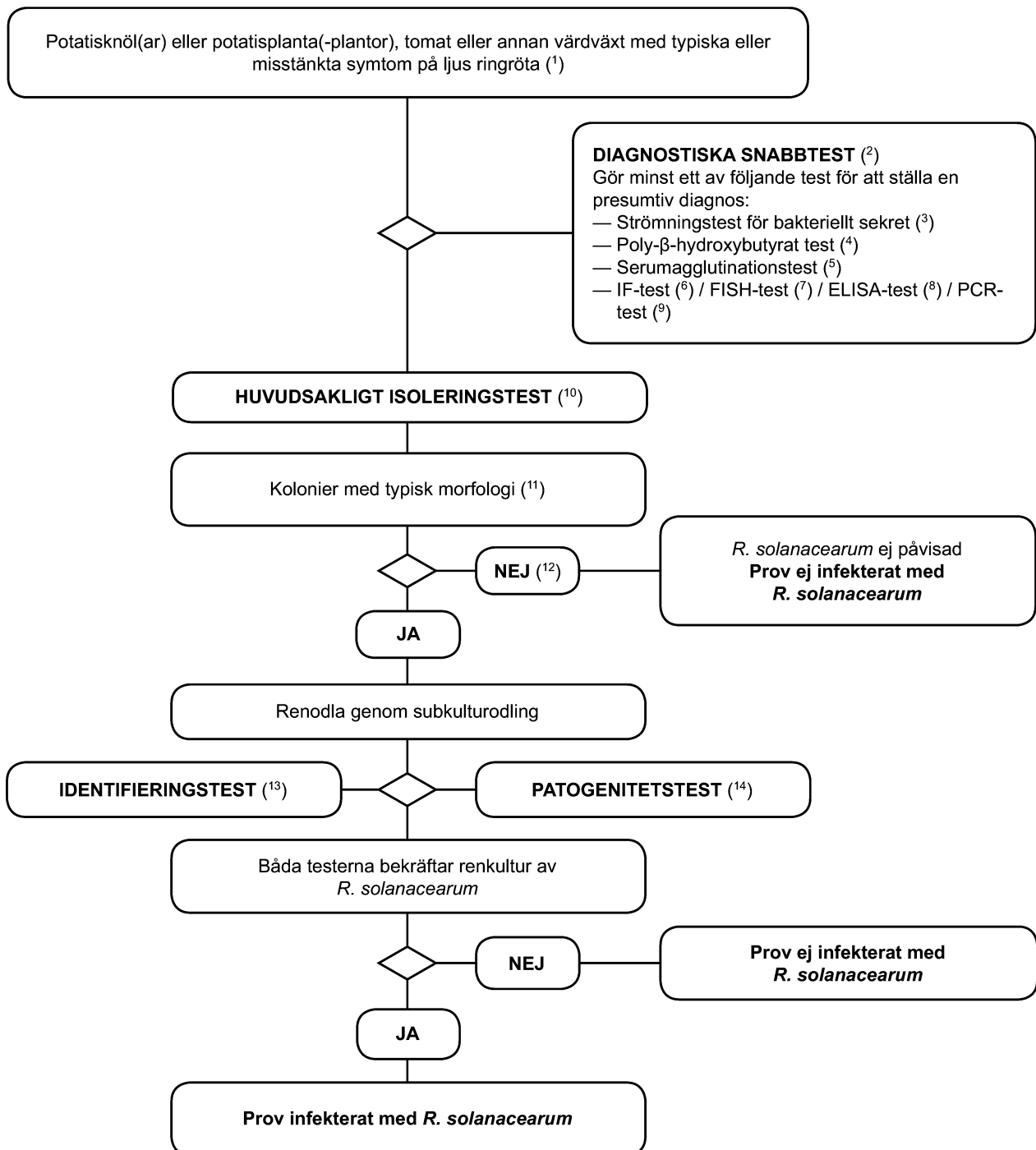
Bekräftad närvaro enligt artikel 5.1 i direktiv 98/57/EG innebär isolering och identifiering av en renkultur av *R. solanacearum* med bekräftad patogenitet.

AVSNITT I

TILLÄMPNING AV TESTPROGRAMMET

- 1. Program för diagnos på brun ringröta och bakteriologisk vissnesjuka (*Ralstonia solanacearum*) i potatisknölar och i potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter med symtom på brun ringröta eller bakteriologisk vissnesjuka.**

Testförfarandet är avsedd för potatisknölar och potatisplantor som uppvisar typiska eller misstänkta symtom på mörk ringröta eller vissnesjuka. Den omfattar ett snabbscreeningstest, isolering av den sjukdomsalstrande organismen från infekterad kärnvävnad på ett (selektivt) medium och, vid positivt utslag, identifiering av kulturen som *Ralstonia solanacearum*.

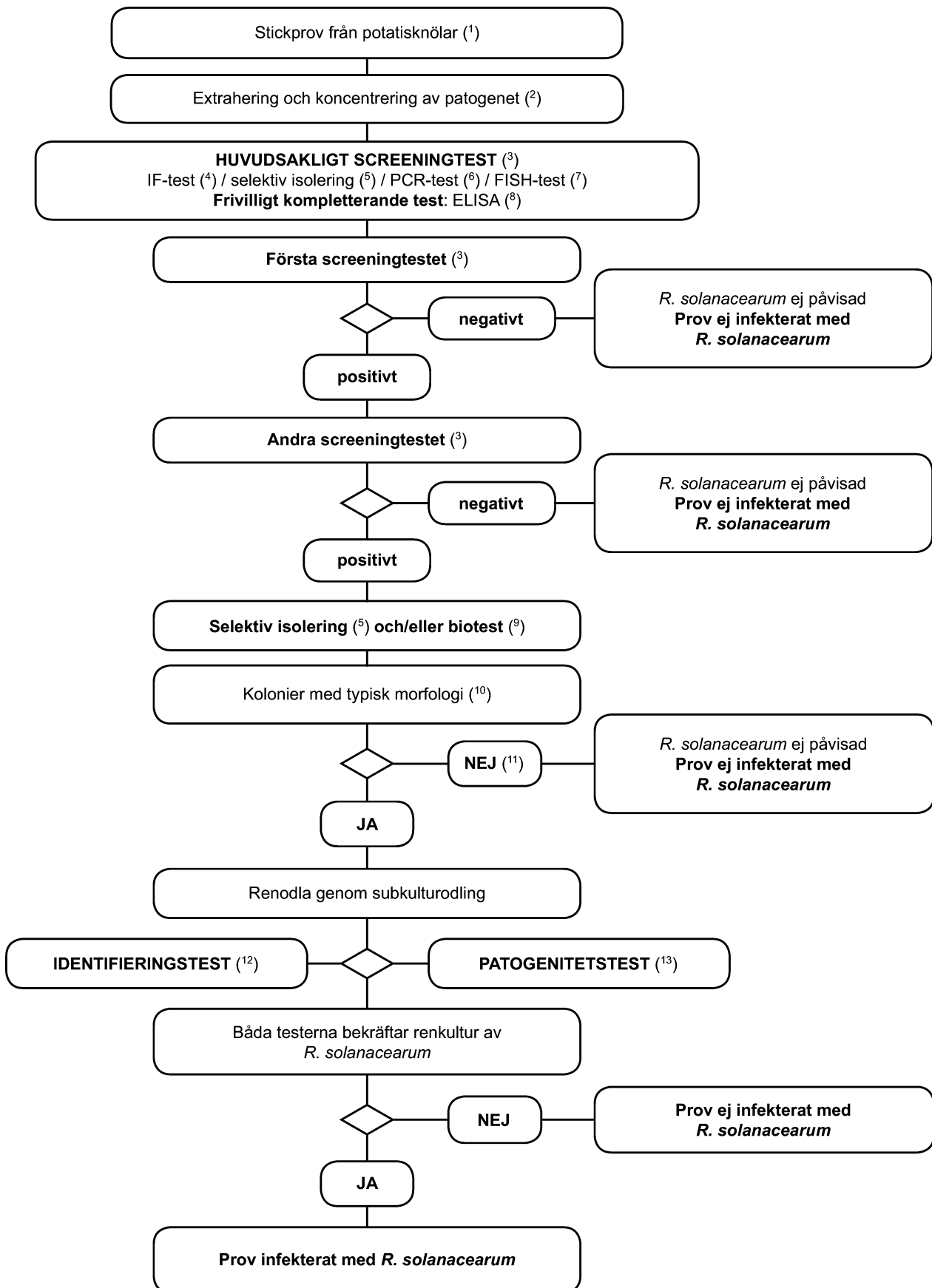


- (¹) Symtomen beskrivs i avsnitt II.1.
- (²) Snabbscreeningstest underlättar presumtiv diagnos men är inte nödvändiga. Ett negativt resultat utgör inte alltid en garanti för att patogenet inte förekommer.
- (³) Strömningstest för bakteriellt sekret från kärplingvävnad från stjälkar beskrivs i avsnitt VI.A.1.
- (⁴) Test för att påvisa poly- β -hydroxibutyratkorn i bakterieceller beskrivs i avsnitt VI.A.2.
- (⁵) Serumagglutinationstest på bakteriellt sekret eller extrakt från symtomatisk vävnad beskrivs i avsnitt VI.A.3.
- (⁶) IF-test på bakteriellt sekret suspenderat i vatten eller extrakt från symtomatisk vävnad beskrivs i avsnitt VI.A.5.
- (⁷) FISH-test på bakteriellt sekret suspenderat i vatten eller extrakt från symtomatisk vävnad beskrivs i avsnitt VI.A.7.
- (⁸) ELISA-test på bakteriellt sekret suspenderat i vatten eller extrakt från symtomatisk vävnad beskrivs i avsnitt VI.A.8.
- (⁹) PCR-test på bakteriellt sekret suspenderat i vatten eller extrakt från symtomatisk vävnad beskrivs i avsnitt VI.A.6.
- (¹⁰) Patogenet isoleras vanligtvis utan svårighet från symtomatiskt växtmaterial genom plattspridning från spädningsserie (avsnitt II.3).
- (¹¹) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt II.3.d.
- (¹²) Odling i kultur från långt framskridna infektionsstadier kan misslyckas på grund av konkurrens från eller kvävning av saprofytiska bakterier. Om sjukdomssymtomen är typiska men isoleringstestet negativt måste isoleringen upprepas, helst genom odling på selektivt medium.
- (¹³) En renkultur av förmodade isolat av *R. solanacearum* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt VI.B. Karakterisering på underartnivå är valfri men rekommenderas för varje nytt fall.
- (¹⁴) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt VI.C.

2. Program för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i prover av asymtomatiska potatisknölar*Princip:*

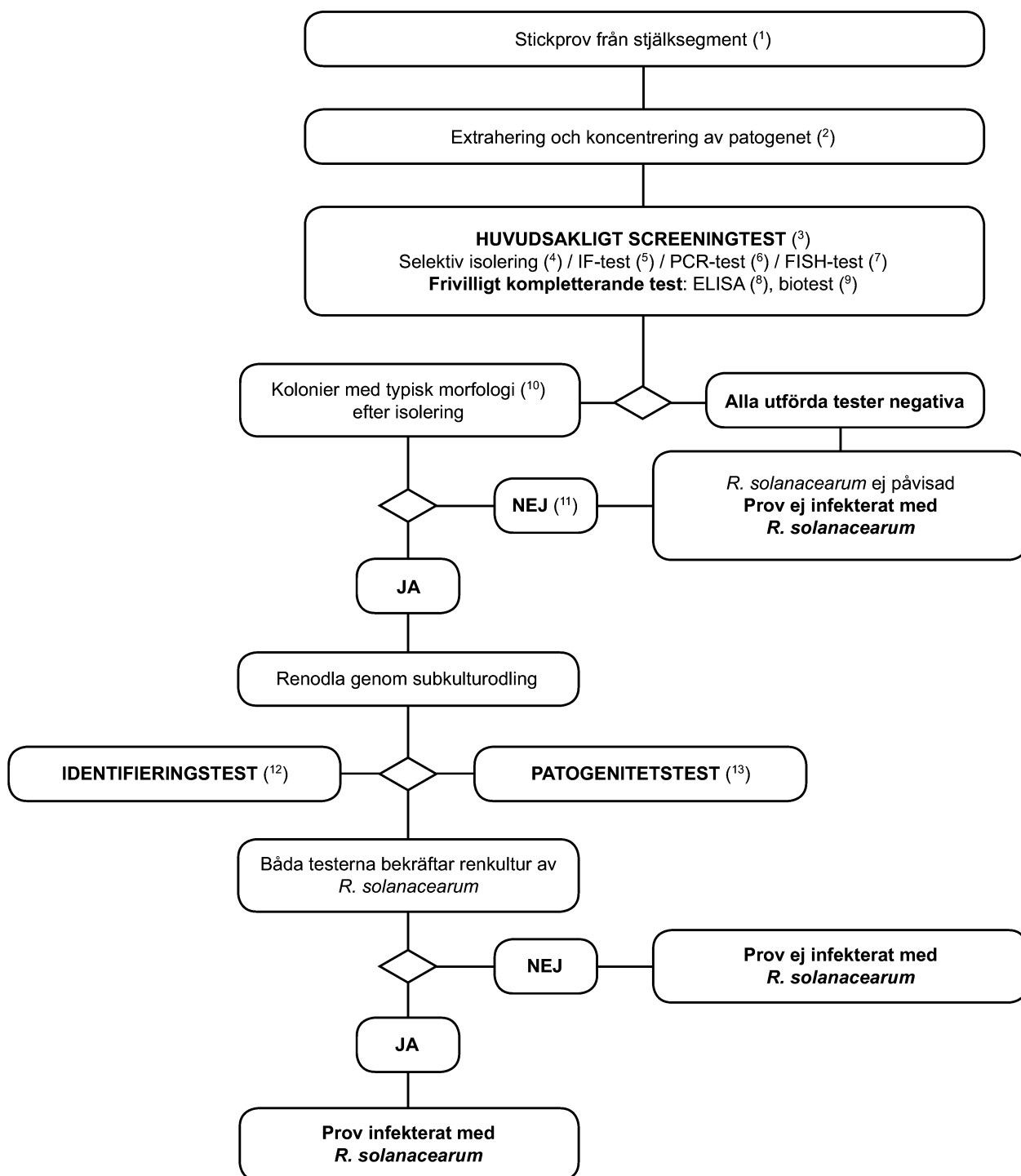
Syftet med testförfarandet är att upptäcka latenta infektioner i potatisknölar. Minst två positiva screeningtest³ baserade på olika biologiska principer skall verifieras genom isolering av patogenet, vid isolering av typiska kolonier följt av identifiering av en renkultur som *R. solanacearum*. Endast ett positivt screeningtest är inte tillräckligt för att provet skall kunna betraktas som misstänkt.

Screening- och isoleringstesterna skall möjliggöra en upptäckt av 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 koncentrerings av patogen beskrivs i avsnitt III.1.1.
- (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) IF-test beskrivs i avsnitt VI.A.5.
- (⁵) Selektivt isoleringstest beskrivs i avsnitt VI.A.4.
- (⁶) PCR-test beskrivs i avsnitt VI.A.6.
- (⁷) FISH-test beskrivs i avsnitt VI.A.7.
- (⁸) ELISA-test beskrivs i avsnitt VI.A.8.
- (⁹) Biotest beskrivs i avsnitt VI.A.9.
- (¹⁰) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt II.3.d.
- (¹¹) 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 kärtringvävnad nära naveländan från genomsurna knölar från samma prov och, vid behov, gör tester på ytterligare prover.
- (¹²) En renkultur av förmodade isolat av *R. solanacearum* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt VI.B.
- (¹³) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt VI.C.

3. Program för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i prover av asymtomatiska potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter



- (¹) Rekommenderade provstorlekar, se avsnitt III.2.1.
- (²) Metoder för extrahering och koncentrerering av patogen beskrivs i avsnitt III.2.1.
- (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) Selektivt isoleringstest beskrivs i avsnitt VI.A.4.
- (⁵) IF-test beskrivs i avsnitt VI.A.5.
- (⁶) PCR-test beskrivs i avsnitt VI.A.6.
- (⁷) FISH-test beskrivs i avsnitt VI.A.7.
- (⁸) ELISA-test beskrivs i avsnitt VI.A.8.
- (⁹) Biotest beskrivs i avsnitt VI.A.9.
- (¹⁰) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt II.3.d.
- (¹¹) Odling i kultur eller biotester kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om ett positivt resultat erhålls vid screeningstesterna men isoleringstesterna är negativa, upprepa isoleringstesterna.
- (¹²) Renkulturer av förmodade isolat av *R. solanacearum* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt VI.B.
- (¹³) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt VI.C.

AVSNITT II

DETALJERADE METODER FÖR ATT UPPTÄCKA RALSTONIA SOLANACEARUM I POTATISKNÖLAR OCH I POTATISPLANTOR, TOMATPLANTOR ELLER ANDRA VÄRDVÄXTER MED SYMTOM PÅ BRUN RINGRÖTA ELLER BAKTERIOLOGISK VISSNESJUKA

1. **Symtom** (se webbplats: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>)

- 1.1 Symtom på potatis

Potatisplantan. Det tidiga skedet av infektionen på fältet känns igen på att bladen vissnar mot toppen av plantan vid höga dagstemperaturer, men återhämtar sig under natten. På de tidiga stadierna av vissnande är bladen fortfarande gröna, men senare gulnar de för att så småningom bli brunt nekrokiska. Även epinasti uppträder. Vissningen hos skottet eller hela plantan blir snabbt bestående och leder till att plantan faller samman och dör. Kärllvävnaden i stjälkar skurna på tvären från vissnade plantor är vanligen bruna, och ett mjölkaktigt bakteriellt sekret avsöndras från den skurna ytan eller kan pressas ut. När en skuren stjälek ställs i vatten strömmar trådar av slem ut från kärllknippena.

Potatisknölen. Potatisknölna måste skäras på tvären nära naveländan (stolonändan) eller på längden över stolonändan. I det tidiga skedet av infektionen syns en glasaktig gul till ljusbrun missfärgning av kärllringen, från vilken ett blekgult krämigt bakteriellt sekret spontant kommer fram efter några minuter. Senare blir kärllmissfärgningen tydligare brun, och nekrosen kan sprida sig till parenkymvävnaden. Vid långt framskridna skeden bryter infektionen fram från naveländan och ögonen, från vilka bakterieslem utsöndras så att jordpartiklar häftar vid. Rödbruna lätt insjunkna lesioner i skalet kan uppträda på skalet på grund av kollaps av kärllringvävnader inuti knölen. Sekundära utvecklingsstadier av svamp- och bakteriebetingad blötröta är vanligt förekommande i långt framskridna stadier av sjukdomen.

- 1.2 Symtom på tomater

Tomatplantan. Det första synliga symtomet är att de yngsta bladen blir sladdriga. Under gynnsamma miljöförhållanden för patogenet (jordtemperatur cirka 25 °C, mättad fuktighet) följer epinasti och vissning av ena sidan eller hela plantan inom några få dagar, vilket leder till att hela plantan faller samman. Under mindre gynnsamma förhållanden (jordtemperatur under 21 °C) inträffar vissning mindre ofta, men ett stort antal extra rottrådar kan utvecklas på stjälken. Vattendränkta strimmar som löper från stjälkens bas kan observeras, vilket är tecken på nekros i kärllsystemet. När stjälken genomskärs utsöndrar missfärgade bruna kärllvävnader vitt eller gulaktigt bakteriellt sekret.

- 1.3 Symtom på andra värdväxter

Solanum dulcamara och *S. nigrum.* Under naturliga förhållanden uppträder vissningsymtom sällan hos detta ogräs som är värdväxt, om inte jordtemperaturen överskrider 25 °C eller om inokulationen är omfattande (t.ex. i fallet *S. nigrum*, om den växer i anslutning till potatis- eller tomatplantor som dött). När vissnande sker uppträder samma symtom som för tomater. Icke-vissnande plantor av *S. dulcamara* som växer med stjälkarna och rötterna i vatten kan uppvisa inre ljusbrun missfärgning hos kärllvävnaderna i ett tvärsnitt av stjälkbasen eller av de stjälkdelar som befinner sig under vatten. Bakterieslem kan utsöndras från avskurna kärllvävnader eller bilda trådar av slem om den skurna stjälken ställs vertikalt i vatten, även i frånvaro av vissningsymtom.

2. **Snabbscreeningstest**

Snabbscreeningstest underlättar presumtiv diagnos men är inte nödvändiga. Använd ett eller flera av följande validerade test:

- 2.1 Kärllströmningstest

(Se avsnitt VI.A.1.)

- 2.2 Upptäckt av poly- β -hydroxybutyratkorn (PHB)

Karakteristiska PHB-korn i celler av *R. solanacearum* kan göras synliga genom att färga värmefixerade utstrykningspreparat av bakteriellt sekret från infekterad vävnad på ett objektglas med Nilblått A eller Sudansvart B (se avsnitt VI.A.2.).

2.3 Serumagglutinationstest

(Se avsnitt VI.A.3.)

2.4 Andra test

Andra lämpliga snabbscreeningstest omfattar IF-test (se avsnitt VI.A.5.), FISH-test (se avsnitt VI.A.7.), ELISA-test (se avsnitt VI.A.8.) och PCR-test (se avsnitt VI.A.6.).

3. Isoleringsförfarande

- a) Avlägsna sekret eller partier med missfärgad vävnad från knölens kärtring på potatis eller från stjälkens kärsträngar på potatis, tomat eller andra vissnande värdväxter. Suspendera i en mindre volym av sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert (tillägg 4) och låt stå i 5–10 minuter.
- b) Bered en serie av decimala utspädningar av suspensionen.
- c) För över 50–100 µl av suspensionen och utspädningarna till ett vanligt näringsmedium (NA, YPGA eller SPA; se tillägg 2) och/eller till Kelmans tetrazolium medium (tillägg 2) och/eller till ett validerat selektivt substrat (t.ex. SMSA; se tillägg 2). Utsprid eller utstryk med lämplig plattspridning från spädningsserie. Bered, om det anses lämpligt, separata plattor med en utspädd cellsuspension av *R. solanacearum* biovar 2 som positiv kontroll.
- d) Inkubera plattorna under 2–6 dagar vid 28 °C.
 - På det allmänna näringsmediet utvecklar virulenta isolat av *R. solanacearum* pärl-/kräm vita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier med karakteristiska virvlar i mitten. Icke virulenta former av *R. solanacearum* utvecklar små runda icke-flödiga smörlika kolonier som är helt kräm vita.
 - På Kelmans tetrazolium- och SMSA-medier har virvlarna blodröd färg. Icke virulenta former av *R. solanacearum* utvecklar små runda icke-flödiga smörlika kolonier som är fullständigt djupröda.

4. Identifieringstest för *R. solanacearum*

Test för att bekräfta identiteten hos förmodade isolat av *R. solanacearum* behandlas i avsnitt VI.B.

AVSNITT III

1. Detaljerade metoder för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i prover av asymtomatiska potatisknölar

1.1 Preparering av prover

Observera:

- 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 inhibering 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 ljus ringröta hos potatis, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Frivillig förbehandling före provpreparering:

- a) Inkubation av prover vid 25–30 °C under upp till 2 veckor före testning för att främja förökning av alla populationer av *R. solanacearum*.
- b) Tvätta knölarne. Använd lämpliga desinfektionsmedel (vid PCR-test klorföreningar för att avlägsna patogen DNA) och tvättmedel mellan varje stickprov. Lufttorka knölarne. Detta rengöringsförfarande är användbart (men inte obligatoriskt) i synnerhet vid jordiga prover och om ett PCR-test eller ett direkt isoleringstest skall göras.

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

Anmärkning: Lagg undan alla (ruttnande) knölar med misstänkta symtom på brunröta och testa dem separat.

Om misstänkta symtom på mörk ringröta iakttas vid avlägsnandet av naveländan bör en okulärinspektion av denna knöl ske, och knölen bör skäras av nära naveländan. Alla skurna knölar med misstänkta symtom bör förvaras minst två dagar i rumstemperatur för att möjliggöra förkorkning och därefter lagras nedkylda (4–10 °C) under lämpliga karantänförhållanden. Alla knölar, inklusive dem med misstänkta symtom, bör förvaras i enlighet med bilaga III.

- 1.1.2 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.

Behandla naveländarna enligt något av följande förfaranden:

- a) Täck naveländarna genom att tillsätta en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml.) extraktionsbuffert (tillägg 4) och skaka på en rotationssskak (50–100 r/min) under 4 timmar vid en temperatur lägre än 24 °C eller under 16–24 timmar nedkylt.
- b) Homogenisera naveländarna i en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml) extraktionsbuffert (tillägg 4), 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 för att undvika att det 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 vid PCR-test.

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

- 1.1.4 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 kasta bort supernatanten utan att störa pelleten.

- 1.1.5 Återsuspendera pelleten i 1,5 ml pelletbuffert (tillägg 4). Använd 500 µl för att testa för *R. solanacearum*, 500 µl för *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* och 500 µl i referenssyfte. Tillsätt steril glycerol till en slutkoncentration av 10–25 % (v/v) till 500 µl av referensportionen och till den återstående testportionen. Skaka och förvara vid –16 till –24 °C (veckor) eller vid –68 till –86 °C (månader). Förvara testportionerna 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 timmar.

- 1.1.6 Det är absolut nödvändigt att alla positiva kontroller och prover av *R. solanacearum* hanteras skilda från varandra för att nedsmittning skall undvikas. Detta gäller även för IF-glas och samtliga test.

1.2 Testning

Se flödesdiagram och beskrivningar av testerna och de optimerade protokollen i de berörda bilagorna enligt följande:

Selektiv isolering (se avsnitt VI.A.4).

IF-test (se avsnitt VI.A.5).

PCR-test (se avsnitt VI.A.6).

FISH-test (se avsnitt VI.A.7).

ELISA-test (se avsnitt VI.A.8).

Biotest (se avsnitt VI.A.9).

2. Detaljerade metoder för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i prover av asymtomatiska potatisplantor, tomatplantor eller andra värdväxter

2.1 Preparering av prover

Anmärkning: För upptäckt av latenta populationer *R. solanacearum* 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.

2.1.1 Samla 1–2 cm långa stjälksegment i en tillsluten steril behållare enligt följande provtagningsförfaranden:

Tomatplantor från plantskolor: Med en ren, desinficerad kniv eller sekator avlägsnas ett 1 cm långt segment av basen på varje stjälek strax ovanför markytan.

Tomatplantor odlade på fält eller i växthus: Med en ren, desinficerad kniv avlägsnas det lägsta sidoskottet från varje planta genom att detta skärs av strax ovanför leden till huvudstjälken. Avlägsna ett 1 cm långt segment från den nedersta delen från varje sidoskott.

Andra värdväxter: Med en ren, desinficerad kniv eller sekator avlägsnas ett 1 cm långt segment av basen på varje stjälek strax ovanför markytan. Från *S. dulcamara* eller andra värdväxter som växer i vatten avlägsnas 1–2 centimeter långa delar från undervattensstjälken eller revor (stolon) med vattenrötter.

Vid provtagning på en särskild plats rekommenderas ett statistiskt representativt prov av minst 10 plantor per provtagningsplats av varje ogräs som är potentiell värdväxt. Upptäckt av patogen är mest tillförlitligt under den sena vårsäsongen, samt sommar- och höstsäsongerna, även om naturliga infektioner kan upptäckas året runt hos den fleråriga *Solanum dulcamara* som växer i vattendrag. Kända värdväxter omfattar övervintrande potatisplantor (efterliggare), *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* och andra arter i familjen *Solanaceae*. Andra värdar är *Pelargonium* spp. och *Portulaca oleracea*. Vissa europeiska ogräsarter som potentiellt kan vara infekterade med biovar 2/Ras 3-populationer av *R. solanacearum* i rötterna och/eller rhizosfärer under särskilda miljöförhållanden omfattar *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* och *Urtica dioica*.

Anmärkning: Okulär besiktning för att påvisa inre symtom (färgning av vävnad eller bakteriellt sekret) kan göras på detta stadium. Lagg undan alla stjälksegment med symtom och testa dem separat (se avsnitt II).

2.1.2 Desinficera stjälksegmentet hastigt i 70-procentig etanol och torka omedelbart med mjukpapper. Behandla därefter stjälksegmenten enligt någon av följande metoder:

- Täck segmenten genom att tillsätta en tillräcklig mängd (ungefär 40 ml) extraktionsbuffert (tillägg 4) och skaka på en rotationsskak (50–100 r/min) under 4 timmar vid en temperatur under 24 °C eller under 16–24 timmar nedkylda.
- Behandla omedelbart segmenten genom att krossa dem i en kraftig påse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse eller Bioreba) i en lämplig mängd extraktionsbuffert (tillägg 4) 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.

2.1.3 Dekanter supernatanten efter det att blandningen fått stå och sjunka under 15 minuter.

2.1.4 Ytterligare klarande av extraheringen eller koncentrationen av bakteriedelen krävs vanligtvis inte men kan åstadkommas genom filtrering och/eller centrifugering enligt avsnitten III.1.1.3 till III.1.1.5.

- 2.1.5 Dela det outspädda 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- till 25-procentig (v/v) steril glycerol vid en temperatur av – 16 till – 24 °C (veckor) eller – 68 till – 86 °C (månader) för det fallet att ytterligare tester krävs.

2.2 Testning

Se flödesdiagram och beskrivningar av testerna och de optimerade protokollen i de berörda bilagorna enligt följande:

Selektiv isolering (se avsnitt VI.A.4).

IF-test (se avsnitt VI.A.5).

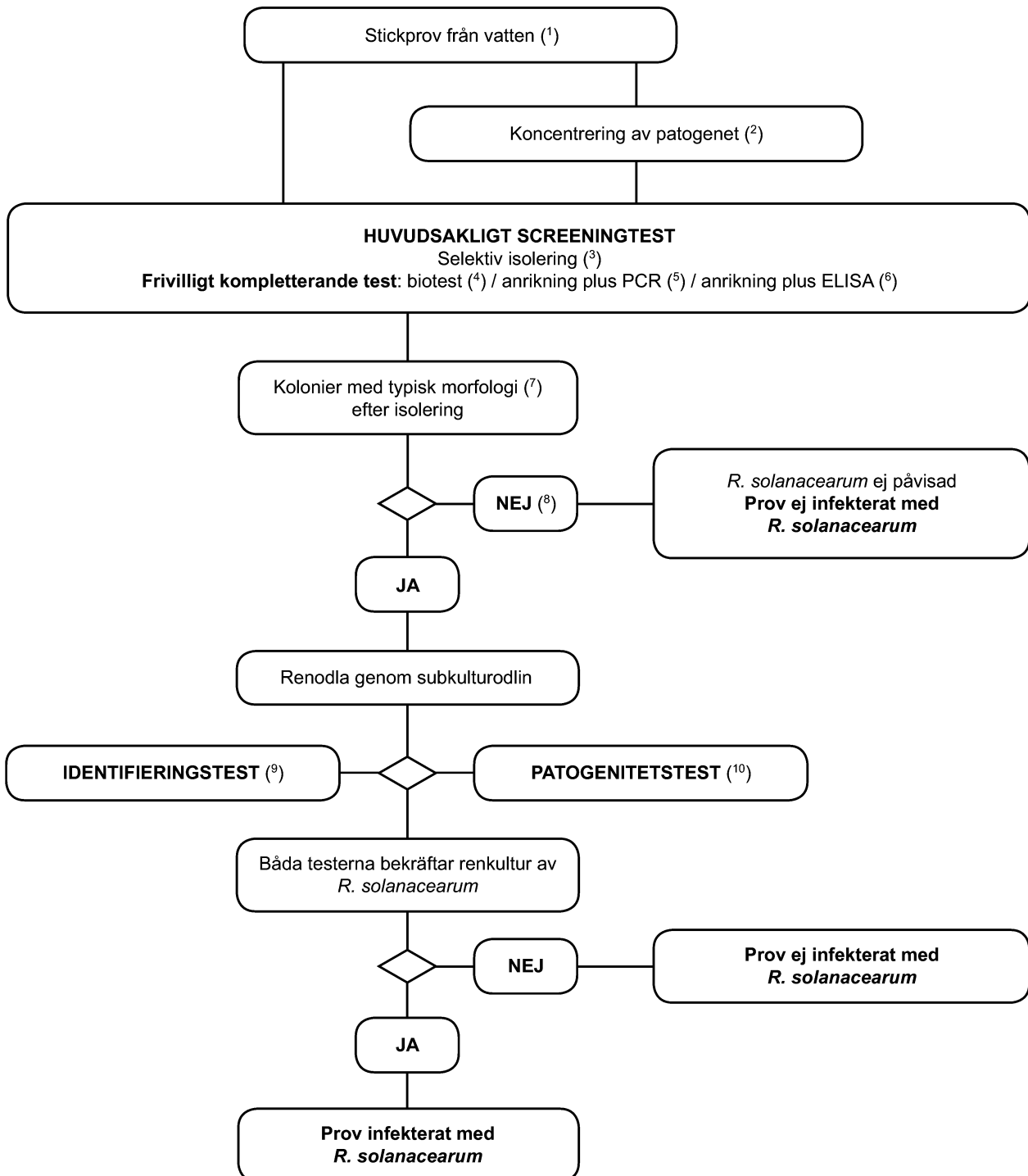
PCR-test (se avsnitt VI.A.6).

FISH-test (se avsnitt VI.A.7).

ELISA-test (se avsnitt VI.A.8).

Biotest (se avsnitt VI.A.9).

AVSNITT IV

1. Program för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i vatten

- (¹) Rekommenderade provtagningsförfaranden, se avsnitt IV.2.1.
- (²) Metoder för koncentrerings av patogen beskrivs i avsnitt IV.2.1. Koncentrerings ökar populationerna av både patogener och konkurrerande saprofytiska bakterier och rekommenderas endast om den inte medför inhibering av isolationstestet.
- (³) Selektivt isoleringstest beskrivs i avsnitt VI.A.4.
- (⁴) Biotest beskrivs i avsnitt VI.A.9.
- (⁵) Metoder för anrikning plus PCR beskrivs i avsnitten VI.A.4.2 och VI.A.6.
- (⁶) Metoder för anrikning plus ELISA beskrivs i avsnitten VI.A.4.2 och VI.A.8.
- (⁷) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt II.3.d.
- (⁸) Odling i kultur kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om stora populationer av saprofyter misstänks påverka isoleringens tillförlitlighet, repetera isolationstestet efter utspädning av provet i sterilt vatten.
- (⁹) Renkulturer av förmodade isolat av *R. solanacearum* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt VI.B.
- (¹⁰) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt VI.C.

2. Metoder för att upptäcka och identifiera *Ralstonia solanacearum* i vatten

Princip

Det validerade programmet för upptäckt som beskrivs i det här avsnittet är tillämpligt på upptäckt av patogen i prover av ytvatten och kan även tillämpas på testning av prover från process- eller avloppsvatten från verksamhet där potatis förädlas. Det är emellertid viktigt att påpeka att den förväntade detektionskänsligheten varierar beroende på substratet. Känsligheten hos isoleringstestet påverkas av populationerna av konkurrerande saprofytiska bakterier, som vanligtvis är mycket större i process- och avloppsvatten från verksamhet där potatis förädlas än i ytvatten. Programmet nedan är avsett att upptäcka ända ned till 10^3 celler per liter i ytvatten, men detektionskänsligheten vid process- eller avloppsvatten från anläggningar där potatis förädlas är troligen avsevärt lägre. Därför rekommenderas att testning av process- och avloppsvatten sker efter övrig rening (t.ex. sedimentering eller filtrering), då populationerna av saprofytiska bakterier minskar. Testprogrammets begränsningar i fråga om känslighet bör tas med i beräkningen vid bedömningen av tillförlitligheten hos alla eventuella negativa resultat. Det här programmet har med framgång använts i undersökningar för att påvisa närvaro eller frånvaro av patogenet i ytvatten, men dess begränsningar bör beaktas vid användning i liknande undersökningar av process- eller avloppsvatten från verksamhet där potatis förädlas.

2.1 Preparering av prover

Anmärkning:

- Upptäckt av of *R. solanacearum* i ytvatten är mest tillförlitlig under den sena vårsäsongen, samt sommar- och höstsäsongerna, när vattentemperaturerna överstiger 15 °C.
- Upprepade provtagningar vid olika tidpunkter under ovannämnda period och på bestämda provtagningsplatser ökar tillförlitligheten hos upptäckten genom att reducera inverkan av klimatvariationen.
- Beakta inverkan av kraftiga regnfall och vattendragens geografiska läge för att undvika alltför stora utspädningseffekter, som kan dölja närvaron av patogenet.
- Ta ytvattenproverna i närheten av värdväxterna om dessa förekommer.

2.1.1 På utvalda provtagningsplatser, samla vattenprover genom att fylla sterila engångsrör eller engångsflaskor om möjligt på ett djup av 30 cm och inom 2 m från strandkanten. Vid process- och avloppsvatten från verksamheter där potatis förädlas, samla in prover från den punkt där vätskorna släpps ut. Provstorlekar på upp till 500 ml per provtagningsplats rekommenderas. Om mindre prover föredras rekommenderas att proverna tas vid minst tre olika tillfällen per provtagningsplats och att varje prov består av två lika stora delprover av minst 30 ml. Vid intensiva undersökningar, välj minst tre provtagningsplatser per 3 km vattendrag och säkerställ att prover även tas på vattendragets tillflöden.

2.1.2 Transportera proverna svalt och mörkt (4–10 °C) och testa dem inom 24 timmar.

2.1.3 Bakteriedelen kan vid behov koncentreras genom en av följande metoder:

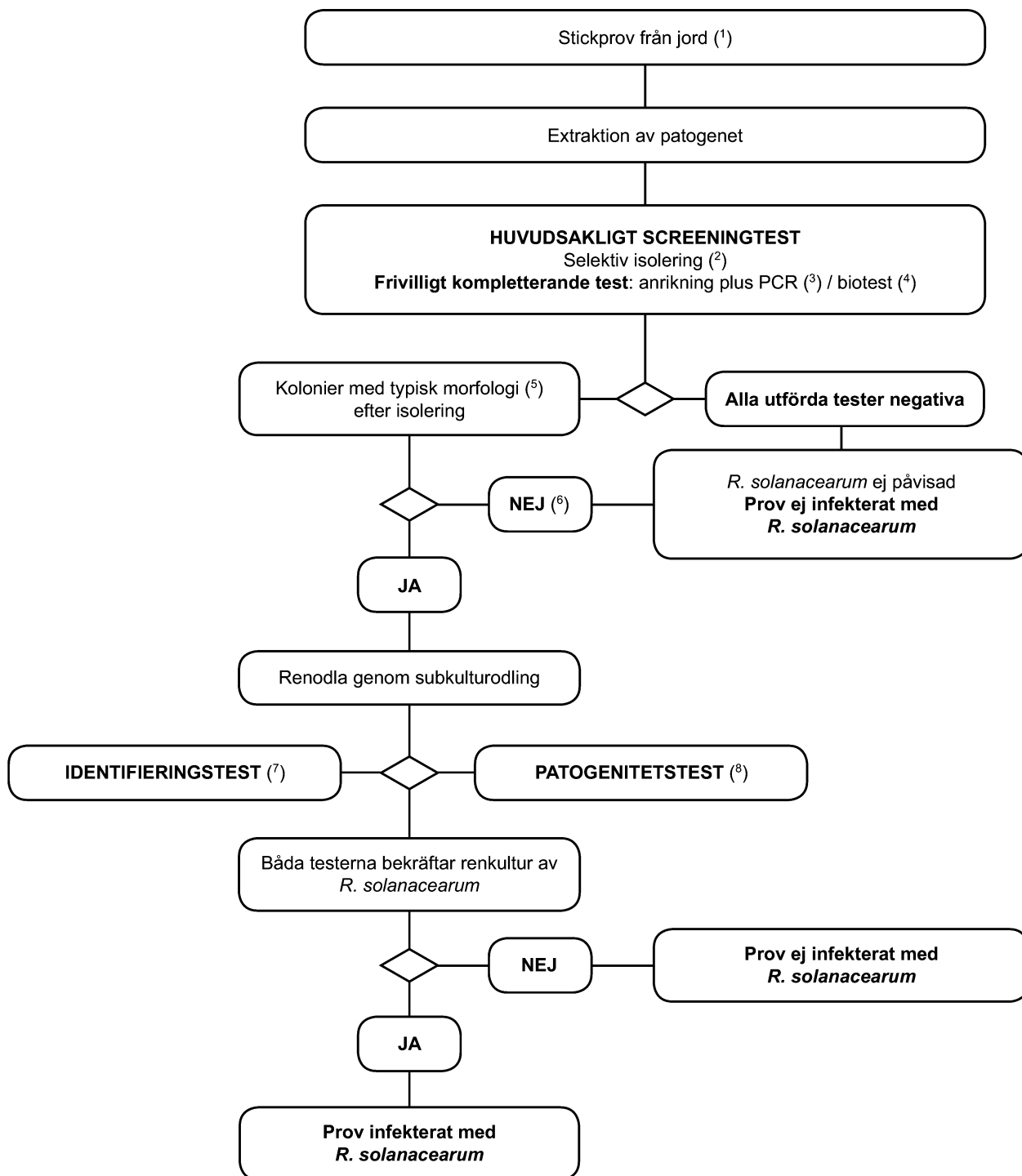
- a) Centrifugera 30–50 ml delprover vid 10 000 g under 10 minuter (eller 7 000 g under 15 minuter), helst vid 4–10 °C. Kasta bort supernatanten och återsuspendera pelleten i 1 ml pelletbuffert (tillägg 4).
- b) Membranfiltrering (lägsta porstorlek 0,45 µm) och därefter tvättning av filtret i 5–10 ml pelletbuffert och förvaring av tvättvätskan. Denna metod är lämplig vid större volymer vatten som innehåller små mängder av saprofyter.

Koncentrering rekommenderas vanligtvis inte för prover av process- eller avloppsvatten från verksamhet där potatis förädlas, eftersom populationer av konkurrerande saprofytiska bakterier inhiberar upptäckten av *R. solanacearum*.

2.2 Testning

Se flödesdiagram och beskrivningar av testerna i de berörda bilagorna.

AVSNITT V

1. Program för att upptäcka och identifiera *R. solanacearum* i jord

- (¹) Rekommenderade provtagningsförfaranden, se avsnitt IV.2.1.
- (²) Selektivt isoleringstest beskrivs i avsnitt VI.A.4.
- (³) Metoder för anrikning plus PCR beskrivs i avsnitten VI.A.4.2 och VI.A.6.
- (⁴) Biotest beskrivs i avsnitt VI.A.9.
- (⁵) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt II.3.d.
- (⁶) Odling i kultur kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om stora populationer av saprofyter misstänks påverka isoleringens tillförlitlighet, repetera isolationstestet efter ytterligare utspädning av provet.
- (⁷) Renkulturer av förmodade isolat av *R. solanacearum* kan identifieras tillförlitligt med hjälp av de tester som beskrivs i avsnitt VI.B.
- (⁸) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt VI.C.

2. Metoder för att upptäcka och identifiera *R. solanacearum* i jord

Principer

Det validerade program för upptäckt som beskrivs i detta avsnitt är tillämpligt på upptäckt av patogenen i jordprover men kan även användas för testning av prover av fast avfall och avloppsslam från bearbetningen av potatis. Det bör emellertid noteras att dessa metoder inte är tillräckligt känsliga för att garantera upptäckt av små och/eller oregelbundet dispergerade populationer av *R. solanacearum* som kan förekomma i naturligt angripna prover av dessa substrat.

Detta testprogramms begränsningar i fråga om känslighet bör beaktas vid bedömningen av tillförlitligheten hos alla eventuella negativa resultat och när det används i undersökningar för att påvisa närvaro eller frånvaro av patogenen i jord eller slam. Det mest tillförlitliga testet för att påvisa närvaro av patogenen i åkerjord är att plantera en mottaglig värdväxt och kontrollera om denna infekteras, men även med denna metod undgår små mängder av nedsmittning upptäckt.

2.1 Preparering av prover

2.1.1 Provtagningen av jordmån bör följa standardprinciperna för provtagning av nematoder. Samla in 0,5–1 kg jord per prov från 60 platser per 0,3 ha på ett djup av 10–20 cm (eller i ett rutnät av 7 x 7 m). Om förekomst av patogenen misstänks, öka mängden provtagningsplatser till 120 per 0,3 ha. Förvara proven vid 12–15 °C före testning. Ta prover på avfall och avloppsslam från bearbetning av potatis genom insamling av totalt 1 kg från platser som är representativa för den totala volymen slam som skall testas. Blanda varje prov väl före testning.

2.1.2 Dispergera delprover av 10–25 g jord eller slam genom att skaka på en rotationsskak (250 rpm) i 60–150 ml extraktionsbuffert (tillägg 4) under upp till två timmar. Finfördelningen kan, om detta krävs, underlättas genom tillsats av 0,02 % steril Tween 20 och 10–20 g steriliserat grus.

2.1.3 Förvara suspensionen vid 4 °C under testningen.

2.2 Testning

Se flödesdiagram och beskrivningar av testerna i de berörda bilagorna.

AVSNITT VI

OPTIMERADE PROTOKOLL FÖR ATT UPPTÄCKA OCH IDENTIFIERA *R. SOLANACEARUM*

A. TEST FÖR DIAGNOS OCH UPPTÄCKT

1. Kärldrömningstest

Närvaro av *R. solanacearum* i stjälkar på vissnande potatis, tomat eller andra värdväxter kan påvisas genom följande enkla presumtiva test: Skär av stjälken strax ovan markytan. Suspendera den skurna ytan i ett rör med rent vatten. Sök efter karakteristiska spontana strömningar av trådar av bakterieslem som utsöndras från de avskurna kärlnippen efter några minuter.

2. Upptäckt av poly- β -hydroxibutyratkorn

1. Preparera ett utstryk av bakteriellt sekret från infekterad vävnad eller en 48-timmars kultur på YPGA- eller SPA-medium (tillägg 1) på ett objektglas.
2. Bered som kontroll positiva utstryk av en biovar 2-stam av *R. solanacearum* och om det anses lämpligt ett negativt kontrollutstryk från en känd PHB-negativ art.
3. Låt torka och för snabbt undersidan av glaset över lågan för att fixera utstryken.
4. Preparera färgning med antingen Nilblått A eller Sudansvart B och observera i mikroskop enligt beskrivningen nedan:

Nilblåtttest:

- a) Dränk in varje objektglas med 1 % vattenlösning av nilblått och inkubera under 10 minuter vid 55 °C.
- b) Dränera av färglösningen. Tvätta snabbt i långsamt rinnande kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskapper.
- c) Dränk in utstryket med 8 % lösning av ättiksyra i vatten, och inkubera i 1 minut vid rumstemperatur.
- d) Tvätta snabbt i långsamt rinnande kranvatten. Avlägsna överskottsvatten med läskapper.
- e) Återfukta med en droppe vatten och lägg på ett täckglas.
- f) Undersök det färgade utstryket i epifluorescensmikroskop vid 450 nm under oljeimmersion vid 600–1 000 gångers förstoring med ett olje- eller vattenimmersionsobjektiv.
- g) Leta efter ljusorange fluorescens av PHB-korn. Undersök också provet i genomfallande vanligt ljus för att säkerställa att kornen är intracellulära och att cellmorfolo­gen är typisk för *R. solanacearum*.

Sudansvarttest:

- a) Dränk in varje objektglas med 0,3 % Sudansvart B-lösning i 70 % etanol och inkubera i 10 minuter vid rumstemperatur.
- b) Dränera av färglösningen och tvätta snabbt i kranvatten, varvid överskottsvatten avlägsnas med läskapper.
- c) Doppa glaset hastigt i xylol och torka med mjukpapper. *Varning: Xylol är skadligt. Vidta nödvändiga säkerhetsåtgärder och arbeta i ett dragskåp.*
- d) Dränk in glaset med 0,5 % (w/v) safranin i vatten och lämna i 10 sekunder vid rumstemperatur. *Varning: Xylol är skadligt. Vidta nödvändiga säkerhetsåtgärder och arbeta i ett dragskåp.*
- e) Tvätta försiktigt i rinnande kranvatten, torka med mjukpapper och lägg på ett täckglas.
- f) Undersök de färgade utstryken i ljusmikroskop (genomfallande ljus) under oljeimmersion vid 1 000 gångers förstoring med ett oljeimmersionsobjektiv.
- g) Sök efter blåsvart färgning av PHB-korn i celler av *R. solanacearum* rosafärgade cellväggar.

3. Serumagglutinationstest

Agglutiner­ing av *R. solanacearum*-celler i bakteriellt sekret eller symtomatisk vävnad observeras bäst genom användning av validerade antikroppar (se tillägg 3) försedda med lämpliga färgmärkningar, såsom röda *Staphylococcus aureus*-celler eller färgade latexpartiklar. Om en sats används som är tillgänglig i handeln (se tillägg 3), skall tillverkarens instruktioner följas. Om inte, skall följande förfarande tillämpas:

- a) Blanda droppar av suspension av märkt antikropp och bakteriellt sekret (ungefär 5 µl var) på fönstren på multispot-objektglas.
- b) Preparera positiva och negativa kontroller, varvid suspensioner av *R. solanacearum* biovar 2 och en heterolog stam används.
- c) Sök efter agglutination i positiva prover efter försiktig blandning under 15 sekunder.

4. Selektiv isolering

4.1 Odling på selektivt medium

Anmärkning: Innan denna metod används för första gången, gör preliminära tester för att möjliggöra reproducerbar upptäckt av 10^3 – 10^4 koloniformande enheter av *R. solanacearum* per ml som tillsätts till provextrakt som tidigare testats och gett negativt svar.

Använd ett lämpligt validerat selektivt medium, såsom SMSA (modifierat av Elphinstone *et al.*, 1996. Se tillägg 2).

R. solanacearum måste noga skiljas från andra bakterier som kan utveckla kolonier på mediet. Kolonier av *R. solanacearum* kan även uppvisa atypisk morfologi om plattorna är överfulla eller om antagonistiska bakterier även är närvarande. Om inverkan av konkurrens eller antagonism misstänks, bör provet testas igen, varvid ett annat test används.

Denna metod har högsta känslighetsnivå när nyligen preparerade provextrakt testas. Metoden är emellertid även tillämplig på extrakt som har lagrats i glycerol vid -68 till -86 °C.

Som positiva kontroller preparera decimala utspädningar från en suspension av 10^6 kolonibildande enheter per ml av *R. solanacearum* (t.ex. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). För att undvika risk för smitta, preparera positiva kontroller som är fullständigt åtskilda från de prover som skall testas.

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

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

4.1.1 Gör en lämplig plattspridning från spädningsserie för att se till att alla saprofytiska kolonibildande bakgrundspopulationer späds ut. Utsprid 50–100 µl per platta av provextrakt och för varje utspädning.

4.1.2 Inkubera plattorna vid 28 °C. Avläs plattorna efter 48 timmar och därefter dagligen under högst sex dagar. Typiska kolonier av *R. solanacearum* på SMSA-medium är mjölkvita, platta, oregelbundna, flödiga kolonier och utvecklar efter tre dagars inkubation rosa till blodröda centra med inre strimmor eller virvlar (se webbplats <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Anmärkning: Atypiska kolonier av *R. solanacearum* bildas ibland på detta medium. De kan vara små, runda, helt rödfärgade och icke-flödiga eller partiellt flödiga och därför svåra att urskilja från saprofytiska kolonibildande bakterier.

4.1.3 Rena presumtiva kolonier av *R. solanacearum* efter utstryk eller plattspridning från spädningsserie på ett vanligt näringsmedium för att erhålla isolerade kolonier (se tillägg 2).

4.1.4 Lagra kolonierna under lång tid i sterilt vatten (pH 6–8, klorfritt) i rumstemperatur i mörker, eller under kort tid i lämpligt frysskyddmedel i -68 till -86 °C eller frystorkat.

4.1.5 Identifiera presumtiva kulturer (se avsnitt VI. B) och gör ett patogenitetstest (se avsnitt VI. C).

Tolkning av resultaten av odlingen på selektivt medium

Odlingen på selektivt medium är negativ om inga bakteriekolonier observeras efter sex dagar eller om inga förmodade kolonier typiska för *R. solanacearum* påvisas, förutsatt att ingen inhibition misstänks på grund av konkurrens eller antagonism från andra bakterier och att typiska kolonier av *R. solanacearum* påvisas i de positiva kontrollerna.

Odlingen på selektivt medium är positiv om presumtiva kolonier av *R. solanacearum* isoleras.

4.2 Anrikningsförfarande

Använd ett validerat anrikningsmedium, såsom modifierad Wilbrink-buljong (se tillägg 2).

Detta förfarande kan användas för att selektivt öka populationerna av *R. solanacearum* i provextrakten och för att öka känsligheten för upptäckt. Förfarandet späder dessutom effektivt ut inhibitorer av PCR-reaktion (1:100). Det bör emellertid noteras att anrikning av *R. solanacearum* kan misslyckas på grund av konkurrens eller antagonism från saprofytiska organismer, som ofta anrikas samtidigt. Därför kan isolering av *R. solanacearum* från anrikningsbuljonger vara svårt. Eftersom populationerna av serologiskt besläktade saprofyter kan förökas, rekommenderas dessutom att specifika monoklonala antikroppar används i stället för polyklonala antikroppar om ELISA-test används.

- 4.2.1 Vid anriknings-PCR tillsätt 100 µl provextrakt till 10 ml anrikningsbuljong (tillägg 2) som dessförinnan portionerats i DNA-fria rör eller flaskor. Vid anriknings-ELISA kan en proportionellt större andel provextrakt i förhållande till buljong användas (t.ex. 100 µl i 1,0 ml anrikningsbuljong).
- 4.2.2 Inkubera under 72 timmar vid 27–30 °C med eller utan skak med locket löst påsatt för luftning.
- 4.2.3 Blanda väl före användning i ELISA- eller PCR-test.
- 4.2.4 Behandla anrikningsbuljongen på exakt samma sätt som provet (proverna) i ovannämnda test.

Anmärkning: Om anrikningen av *R. solanacearum* förväntas inhiberas på grund av stora populationer av vissa konkurrerande saprofytiska bakterier, kan anrikning av provextrakten före centrifugering eller andra koncentrationssteg ge bättre resultat.

5. IF-test

Princip

Det rekommenderas att IF-test används som huvudsakligt screeningtest på grund av dess dokumenterade förmåga att uppnå de föreskrivna tröskelvärdena.

Om IF-testet används som huvudsakligt screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest med isolerings-, PCR- eller FISH-test 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 antikroppar mot *R. solanacearum* med validerat ursprung (se webbplats: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). 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 *R. solanacearum* testas och när en lämplig fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugat i överensstämmelse med tillverkarens rekommendationer används. Validerade polyklonala antiserum bör ha en IF-titer av minst 1:2 000. Vid testningen bör antikropparna användas vid en arbetsutspädning (arbetsutspädningar) nära eller vid titern.

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 glaset med flambering.

Bered separata positiva kontrollglas av den homologa stammen eller någon annan referensstam av *R. solanacearum*, som suspenderats i potatisextrakt, alternativt i en buffert, såsom anges i tillägg 3 B.

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 negativa kontroller kan användas portioner av provextrakt som tidigare givit negativt svar beträffande *R. solanacearum* när de testats.

Standardiserade positiva och negativa kontrollmaterial som kan användas i detta test förtecknas i tillägg 3.

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

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

5.1 Preparera testglas enligt någon av följande metoder

- 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, 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.

- 5.2 Torka dropparna i omgivande temperatur eller genom uppvärmning till 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.

5.3 IF-förfarande

i) Enligt testglaspreparering i 5,1 (i):

Preparera en serie dubbla utspädningar. 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 5,1 ii:

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

Figur 1. Preparering av testglaset enligt 5.1 i och 5.3 i.

		Utspädningar av återsuspenderade pelletar					
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/> Utspädning av återsuspenderad pellet
(T = titer)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/> Dubbla utspädningar av antiserum/antikropp
Prov 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplikat av prov 1 eller prov 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

Figur 2. Preparering av testglaset enligt 5,1 ii och 5,3 ii.

		Arbetsutspädning av antiserum/antikropp					
		1/1	1/10	1/100	tom	tom	<input type="checkbox"/> Decimal utspädning av återsuspenderad pellet
Prov 1		● ₁	● ₂	● ₃	● ₄	● ₅	
Duplikat av prov 1 eller prov 2		● ₆	● ₇	● ₈	● ₉	● ₁₀	

- 5.3.1 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:

- 5.3.2 Inkubera glaset på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).
- 5.3.3 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 4) och därefter i IF-buffert. Undvik uppkomst av aerosoler eller överföring av droppar som kan orsaka korskontaminering. Avlägsna noga överskottsfukt genom att försiktigt torka med läskpapper.
- 5.3.4 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.
- 5.3.5 Inkubera glaset på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).
- 5.3.6 Skaka av konjugatdropparna från glaset. Skölj och tvätta som ovan (5.3.3).

Avlägsna noga överskottsfukt.

- 5.3.7 Pipettera 5–10 µl 0,1 M fosfatbuffrad glycerol (tillägg 4) eller en monteringslösning som motverkar blekning som finns tillgänglig i handeln på varje fönster och lägg på ett täckglas.
- 5.4 Avläsning av IF-testet

- 5.4.1 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. På de prover som inte uppvisar några celler eller endast 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 antikropptitern eller arbetsutspädningen. IF-testet (avsnitt VI.A.5.) skall återupprepas om färgningen är avvikande.

- 5.4.2 Sök efter ljusa fluorescerande celler med morfologi som är karakteristisk för *R. solanacearum* i testfönstren på testglaset (se webbplats: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluorescensintensiteten måste motsvara det positiva kontrollisolatets vid samma antikroppsutspädning. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens beaktas inte.

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

- 5.4.3 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 *R. solanacearum* kan förekomma hos potatisar i naveländarna och i pelletar av stjälksegmentet.
- 5.4.4 Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi vid titern eller vid arbetsutspädningen av antikropparna skall beaktas, såsom i 5.3.

5.4.5 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 5).

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.

6. PCR-test

Principer

Om ett PCR-test används som huvudsakligt screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest i form av ett isoleringstest eller IF-test göras. Om PCR 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 *R. solanacearum* 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 (se avsnitt 6) 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 molekylärbiologiska laboratorier för att minimera risken för nedsmittning av mål-DNA.

Negativa kontroller (för DNA-extraktions- och PCR-förfaranden) bör alltid behandlas som slutligt 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 gett negativt svar när det testats med avseende på *R. solanacearum*.
- Buffertkontroller som används för extrahering av bakterien och DNA från provet.
- PCR-reaktionsblandning.

Följande positiva kontroller bör tas med:

- Portioner av återsuspenderad pellet till vilka *R. solanacearum* har tillsatts (information om preparering finns i tillägg 3 B).
- En suspension av 10^6 celler per ml av *R. solanacearum* i vatten från ett virulent isolat (t.ex. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; se tillägg 3 B).
- Om möjligt använd dessutom DNA från positiva kontrollprover från PCR-tester.

För att undvika risk för nedsmittning, 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.

Standardiserade positiva och negativa kontrollmaterial som kan användas i detta test förtecknas i tillägg 3.

6.1 Metoder för rening av DNA

Använd positiva och negativa kontrollprover såsom beskrivs ovan (se tillägg 3).

Testa 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.

a) Metod enligt Pastrik (2000)

- 1) Pipettera 220 µl 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 µl provextrakt och placera i värmeblock eller vattenbad vid 95 °C under 10 minuter.
- 3) Ställ röret på kylning under 5 minuter.
- 4) Tillsätt 80 µl Lysozym stocklösning (50 mg lysozym per ml i 10 mM Tris HCl, pH 8,0) och inkubera vid 37 °C under 30 minuter.
- 5) Tillsätt 220 µl 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 till fällningen svävar fritt i röret och provet är jämnt trögflytande.
- 7) Tillsätt 500 µl chloroform och skaka till 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 nedkylning 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 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.

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 kontrollmallar för PCR enligt de validerade protokollen (avsnitt VI.A.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 de offentliggjorda protokollen (tillägg 6). Användning av multiplexa PCR-protokoll som även omfattar en intern PCR-kontroll rekommenderas där så är möjligt.
- 6.2.3 Tillsätt 2–5 µl DNA-extrakt per 25 µl PCR-reaktion i sterila PCR-rör enligt PCR-protokollen (se tillägg 6).
- 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 termocykelapparat som användes vid föregående testning och kör lämpligt optimerat PCR-program (tillägg 6).

6.3 Analys av PCR-produkten

- 6.3.1 Lös PCR-kopior med agaroselektrofores. 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 ethidiumbromid (0,5 mg/l) under 30–60 minuter, varvid lämpliga försiktighetsåtgärder bör vidtas vid hanteringen av denna mutagen.
- 6.3.3 Observera det färgade gelet i kortvågs-UV-genomlysning ($\lambda = 302$ nm) och sök efter amplifierade PCR-produkter av förväntad storlek (tillägg 6) och dokumentera.
- 6.3.4 För varje ny upptäckt/nytt fall verifiera autenticiteten hos PCR-kopian 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 agaroselektrofores, 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 *R. solanacearum*-specifika PCR-kopian av den förväntade storleken inte upptäcks i provet, men upptäcks i alla positiva kontrollprover (i fallet multiplex-PCR med plantspecifika interna kontrollprimrar måste en andra PCR-produkt av förväntad storlek amplifieras med provet i fråga).

PCR-testet är positivt om det *R. solanacearum*-specifika PCR-kopian 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 (tillägg 6).

Anmärkning: Inhibering av PCR kan misstänkas om den förväntade kopian erhålls från det positiva kontrollprovet innehållande *R. solanacearum* i vatten men negativa resultat erhålls från positiva kontroller med *R. solanacearum* i potatisextrakt. I multiplexa PCR-protokoll med interna PCR-kontroller anges inhibering av reaktionen när inget av de båda kopiorna erhålls.

Nedsmitning kan misstänkas om den förväntade kopian erhålls från en eller flera av de negativa kontrollerna.

7. FISH-test

Princip

Om FISH-testet används som första screeningtest och resultatet är positivt, skall ett andra screeningtest i form av isoleringstest eller 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 *R. solanacearum*-specifika oligo-prober (se tillägg 7). Preliminär testning med denna metod bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av minst 10^3 – 10^4 celler av *R. solanacearum* 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 portioner av provextrakt som tidigare givit negativt svar när de testats avseende *R. solanacearum*.

Som positiva kontroller preparera suspensioner innehållande 10^5 – 10^6 celler per ml av *R. solanacearum* biovar 2 (dvs. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, se tillägg 3) i 0,01 M fosfatbuffert från en 3–5 dagar gammal kultur. Bered separata positiva kontrollglas av den homologa stammen eller någon annan referensstam av *R. solanacearum*, som suspenderats i potatisextrakt, såsom anges i tillägg 3 B.

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

Standardiserade positiva och negativa kontrollmaterial som kan användas i detta test förtecknas i tillägg 3 punkt A.

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proverna).

7.1 Fixering av potatisextrakt

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

7.1.1 Preparera fixeringslösningen (se tillägg 7).

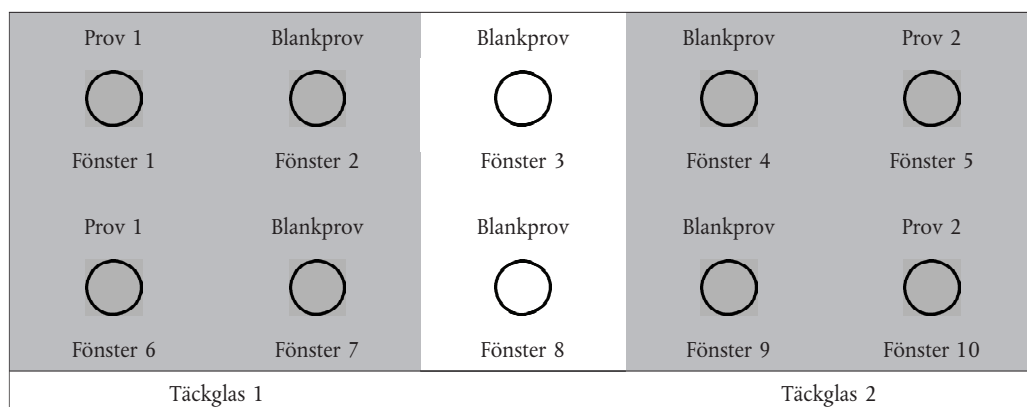
7.1.2 Pipettera 100 µl av varje provextrakt i ett Eppendorf-rör och centrifugera under 7 minuteruter på 7 000 g.

7.1.3 Avlägsna supernatanten och lös pelleten i 200 µl fixeringsvätska som preparerats 24 timmar tidigare. Skaka och inkuber under 1 timme i kylskåp.

7.1.4 Centrifugera under 7 minuter på 7 000 g, avlägsna supernatanten och återsuspendera pelleten i 75 µl 0,01 M fosfatbuffert (se tillägg 7).

7.1.5 Droppa 16 µl av de fixerade suspensionerna på ett rent multitest-objektglas, såsom anges i fig. 7.1. 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 fosfatbuffert (omskakas).

Fig. 7.1: FISH-glasets layout.



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

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

7.2 Hybridisering

- 7.2.1 Torka cellerna i en serie av etanol om 50 %, 80 % och 96 % under 1 minut vardera. Lufttorka glaset i en hållare för objektglas.

- 7.2.2 Preparera en fukt-kammare för inkubation genom att täcka botten av en lufttät behållare med mjuk- eller filterpapper doppat i 1 x hybmix (tillägg 7). Preinkubera behållaren i hybridiseringsugn vid 45 °C under minst 10 minuter.

- 7.2.3 Tillsätt 10 µl hybridiseringslösning (tillägg 7) till 8 fönster (fönstren 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 och 10; se figur 7.1) på varje glas och lämna de två mittfönstren (3 och 8) tomma.

- 7.2.4 Anbringa täckglass (24 × 24 mm) på det första och de 4 sista fönstren utan att låta någon luft komma emellan. Placera glaset i den redan uppvärmda fukt-kammaren och hybridisera under 5 timmar i ugn i 45 °C i mörker.

- 7.2.5 Preparera 3 bägare innehållande 1 l Milli Q-vatten (av molekylärbio-logisk kvalitet), 1 l av 1 x hybmix (334 ml 3 x hybmix och 666 ml Milli Q-vatten) och 1 l av 1/8 x hybmix (42 ml 3 x hybmix och 958 ml Milli Q-vatten). Preinkubera var och en i vattenbad vid 45 °C.

- 7.2.6 Avlägsna täckglaset från glaset och placera glaset i en hållare för objektglas.

- 7.2.7 Tvätta bort överskott av probe genom inkubation under 15 minuter i bägaren med 1 x hybmix vid 45 °C.

- 7.2.8 För över hållaren för objektglas till 1/8 hybmix tvättlösning och inkubera under ytterligare 15 minuter.

- 7.2.9 Doppa glaset hastigt i Milli Q-vatten och placera det 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.

7.3 Avläsning av FISH-testet

- 7.3.1 Observera glaset omedelbart i ett mikroskop utrustat för epifluorescensmikroskopi vid 630 eller 1 000 × 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 tetrametylrodamin-5-isotiocyanat framträder Cy3-infärgade celler av *R. solanacearum* som fluorescerande röda. Jämför cellmorfologin med de positiva kontrollernas cellmorfologi. Cellerna skall vara klart fluorescerande och helt färgade. FISH-testet (avsnitt VI.A.7.) 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.

- 7.3.2 Sök efter ljusa fluorescerande celler med morfologi som är karakteristisk för *R. solanacearum* i testfönstren på testglaset (se webbplats: <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.

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

7.3.4 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 *R. solanacearum* kan förekomma hos potatisar, dels i naveländarna, dels i pelletar av stjälksegmentet, även om de är mycket mer lågfrekventa än i IF-test.

7.3.5 Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi tas i beaktande.

7.3.6 Tolkning av FISH-resultaten:

- i) Giltiga resultat från FISH-test erhålls om klart fluorescerande gröna celler med storlek och morfologi som är typiskt för *R. solanacearum* 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 nedsmittade. Ytterligare provtagning krävs. Prover som innehåller färre än 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet betraktas som negativa.
- ii) FISH-testet är negativt om klart fluorescerande röda celler med storlek och morfologi som är typiskt för *R. solanacearum* inte observeras när rodamin-filtret används, förutsatt att typiska klart fluorescerande röda celler observeras i de positiva kontrollpreparaten när rodamin-filtret används.

8. ELISA-test

Princip

ELISA kan endast användas som ett frivilligt test som komplement till IF, PCR eller FISH på grund av den relativt sett låga känsligheten hos detta test. Om DAS ELISA används är anrikning och monoklonala antikroppar obligatoriskt (se webbplats: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Anrikning av proverna för ELISA kan vara användbart för att öka testets känslighet, men den kan misslyckas på grund av konkurrens från andra organismer i provet.

Anmärkning: Använd antikroppar mot *R. solanacearum* med validerat ursprung (se webbplats <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). 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 to 10^6 celler per ml av den homologa stammen av *R. solanacearum* testas och när lämpliga sekundära antikroppkonjugat i överensstämmelse med tillverkarens rekommendationer används. Vid testningen bör antikropparna användas vid en arbetsutspädning nära eller vid titern i den kommersiellt tillgängliga blandningen.

Bestäm titern av antikroppar i en suspension av 10^5 till 10^6 celler per ml av den homologa stammen av *R. solanacearum*.

Ta med ett provextrakt som tidigare gett negativt svar när det testats för *R. solanacearum* och en suspension av icke-korsreagerande bakterier i en fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som negativa kontroller.

Som positiv kontroll använd portioner av provextrakt som tidigare gett negativt svar när de testats, blandade med 10^3 till 10^4 celler per ml *R. solanacearum* biovar 2 (t.ex. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, se tillägg 2 A och B). För jämförelse av resultaten på varje platta, använd en standardsuspension av celler per ml i PBS av *solanacearum*. Säkerställ att de positiva kontrollerna är väl åtskilda på mikrotiterplattan från provet (proven) under testet.

Standardiserade positiva och negativa kontrollmaterial som kan användas i detta test förtecknas i tillägg 3 A.

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

Två ELISA-protokoll har validerats:

a) Indirekt ELISA (Robinson-Smith m.fl., 1995)

- 1) Använd 100–200 µl portioner av provextraktet. (Upphettning till 100 °C under 4 minuter i vattenbad eller värmeblock kan minska icke-specifika resultat i vissa fall.)
- 2) Tillsätt en motsvarande volym coatingbuffert av dubbel styrka (tillägg 4) och skaka.
- 3) Tillsätt 100 µl portioner till var och en av de sista två brunnarna på en mikrotiterplatta (t.ex. Nunc-Polysorp eller motsvarande) och inkubera under 1 timme i 37 °C eller över natten i 4 °C.

- 4) Håll ut extrakten från brunnarna. Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 4), varvid den sista tvättlösningen får vara kvar i brunnarna minst 5 minuter.
- 5) Bered den tillämpliga utspädningen av antikroppar mot *R. solanacearum* i blockeringsbuffert (tillägg 4). För validerade antikroppar som finns i handeln används de rekommenderade utspädningarna (vanligtvis dubbelt så hög koncentration som titern).
6. Tillsätt 100 µl till varje brunn och inkubera under 1 timme i 37 °C.
- 7) Håll ut antikroppslösningen från brunnarna och tvätta som ovan (4).
- 8) Bered den tillämpliga utspädningen av sekundär antikropp-alkalin fosfatas konjugat i blockeringsbuffert. Tillsätt 100 µl till varje brunn och inkubera under 1 timme i 37 °C.
- 9) Håll ut antikroppskonjugatet från brunnarna och tvätta som ovan (4).
- 10) Tillsätt 100 µl alkalisk fosfatassubstratlösning (tillägg 4) till varje brunn. Inkubera i mörker vid omgivande temperatur och läs av absorptionen vid 405 nm vid regelbundna intervaller inom 90 minuter.

b) DASI ELISA

- 1) Preparera lämplig utspädning av anti-*R. solanacearum* polyklonala immunoglobuliner i coatingbuffert pH 9,6 (tillägg 4). Tillsätt 200 µl till varje brunn. Inkubera vid 37 °C under 4–5 timmar eller vid 4 °C under 16 timmar.
- 2) Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 4).

Tillsätt 190 µl provextrakt till minst 2 brunnar. Tillsätt också positiva och negativa kontroller i två brunnar på varje platta. Inkubera under 16 timmar vid 4 °C.
- 3) Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 4).
- 4) Preparera en lämplig utspädning av *R. solanacearum*-specifika monoklonala antikroppar i PBS (tillägg 4) som även innehåller 0,5 % bovint serumalbumin (BSA) och tillsätt 190 µl till varje brunn. Inkubera vid 37 °C under 2 timmar.
- 5) Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 4).
- 6) Preparera en lämplig utspädning av antimus-antikroppar som konjugerats med alkaliskt fosfatas i PBS. Tillsätt 190 µl till varje brunn. Inkubera vid 37 °C under 2 timmar.
- 7) Tvätta brunnarna tre gånger med PBS-Tween (tillägg 4).
- 8) Preparera en alkalisk fosfatassubstratlösning som innehåller 1 mg p-nitrofenylfosfat per ml substratbuffert (tillägg 4). Tillsätt 200 µl till varje brunn. Inkubera i mörker vid omgivande temperatur och läs av absorptionen vid 40 nm vid regelbundna intervaller inom 90 minuter.

Tolkning av resultaten av ELISA-testet:

ELISA-testet är negativt om den genomsnittliga optiska densiteten (OD) i duplicerade provbrunnar är $< 2 \times$ OD för den i kontrollbrunnen med det negativa provextraktet, förutsatt att OD för samtliga positiva kontroller är över 1,0 (efter 90 minuter inkubation med substratet) och är mer än dubbelt så hög som den OD som erhålls för de negativa provextrakten.

ELISA-testet är positivt om den genomsnittliga OD i duplicerade provbrunnar är $> 2 \times$ OD i brunnen med det negativa provextraktet, förutsatt att OD för samtliga negativa kontroller är $< 2 \times$ den i de positiva kontrollbrunnarna.

Negativa ELISA-resultat i positiva kontrollbrunnar antyder att testet inte har utförts korrekt eller har inhiberats. Positiva ELISA-resultat i negativa kontrollbrunnar antyder att korskontaminering eller icke-specifik antikroppsbindning har inträffat.

9. Biotest

Anmärkning: Preliminär testning med denna metod bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av 10^3 – 10^4 kolonibildande enheter av *R. solanacearum* per ml som tillsätts till provextrakt som tidigare testats och gett negativt svar (information om prepareringen finns i tillägg 3).

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.

Nedanstående protokoll grundar sig på Janse (1988):

9.1 Använd 10 testplantor av mottagliga tomatorter (t.ex. Moneymaker eller sorter med motsvarande mottaglighet enligt testlaboratoriet) Detaljerad information om odling finns i tillägg 8. Alternativt, använd äggplantor (t.ex. sorten Black Beauty eller sorter med motsvarande mottaglighet), och använd endast plantor på bladstadierna 2–3 upp till full utveckling av trebladsstadiet. Tidigare studier har visat att symtomen hos äggplantor är mindre påtagliga och utvecklas långsammare. Därför rekommenderas att tomatplantor används där så är möjligt.

9.2 Fördela 100 µl provextrakt mellan testplantorna.

9.2.1 Inympning med en spruta

Inokulera plantornas stjälkar just ovanför hjärtbladen med en spruta som är försedd med injektionsnål (minst 23 G). Fördela provet mellan testplantorna.

9.2.2 Inokulation genom skåra

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.

Gör med en steril skalpell 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.

Förslut skåran med sterilt vaselin från en spruta.

9.3 Inokulera med samma teknik, 5 småplantor med en vattensuspension av 10^5 – 10^6 celler per ml preparerad av en 48-timmarskultur av en virulent biovar 2-stam av *R. solanacearum* som positiv kontroll och med pelletbuffert (tillägg 4) som negativ kontroll. Separera de positiva och negativa kontrollplantorna från de andra plantorna för att undvika korskontaminering.

9.4 Odla testplantorna i karantänsanläggningar upp till 4 veckor vid 25–30 °C och med hög relativ luftfuktighet och med lämplig bevattning för att undvika vattenmättnad eller vissnande på grund av vattenbrist. 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.

Sök efter symtom på vissning, epinasti, kloros och/eller försvagad tillväxt.

- 9.5 Isolera från infekterade plantor (avsnitt II.3) och identifiera renkulturer av förmodad *R. solanacearum* (avsnitt VI. B).
- 9.6 Om inga symtom observeras efter 3 veckor, utför IF/PCR/isolering på ett blandprov av 1 cm stjälksegment från varje testplanta taget ovanför inokulationsstället. Om testet är positivt, utför plattspridning från spädningsserie (se avsnitt 4.1).
- 9.7 Identifiera och rena kulturerna av förmodad *R. solanacearum* (avsnitt VI. B).

Tolkning av resultaten av biotestet:

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

Biotestet är negativt om testplantorna inte är infekterade av *R. solanacearum* och under förutsättning att *R. solanacearum* detekterats i de positiva kontrollerna.

Biotestet är positivt om testplantorna är infekterade av *R. solanacearum*.

B. IDENTIFIERINGSTEST

Identifiera renkulturer av presumtiva *R. solanacearum*-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 (se tillägg 3).

1. Närings- och enzymtest

Fastställ följande fenotypiska egenskaper som alltid är närvarande eller frånvarande i *R. solanacearum* enligt metoderna Lelliott och Stead (1987), Klement m.fl. (1990), Schaad (2001).

Test	Förväntat resultat
Produktion av fluorescerande pigment	–
poly- β -hydroxybutyrat-inklusioner	+
Oxidations-/fermenteringstest (O/F-test).	O+/F–
Katalasaktivitet	+
Kovacs oxidastest	+
Reduktion av nitrat	+
Användning av citrat	+
Tillväxt vid 40 °C	–
Tillväxt i 1 % NaCl	+
Tillväxt i 2 % NaCl	–
Arginindihydrolas-aktivitet	–
Smältning av gelatin	–
Hydrolys av stärkelse	–
Hydrolys av aesculin	–
Levanproduktion	–

2. IF-test

- 2.1 Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i IF-buffert (tillägg 4).
- 2.2 Preparera en serie dubbla utspädningar av ett lämpligt antiserum (se webbplats: <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).
- 2.3 Tillämpa IF-förfarandet (avsnitt VI.A.5.).
- 2.4 Ett positivt IF-test erhålls om kulturen har samma IF-titer som den positiva kontrollen.

3. ELISA-test

Anmärkning: Om endast två identifieringstest görs, använd inget annat serologiskt test som komplement till den här metoden.

- 3.1 Preparera en suspension av ungefär 10^8 celler per ml i 1 x fosfatbuffrad koksaltlösning (tillägg 4).
- 3.2 Utför ett lämpligt ELISA-test med en specifik monoklonal antikropp till *R. solanacearum*.
- 3.3 ELISA-testet är positivt om ELISA-resultatet från kulturen är minst hälften så högt som det från den positiva kontrollen.

4. PCR-test

- 4.1 Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i sterilt vatten av molekylärbioologisk kvalitet.
- 4.2 Upphetta 100 µl av cellsuspensionen i tillslutna rör i värmeblock eller kokande vattenbad i 100 °C under 4 minuter. Proverna kan därefter lagras i -16 till -24 °C fram till användning.
- 4.3 Använd lämpliga PCR-förfaranden för att amplifiera *R. solanacearum*-specifika kopior (t.ex. Seal m.fl. [1993]; Pastrik and Maiss [2000]; Pastrik m.fl. [2002]; Boudazin m.fl. [1999]; Opina m.fl. [1997], Weller m.fl. [1999]).
- 4.4 En positiv identifiering av *R. solanacearum* erhålls om PCR-kopiorna har samma storlek och samma RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) som den positiva kontrollstammen.

5. FISH-test

- 5.1 Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.
- 5.2 Tillämpa FISH-förfarandet (avsnitt VI.A.7.) med minst 2 *R. solanacearum*-specifika oligo-prober (tillägg 7).
- 5.3 Ett positivt FISH-test föreligger om samma reaktioner erhålls från kulturen och den positiva kontrollen.

6. Fettsyraprofilering (FAP)

- 6.1 Odlå kulturen på trypticase-soja-agar (Oxoid) under 48 timmar i 28 °C.
- 6.2 Tillämpa ett lämpligt FAP-förfarande (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3 Ett positivt FAP-test erhålls om den presumtiva kulturen har samma profil som den positiva kontrollen. Förekomsten av karakteristiska fettsyror är 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH och 18:1 2OH, och frånvaron av 16:0 3OH tyder i hög grad på *Ralstonia* sp.

7. Metoder för stamkaraktärisering

Stamkaraktärisering är en av följande metoder som rekommenderas för varje nytt fall av isolering av *R. solanacearum*.

Ta med kända referensstammar när så är lämpligt vid varje test som utförs (se tillägg 3).

7.1 Biovarbestämning

R. solanacearum separeras i biovarer på grundval av förmågan att använda och/eller oxidera tre disackarider och tre hexosalkoholer (Hayward, 1964 och Hayward m.fl. 1990). Odlningsmedier för biovarstest beskrivs i tillägg 2. Testet kan tillämpas genom att mediet stickinokuleras med renkulturer av *R. solanacearum*-isolat och inkuberas i 28 °C. Om mediet fördelas i sterila cellodlningsplattor med 96 brunnar (200 µl per brunn) kan färgändring från olivgrön till gul observeras inom 72 timmar, vilket indikerar ett positivt testresultat.

	Biovar				
	1	2	3	4	5
Användning av:					
Maltos	–	+	+	–	+
Laktos	–	+	+	–	+
D (+) Cellobios	–	+	+	–	+
Mannitol	–	–	+	+	+
Sorbitol	–	–	+	+	–
Dulcitol	–	–	+	+	–

Ytterligare test differentierar biovar 2 subfenotyper.

	Biovar 2A (världsvid spridning)	Biovar 2A (påträffas i Chile och Colombia)	Biovar 2T (påträffas i tropiska områden)
Användning av trehalos	–	+	+
Användning av meso-inositol	+	–	+
Användning av D-ribos	–	–	+
Pektolytisk aktivitet (1)	låg	låg	hög

(1) Se Lelliott och Stead (1987).

7.2 Genomiskt fingeravtryck

Molekylär differentiering av stammar av *R. solanacearum*-komplexet kan åstadkommas genom att flera olika tekniker används, bland annat

7.2.1 RFLP-analys (*restriction fragment length polymorphism*) (Cook m.fl., 1989).

7.2.2 Repetitiv sekvens-PCR med användning av REP-, ERIC- och BOX-primrar (Louws m.fl., 1995; Smith m.fl., 1995).

7.2.3 AFLP-analys (*amplified fragment length polymorphism*) (Van der Wolf m.fl., 1998).

7.3 PCR-metoder

Specifika PCR primers (Pastrik m.fl., 2002; se tillägg 6) kan användas för att differentiera stammar tillhörande grupp 1 (biovar 3, 4 och 5) och grupp 2 (biovar 1, 2A och 2T) av *R. solanacearum*, ursprungligen definierade genom RFLP-analys (Cook m.fl., 1989) och 16S rDNA-sekvensbestämning (Taghavi m.fl., 1996).

C. VERIFIERINGSTEST

Patogenitetstestet skall utföras som en slutlig bekräftelse på en diagnos av *R. solanacearum* och för att bedöma virulensen hos kulturer identifierade som *R. solanacearum*.

- 1) Bered ett inokulat av ca 10^6 celler per ml av en 24–48-timmarskultur av det isolat som skall testas och en lämplig positiv kontrollstam av *R. solanacearum* (t.ex. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; se tillägg 3).
- 2) Inokulera 5–10 mottagliga små tomatplantor eller små äggplantor på trebladsstadiet (se avsnitt VI.A.9).

- 3) Inkubera under 2 veckor i 25–28 °C med hög relativ luftfuktighet med lämplig bevattning för att undvika vattenmättnad eller stress till följd av torka. Med renodlingar bör typiskt vissnande uppnås inom 14 dagar. Om inga symtom märks efter denna period, kan det inte fastslås att kulturen är en patogen form av *R. solanacearum*.
 - 4) Sök efter symtom på vissning och/eller epinasti, kloros och försvagad tillväxt.
 - 5) Isolera från plantor med symtom genom att avlägsna ett segment från stjälken ca 2 cm ovanför inokuleringspunkten. Fördela och suspendera i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert (tillägg 4). Isolera från suspensionen genom utspridning eller utstryk från spädningsserie på ett lämpligt medium, företrädesvis ett selektivt substrat (tillägg 2), inkubera under 48–72 timmar i 28 °C och observera bildandet av kolonier typiska för *R. solanacearum*.
-

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 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
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali	Bologna	Italien
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italien
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Nederländerna
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Nederländerna
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Centro Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Spanien
Sveriges lantbruksuniversitet	Uppsala	Sverige

⁽¹⁾ För kontaktuppgifter för personal, se webbplats: (<http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

Tillägg 2

Medier för isolering och odling av *R. solanacearum***a) Allmänna odlingsmedier***Näringsagar (Nutrient Agar, NA)*

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

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

Jäst-pepton-glukosagar (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.

Sukrosepeptonagar (Sucrose Peptone Agar, SPA)

Sackaros	20,0 g
Bacto pepton (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
Bacto agar (Difco)	15,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

pH 7,2–7,4

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

Kelmans tetrazolium medium

Casaminosyror (Difco)	1,0 g
Bacto pepton (Difco)	10,0 g
Dextros	5,0 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.

Kyl ned till 50 °C och tillsätt en filtersteriliserad lösning av 2,3,5-trifenyl-tetrazoliumklorid (Sigma) så att en slutkoncentration av 50 mg per l uppnås.

b) Validerade selektiva odlingsmedier

SMSA-medium (Englebrecht, 1994, modifierat av Elphinstone m.fl., 1996)

Basismedium

Casaminosyror (Difco)	1,0 g
Bacto pepton (Difco)	10,0 g
Glycerol	5,0 ml
Bacto agar (Difco) (se anmärkning 2)	15,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

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

Kyl ned till 50 °C och tillsätt filtersteriliserade vattenstocklösningar bestående av följande ingredienser för att erhålla de angivna slutkoncentrationerna.

Kristallviolett (Sigma)	5 mg per l
Polymixin-B-Sulfat (Sigma P-1004)	600 000 U (ca 100 mg) per l
Bacitracin (Sigma B-0125)	1 250 U (ca 25 mg) per l
Kloramphenicol (Sigma C-3175)	5 mg per l
Penicillin-G (Sigma P-3032)	825 U (ca 0,5 mg) per l
2,3,5-trifeny-tetrazoliumklorid (Sigma)	50 mg per l

Anmärkning:

1. Användning av andra reagens än dem som anges ovan kan påverka tillväxten hos *R. solanacearum*.
2. Oxoid agar (nr 1) kan användas i stället för Bacto-agar (Difco). Tillväxten hos *R. solanacearum* kan då bli långsammare, men tillväxten hos konkurrerande saprofyter kan också reduceras. Typiska kolonier av *R. solanacearum* kan ta 1–2 dagar längre att bildas, och den röda färgen kan bli ljusare och mer diffus än på Bacto agar.
3. Om koncentrationen av bacitracin ökas till 2 500 U per l kan populationerna av konkurrerande bakterier minska utan att tillväxten hos *R. solanacearum* påverkas.

Lagra medierna och stocklösningarna av antibiotika i 4 °C i mörker och använd inom en månad.

Plattorna bör vara fria från ytkondensation före användning.

Undvik att plattorna torkar alltför mycket.

En kvalitetskontroll bör utföras efter prepareringen av varje nytt parti medier genom att plattodla en suspension av en referensodling av *R. solanacearum* (se tillägg 3) och observera bildandet av typiska kolonier efter inkubation vid 28 °C under 2–5 dagar.

c) Validerade anrikningsmedier

SMSA-buljong (Elphinstone m.fl., 1996)

Preparera på samma sätt som SMSA selektivt agarmedium men uteslut Bacto-agar och 2,3,5-tetrazoliumklorid.

Modifierad Wilbrink-buljong (Caruso m.fl., 2002)

Sackaros	10 g
Proteos-pepton	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,25 g
NaNO ₃	0,25 g
Destillerat vatten	1,0 l

Sterilisera i autoklav vid 121 °C under 15 minuter och kyl ned till 50 °C.

Tillsätt antibiotiska stocklösningar som för SMSA-buljong.

Tillägg 3

A. Standardiserade kontrollmaterial tillgängliga i handeln

a) Bakterieisolat

Följande bakterieisolat rekommenderas som standardreferensmaterial, antingen som positiva kontroller (tabell 1) eller under optimeringen av tester för att undvika korskontamineringar (tabell 2). Alla stammar finns tillgängliga i handeln på följande ställen:

1. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Central Science Laboratory, York, Storbritannien.
2. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen, Nederländerna.
3. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, Frankrike.

Tabell 1. SMT-referenslista för isolat av *R. solanacearum*

NCPBP-kod	SMT-nr #	Andra koder	Ursprungsland	Biovar
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypten	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4582, 550, EURS21	Turkiet	2
NCPBP 857	12	CFBP 4585, Pr 1140, EURS26	England	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Cypern	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Sverige	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgien	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Nederländerna	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Frankrike	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80	Portugal	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Spanien	2
NCPBP 4161	76	B3B	Tyskland	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	USA	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Colombia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasilien	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australien	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filippinerna	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmp2	Kina	5

(*) Använd en standardreferensstam av *R. solanacearum* biovar 2 (ras 3).

Anmärkning: Autenticiteten hos de ovan nämnda stammarna kan garanteras endast om de erhålls från en autentisk kultursamling.

Tabell 2. SMT referenspanel av serologiskt eller genetiskt besläktade bakterier för användning vid optimering av detektionstester.

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

⁽¹⁾ Potentiell korsreagerande stam i serologiska tester (IF och/eller ELISA) med polyklonala antiserum.

⁽²⁾ Stam från vilken PCR-kopia kan amplifieras i vissa laboratorier av storlek liknande den som förväntas vid användning av de specifika primärarna OLI-1 och Y-2 (se tillägg 6).

⁽³⁾ Kan korsreagera i de flesta test, något som dock endast har observerats på bananplanta i Indonesien.

b) Standardiserade kontrollmaterial tillgängliga i handeln

Följande standardkontrollmaterial kan fås från NCPPB:s kultursamling.

Frystorkade pelletar av potatisextrakt från 200 friska potatisknölar som negativa kontroller för alla tester.

Frystorkade pelletar av potatisextrakt från 200 friska potatisknölar innehållande 10^3 – 10^4 och 10^4 – 10^6 celler *R. solanacearum* biovar 2 (t.ex. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) som positiva kontroller för serologiska tester och PCR-tester. Eftersom cellernas livskraft påverkas under frystorkning, är dessa inte lämpliga som standardkontroller för isolerings- eller biotest.

Formalinfixerade suspensioner av *R. solanacearum* biovar 2 (stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) vid 10^6 celler per ml som positiva kontroller för serologiska test.

B. Preparering av positiva och negativa kontroller för de huvudsakliga screeningstesterna PCR/IF och FISH

Framställ en 48-timmarskultur av en virulent stam av virulent ras 3, biovar 2-stam av *R. solanacearum* (t.ex. stam NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) på SMSA-basismedium och suspendera i 10 mM fosfatbuffert för att erhålla en celltäthet av omkring 2×10^8 kolonibildande enheter per ml. Detta erhålls vanligtvis genom en svagt grumlig suspension med en optisk densitet av 0,15 vid 600 nm.

Avlägsna naveländarna från 200 knölar tagna från en odling som är känd för att vara fri från *R. solanacearum* 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 *R. solanacearum* till det första mikroröret. Skaka.

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

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

Preparera portioner 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 *R. solanacearum* 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 *R. solanacearum* påvisas i minst 10^6 - 10^4 celler/ml i de positiva kontrollerna och inte i någon i de negativa kontrollerna.

Tillägg 4

Buffertar för testförfaranden

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)
Flingor av lubrol	Deflockulering (*)	0,5 g
DC-silikonskumdämpning	Skumdämpningsmedel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfat	Antioxidant	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40000 (PVP-40)	Bindning av PCR-inhibitorer	50 g

(*) Används med homogeniseringsextraktionsmetod.

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	1,0 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).

3. Buffertar för indirekt ELISA-test

3.1 Coatingbuffert av dubbel styrka, pH 9,6.

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
Destillerat vatten	1,00 l

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

Natriumsulfit (0,2 %) kan vid behov tillsättas som antioxidationsmedel för att förhindra uppkomst av oxiderade aromatiska föreningar.

3.2 10 × fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,4

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

3.3 PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destillerat vatten	895 ml

3.4 Blockerings- (antikropps-)buffert (måste vara nyberedd).

10X PBS	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidon-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Mjölkpulver	0,5 g
Destillerat vatten	füll upp till 100 ml

3.5 Alkalisk fosfatas-substratlösning, pH 9,8

Dietanolamin	97 ml
Destillerat vatten	800 ml

Blanda och justera till pH 9,8 med koncentrerad HCl.

Fyll upp till 1 liter med destillerat vatten.

Tillsätt 0,2 g Mg Cl₂

Lös 2 tabletter à 5 mg av fosfatassubstrat (Sigma) per 15 ml lösning.

4. Buffertar för DASI ELISA-test

4.1 Coatingbuffert, pH 9,6.

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Destillerat vatten	1 000 ml

Lös upp ingredienserna och kontrollera pH 9,6.

4.2 10X fosfatbuffrad saltlösning (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	27,0 g
Destillerat vatten	1 000 ml

4.3 PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Destillerat vatten	950 ml

4.4 Coatingbuffert, pH 9,8

Dietanolamin	100 ml
Destillerat vatten	900 ml

Blanda och justera till pH 9,8 med koncentrerad HCl.

Tillägg 5

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

$$s = \pi^2/4G^2K^2 \quad \text{där} \quad i = \text{synfältskoefficient (varierar från 8 till 24 beroende på typen av okular)}$$

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 6

Validerade PCR-protokoll och PCR-reagens

Anmärkning: Preliminär testning bör möjliggöra reproducerbar upptäckt av minst 10^3 – 10^4 celler av *R. solanacearum* per ml provextrakt.

Den preliminära testningen bör dessutom inte visa några falska positiva resultat med en grupp utvalda bakteriestammar (se tillägg 3).

1. PCR-protokoll från Seal m.fl. (1993)

1.1 Oligonukleotidprimrar

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

Förväntad kopiesterlek från *R. solanacearum* templat-DNA = 288 bp

1.2 PCR-reaktionsblandningen

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	17,65 µl	
10 x PCR-buffert ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP-blandning (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Taq polymeras (5 U/µl) ⁽¹⁾	0,1 µl	0,5 U
Provolym	2,0 µl	
Total volym:	25 µl	

⁽¹⁾ Metoden validerades med Taq polymeras från Perkin Elmer (AmpliTaq) och Gibco BRL.

1.3 PCR-reaktionsbetingelser

Kör följande program:

1 cykel: i) 2 minuter vid 96 °C (denaturering av DNA-templat)
35 cykler: ii) 20 sekunder vid 94 °C (denaturering av DNA-templat)
 iii) 20 sekunder vid 68 °C (påkoppling av primers)
 iv) 30 sekunder vid 72 °C (förlängning av kopia)
1 cykel: v) 10 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)
 vi) håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning: Detta program optimerades för användning med en Perkin Elmer 9600 termocykel. Vid användning av andra modeller kan det komma att krävas modifiering av cyklerna ii, iii och iv.

1.4 Restriktionsenzymanalys av kopian

PCR-produkter som amplifierats från *R. solanacearum*-DNA producerar distinkt RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) med enzymet Ava II efter inkubation vid 37 °C.

2. PCR-protokoll från Pastrik och Maiss (2000)

2.1 Oligonukleotidprimrar

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

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

Förväntad kopiesterlek från *R. solanacearum* templat-DNA = 553 bp.

2.2 PCR-reaktionsblandning

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	16,025 µl	
10 x PCR-buffert (†)	2,5 µl	1 x (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 Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq polymeras (5 U/µl) (†)	0,1 µl	0,5 U
Provvolyum	5,0 µl	
Total volym:	25,0 µl	

(†) Metoderna validerades med Taq polymeras från Perkin Elmer (AmpliTaq) och Gibco BRL.

Anmärkning: Ursprungligen optimerad för MJ Research PTC 200 termocykel med Gibco Taq Polymeras. Perkin Elmer AmpliTaq och buffert kan även användas i samma koncentrationer.

2.3 PCR-reaktionsbetingelser

Kör följande program:

- 1 cykel: i) 5 minuter vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- 35 cykler: ii) 30 sekunder vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- iii) 30 sekunder vid 68 °C (påkoppling av primers)
- iv) 45 sekunder vid 72 °C (förlängning av kopia)
- 1 cykel: v) 5 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)
- vi) håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning: Detta program är optimerat för användning med en MJ Research PTC 200 termocykel. Vid användning av andra modeller kan det komma att krävas modifiering av cyklerna ii,iii och iv.

2.4 Restriktionsenzymanalys av kopian

PCR-produkter som amplifierats från *R. solanacearum*-DNA producerar distinkt RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) med enzymet Taq I efter inkubation vid 65 °C under 30 minuter. De restriktionsfragment som erhållits från fragment specifika för *R. solanacearum* är 457 bp och 96 bp i storlek.

3. Multiplexa PCR-protokoll med intern PCR-kontroll (Pastrik m.fl., 2002)

3.1 Oligonukleotidprimrar

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

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

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

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

Förväntad kopiesterlek från *R. solanacearum* templat-DNA = 718 bp (RS-primerset).

Förväntad kopiesterlek från 18S rRNA intern PCR-kontroll = 310 bp (NS-primerset).

3.2 PCR-reaktionsblandning

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	12,625 µl	
10 x PCR-buffert ⁽¹⁾ (15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	1 x (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 RS-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer RS-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Primer NS-5-F (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Primer NS-6-R (10 µM) ⁽²⁾	0,15 µl	0,06 µM
Taq polymeras (5 U/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) och Gibco BRL.

⁽²⁾ Koncentrationen av primrarna NS-5-F och NS-6-R optimerades för extraktion av potatisars naveländrar med användning av homogeniseringsmetoden och DNA-rening enligt Pastrik (2000) (se avsnitt VI.A.6.1.a.). Reoptimering av reagenskoncentrationerna krävs om extraktion genom skakning eller andra metoder för isolering av DNA används.

3.3 PCR-reaktionsbetingelser

Kör följande program:

- 1 cykel: i) 5 minuter vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- 35 cykler: ii) 30 sekunder vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- iii) 30 sekunder vid 58 °C (påkoppling av primers)
- iv) 45 sekunder vid 72 °C (förlängning av kopia)
- 1 cykel: v) 5 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)
- vi) håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning: Detta program är optimerat för användning med en MJ Research PTC 200 termocykel. Vid användning av andra modeller kan det komma att krävas modifiering av cyklerna ii, iii och iv.

3.4 Restriktionsenzymanalys av kopian

PCR-produkter som amplifierats från *R. solanacearum*-DNA producerar distinkt RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) med enzymet *Bsm* I eller en Isoschizomer (t.ex. *Mva* 1269 I) efter inkubation vid 65 °C under 30 minuter.

4. *R. solanacearum* biovar-specifika PCR-protokoll (Pastrik m.fl., 2001)

4.1 Oligonukleotidprimrar

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

Förväntad kopiестorlek från *R. solanacearum* templat-DNA:

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

med Rs-1-F/Rs-3-R = 716 bp

4.2 PCR-reaktionsblandningen.

a) Biovar 1/2-specifik PCR

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	12,925 µl	
10 x PCR-buffert (1)	2,5 µl	1 x (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 Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Primer Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq polymeras (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Provvolymer	5,0 µl	
Total volym:	25,0 µl	

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

b) Biovar 3/4/5-specifik PCR

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	14,925 µl	
10 x PCR-buffert (1)	2,5 µl	1 x (1,5 mM MgCl ₂)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-blandning (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Primer Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq polymeras (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1 U
Provvolymer	5,0 µl	
Total volym:	25,0 µl	

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

4.3 PCR-reaktionsbetingelser

Kör följande program för både biovar 1/2- och biovar 3/4/5-specifika reaktioner:

- 1 cykel: i) 5 minuter vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- 35 cykler: ii) 30 sekunder vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
- iii) 30 sekunder vid 58 °C (påkoppling av primers)
- iv) 45 sekunder vid 72 °C (förlängning av kopia)
- 1 cykel: v) 5 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)
- vi) håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning: Detta program optimerades för användning med en MJ Research PTC 200 termocykler. Vid användning av andra modeller kan det komma att krävas modifiering av cyklerna ii, iii och iv.

4.4 Restriktionsenzymanalys av kopian

PCR-produkter som amplifierats från *R. solanacearum*-DNA med användning av primrarna Rs-1-F och Rs-1-R producerar distinkt RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) med enzymet Bsm I eller en Isoschizomer (t.ex. Mva 1269 I) efter inkubation vid 65 °C under 30 minuter. PCR-kopior som amplifierats från *R. solanacearum*-DNA med användning av primrarna Rs-1-F och Rs-3-R har inga sekvenser som känns igen av restriktionsenzymer.

5. Preparering av laddningsbuffert**5.1 Bromtymolblått (10-procentig stocklösning)**

Bromtymolblått	5 g
Destillerat vatten (dubbeldestillerat)	50 ml

5.2 Laddningsbuffert

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

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

Tris-buffert	48,40 g
Iskall ättiksyra	11,42 ml
EDTA (dinatriumsalt)	3,72 g
Destillerat vatten	1,00 l

Späd till 1 x före användning.

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

Tillägg 7

Validerade reagens för FISH-test

1. Oligo-prober

R. solanacearum-specifik prob OLI-1-CY3 5'- GGC AGG TAG CAA GCT ACC CCC-3'

Icke-specifik eubakteriell prob EUB-338-FITC 5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

2. Fixeringslösning

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

- i) Upphetta 9 ml vatten av molekylärbiologisk 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-MÅTARE I VÄTSKOR MED PARAFORMALDEHYD.)
- iii) Filtrera lösningen genom ett 0,22 µm membranfilter och förvara dammfritt i 4 °C fram till användning.

3. 3 x Hybmix

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

Späd till 1 x i enlighet med kraven.

4. Hybridiseringslösning

1 x Hybmix	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,01 %
Formamid	30 %
prob EUB 338	5 ng/µl
prob OLI-1 eller OLI-2	5 ng/µl

Preparera de kvantiteter av hybridiseringslösning som anges i beräkningarna i tabellen. För varje glas (innehållande 2 olika prover i duplikat) krävs 90 µl hybridiseringslösning. OBS! FORMAMID ÄR MYCKET GIFTIGT! ANVÄND HANDSKAR OCH VIDTA NÖDVÄNDIGA FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER!

Tabell 1: Föreslagna kvantiteter för preparering av hybridiseringslösning.

Antal glas:	1	4	6	8	10
Sterilt ultrarent vatten	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3 x hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamid	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Probe EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Probe OLI - 1 eller OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Total volym (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

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

Äggplant- och tomatkulturer

Så fröer av tomat (*Lycopersicon esculentum*) eller äggplanta (*Solanum melongena*) i steril såjord. Fröplantorna utplanteras i steril planteringsjord då hjärtbladen är helt utvecklade (10 till 14 dagar).

Äggplantor eller tomater bör odlas i växthus under följande miljöförhållanden före inympning:

Dagslängd	14 timmar eller naturlig dagslängd om längre
Temperatur:	dag 21–24 °C natt 14–18 °C.
Mottaglig tomatsort:	'Moneymaker'
Mottaglig äggplantssort:	'Black Beauty'
För leverantörer,	se webbplats (http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)

REFERENSER

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

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

BILAGA III

1. Varje gång det föreligger misstanke om att skadegöraren förekommer och ett eller flera positiva screeningtest har genomförts för det förtecknade växtmaterialet eller i alla andra fall enligt den metod som anges i bilaga II, bör, i avvaktan på bekräftelse eller vederläggning genom slutförande av den nämnda metoden, bevaras och förvaras på lämpligt sätt tills metoden 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 dokumentation,

fram till slutförandet av de nämnda metoderna.

Genom bevaring av knölarerna kan vid behov sorttester göras.

2. Om förekomst av skadegöraren bekräftas, bör bevaras och förvaras på lämpligt sätt

- det material som specificeras i punkt 1,
och
- ett prov av det infekterade tomat- eller äggplantematerialet inokulerat med knöl- eller plantextrakt, i förekommande fall,
och
- den isolerade kulturen av skadegöraren,

fram till minst en månad efter anmälan enligt förfarandet i artikel 5.2.

—

BILAGA IV

Följande skall, när så är lämpligt, ingå i den utredning som anges i artikel 5.1 a i:

i) Produktionsplatser

- där potatis odlas eller har odlats ur kloner som är närbesläktade med potatis som har visat sig vara smittad av skadegöraren,
- där tomater odlas eller har odlats, vilka har samma härstamning som tomater som har visat sig vara smittade av skadegöraren,
- där potatis eller tomater odlas eller har odlats vilka har satts under officiell kontroll därför att det misstänks att skadegöraren förekommer,
- där potatis odlas eller har odlats ur kloner som är närbesläktade med potatis som har växt på produktionsplatser som befunnits vara infekterad av skadegöraren,
- där potatis eller tomater odlas i närheten av infekterade produktionsplatser, inklusive anknytning via produktionsutrustning och produktionsanordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör,
- där det för bevattning eller besprutning används ytvatten från någon källa som har bekräftats vara eller som misstänks vara infekterad av skadegöraren,
- där det för bevattning eller besprutning används ytvatten från en källa som även används på produktionsplatser som har bekräftats vara eller som misstänks vara infekterad av skadegöraren,
- som är översvämmade eller har översvämmats av ytvatten som bekräftats eller misstänks vara infekterad av skadegöraren.

ii) Ytvatten som används för bevattning eller besprutning av, eller som har översvämmat det eller de fält eller den eller de produktionsplatser som har bekräftats vara smittade av skadegöraren.

BILAGA V

1. Följande skall beaktas vid bestämningen av hur omfattande den troliga smitta som avses i artikel 5.1 a iii och 5.1 c iii är:
 - Det förtecknade växtmaterial som har odlats på en produktionsplats som förklaras smittad enligt artikel 5.1 a ii.
 - Den eller de produktionsplatser med anknytning till produktionen av det förtecknade växtmaterial som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a ii, inklusive anknytning via produktionsutrustning och anordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör.
 - Det förtecknade växtmaterial som har producerats på en eller flera sådana produktionsplatser som avses i föregående strecksats, eller som har förvarats på en eller flera sådana produktionsplatser under den tid då det förtecknade växtmaterial som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a ii befann sig på de produktionsplatser som avses i första strecksatsen.
 - Anläggningar som hanterar det förtecknade växtmaterialet från de produktionsplatser som avses 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 det förtecknade växtmaterial som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a ii.
 - All växtmaterial som har lagrats i, eller kommit i kontakt med, något av de föremål som anges i föregående strecksats innan dessa föremål hade rengjorts och sanerats.
 - Till följd av den undersökning och de test som avses i artikel 5.1 a i, i fråga om potatis, de knölar eller plantor som har ett syster- eller moderförhållande genom kloning och i fråga om tomater de plantor med samma källa som det förtecknade växtmaterial som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a ii och som trots att det kan ha givit negativt svar när det testats för skadegöraren, sannolikt är smittat via ett kloningssamband. Sortstester 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 det förtecknade växtmaterial som avses i föregående strecksats.
 - Den eller de produktionsplatser för det förtecknade växtmaterialet där det för bevattning eller besprutning används sådant vatten som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 c ii.
 - Det förtecknade växtmaterial som produceras på fält som översvämmats av ytvatten som bekräftats vara smittat.
2. Följande skall beaktas vid fastställandet av den möjliga spridning som avses i artikel 5.1 a iv och 5.1 c iii:
 - i) För fall som behandlas i artikel 5.1 a iv:
 - Närheten till andra produktionsplatser där det förtecknade växtmaterialet odlas.
 - Den gemensamma produktionen och användningen av partierna av utsädespotatis.
 - Produktionsplatser som använder ytvatten för bevattning eller besprutning av förtecknat växtmaterial i fall då det finns eller har funnits en risk för ytvattenströmningar från eller översvämmning av den eller de produktionsplatser som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a ii.

- ii) För fall då ytvattnet har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 c ii skall följande beaktas:
- Produktionsplatser där det produceras förtecknat växtmaterial och som gränsar till eller riskerar att bli översvämmade av ytvatten som har förklarats smittat.
 - Alla åtskilda bevattningsdammar som är förbundna med det ytvatten som har förklarats smittat.
 - Vatten i anslutning till sådant ytvatten som har förklarats smittat, varvid hänsyn skall tas till följande:
 - Flödet och flödesriktningen hos det vatten som förklarats smittat.
 - Förekomsten av vilda värdväxter av familjen *solanaceae*.

3. Den anmälan som avses i artikel 5.2 första stycket skall göras enligt följande:

- Den skall avgas omedelbart efter det att förekomst av skadegöraren har bekräftats av laborietester, vilka utförts med tillämpning av de metoder som anges i bilaga II, och omfatta minst följande:
 - För potatis
 - a) partiets sortnamn,
 - b) partiets typ (matpotatis, utsädespotatis m.m.) och i förekommande fall utsädeskategori.
 - För tomatplantor, partiets sortnamn och, i tillämpliga fall, kategori.
- Utan att detta påverkar tillämpningen av kraven på anmälning av misstänkt förekomst enligt artikel 4.3, skall de medlemsstater där förekomst bekräftats, när det föreligger risk för smitta av förtecknat växtmaterial från eller i en annan medlemsstat eller andra medlemsstater, genast meddela den berörda medlemsstaten eller de berörda medlemsstaterna vilken information som behövs för att iaktta artikel 5.3, såsom
 - a) potatis- eller tomatpartiets sortnamn,
 - b) exportörens respektive mottagarens namn och adress,
 - c) potatis- eller tomatpartiets leveransdatum,
 - d) storleken på det potatis- eller tomatparti som levereras,
 - e) 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.

4. Innehållet i den tilläggsanmälan som avses i artikel 5.2 andra stycket skall uppfylla följande:

Anmälan skall avgas efter det att alla undersökningar har avslutats, och varje undersökning skall innehålla

- a) det datum då smittan bekräftades,
- b) en kort beskrivning av den undersökning som gjorts för att identifiera källa och möjlig spridning av smittan, samt på vilken nivå provtagningen har skett,
- c) information om smittans identifierade eller misstänkta källor,
- d) detaljerade uppgifter om den angivna smittans omfattning, inklusive antalet produktionsställen och, för potatis, antalet partier med uppgifter om sort och, i fall av utsädespotatis, kategori,

- e) detaljerade uppgifter om det område som har avgränsats, inklusive det antal produktionsplatser som inte har förklarats smittade men inkluderats i området,
 - f) detaljerade uppgifter om de vatten som förklarats smittade, inklusive namn, placering och omfattningen hos dessa samt omfattningen av bevattningsförbudet,
 - g) för alla sändningar med eller partier av tomatplantor som har förklarats smittade, de certifikat som föreskrivs i artikel 13.1 ii i direktiv 2000/29/EG och växtpassnummer i enlighet med förteckningen i del A avsnitt I.2.2 i bilaga V till direktiv 2000/29/EG,
 - h) annan information som bekräftar förekomsten (förekomsterna) av smitta och som kommissionen kan kräva.
-

BILAGA VI

1. De bestämmelser som det hänvisas till i artikel 6.1 skall vara följande:

- Användning som djurfoder efter värmebehandling av en typ som innebär att det inte finns någon risk för att skadegöraren har överlevt.
- Bortskaffande på en officiellt godkänd för ändamålet avsedd upplagsplats för avfall där det inte finns någon identifierbar risk för att organismen sprids till omgivningen, t.ex. genom läckage till jordbruksmark eller kontakt med vattenkällor som skulle kunna användas vid bevattning av 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 någon av ovanstående åtgärder skall bortskaffas genom officiellt godkända metoder i överensstämmelse med bilaga VII till detta direktiv.

2. För att under tillsyn av de berörda medlemsstaternas ansvariga officiella organ använda eller bortförskaffa det förtecknade växtmaterial som avses i artikel 6.2, med lämplig kommunikation mellan ansvariga officiella organ för att alltid säkerställa sådan tillsyn och godkännande av ansvarigt officiellt 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:

i) När det gäller potatisknölar:

- 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 sättningsfår 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.

ii) När det gäller andra växtdelar, inklusive avfall från skaft och blad:

- Destruktion.
- 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 sanera de föremål som avses i artikel 6.3 skall vara rengöring och när så är lämpligt desinfektion, så att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids. Metoderna skall tillämpas under övervakning av medlemsstaternas ansvariga officiella organ.
4. Den serie åtgärder som medlemsstaterna skall vidta inom det eller de avgränsade områden som upprättas i enlighet med artikel 5.1 a iv och 5.1 c iii och som avses i artikel 6.4 skall inkludera följande:
 - 4.1. På produktionsplatser som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a ii:
 - a) På fält eller enheter med skyddad växtproduktion som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a ii, gäller antingen följande:
 - i) Under åtminstone de fyra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades smittat
 - skall åtgärder vidtas för att utrota övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter för skadegöraren inklusive ogräs av familjen *solanaceae*,
 - och
 - får det inte planteras
 - knölar, plantor eller frön av potatis,
 - tomatplantor och tomatfrön,
 - med hänsyn till skadegörarens biologiska egenskaper,
 - andra värdväxter,
 - växter av arten *Brassica*, på vilka det finns en identifierad risk att skadegöraren överlever,
 - grödor som medför en identifierad risk för att skadegöraren kommer att spridas,
 - under den första växtsäsongen för potatis eller tomater efter den period som fastställs i föregående strecksats, och på villkor att fältet har förklarats vara fritt från övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter, inklusive ogräs av familjen *solanaceae* vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering,
 - får, när det gäller potatis, endast produktion av annan potatis än utsädespotatis tillåtas,
 - skall, när det gäller potatis och tomater, de skördade potatisknölarna eller tomatplantorna testas enligt de förfaranden som anges i bilaga II,
 - skall, under den potatis- eller tomatväxtsäsong som följer på den som avses i föregående strecksats och efter en lämplig växtföljdscykel som skall omfatta minst två år om det gäller odling av utsädespotatis, en officiell undersökning göras i enlighet med artikel 2.1,
 - eller följande:
 - ii) Under de fem odlingsåren som följer på det år då fältet förklarades smittat
 - skall åtgärder vidtas för att utrota övervintrade potatis- och tomatplantor, liksom andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren inklusive ogräs av familjen *solanaceae*,
 - och
 - skall fältet under de första tre åren läggas och bibehållas antingen i helträda eller med spannmål i enlighet med den identifierade risken eller med permanent betesmark som slås ofta respektive betas intensivt eller som gräs för utsädesproduktion, följt under de följande två åren av plantering av växter som inte är värdväxter för skadegöraren och som därmed inte utgör någon identifierad risk för att skadegöraren överlever eller sprids,

- under den första växtsäsongen för potatis eller tomat efter den period som fastställs i föregående strecksats, och på villkor att fältet har förklarats vara fritt från övervintrade potatis- och tomatplantor och andra värdväxter, inklusive ogräs av familjen *solanaceae* vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering
 - skall, när det gäller potatis, produktion av utsädespotatis och annan potatis tillåtas,
 - skall de skördade potatisknölarna eller tomatplantorna testas enligt de förfaranden som anges i bilaga II.
- b) På alla andra fält tillhörande den smittade produktionsplatsen och på villkor att de ansvariga officiella organen har förvisat sig om att risken för plantor från övervintrade potatis och tomat och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, inklusive ogräs av familjen *Solanaceae* i tillämpliga fall, har undanröjts gäller följande:
 - 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 värdväxter för skadegöraren planteras,
 - eller
 - får, när det gäller potatisknölar, certifierad utsädespotatis endast planteras för produktion av annan potatis än utsädespotatis,
 - får, när det gäller tomatplantor, endast tomatplantor som odlats av frön som uppfyller kraven i direktiv 2000/29/EG planteras, och endast för fruktproduktion.
 - Under det andra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat
 - får, när det gäller potatis, endast certifierad utsädespotatis eller utsädespotatis som genomgått officiella tester avseende mörk ringröta och som odlats under officiell kontroll på andra produktionsställen än dem som anges i punkt 4.1 planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,
 - får, när det gäller tomat, endast tomatplantor som odlats av frön som uppfyller kraven i direktiv 2000/29/EG eller, om de har förökats på vegetativ väg, som kommer från tomatplantor framställda från sådana frön och odlade under officiell kontroll på andra produktionsplatser än de som anges i punkt 4.1, planteras för antingen plant- eller fruktproduktion.
 - Under åtminstone de tre odlingsår som följer på det år då fältet förklarades smittat
 - får, när det gäller potatis, endast certifierad utsädespotatis eller utsädespotatis som odlats under officiell kontroll och kommer från certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,
 - får, när det gäller tomat, endast certifierade tomatplantor som odlats av frön som uppfyller kraven i direktiv 2000/29/EG eller som odlats under officiell kontroll från sådana plantor planteras för antingen plant- eller fruktproduktion,
 - skall, för vart och ett av de odlingsår som anges i föregående strecksats, åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrade knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, en officiell inspektion av den växande grödan utföras, och en officiell testning görs av de skördade potatisarna på varje potatisfält enligt det förfarande som anges i bilaga II.
- c) Omedelbart efter förklaringen om smitta enligt artikel 5.1 a ii och efter det första därpå följande odlingsåret
 - skall alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts vid potatis- eller tomatproduktion rengöras och, när så är lämpligt, desinfekteras med lämpliga metoder enligt punkt 3,
 - skall officiella kontroller av program för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot detta, införas enligt vad som är lämpligt, för att hindra att skadegöraren sprids.

- d) I en enhet med skyddad växtproduktion som har förklarats smittad i enlighet med artikel 5.1 a ii, där det är möjligt att fullständigt byta ut odlingsmediet
- får knölar, planter eller frön av potatis eller andra värdväxter för skadegöraren inklusive tomatplanter och utsäde planteras endast om produktionsenheten har underkastats officiellt övervakade åtgärder för att utrota skadegöraren och avlägsna allt material från värdväxter, inklusive åtminstone ett totalt byte av odlingsmedium och rengöring och, där så är lämpligt, desinfektion av den angivna enheten och all utrustning, och därefter av de ansvariga officiella organen har godkänts för potatis- eller tomatproduktion,
 - skall, när det gäller potatisproduktion, denna produktion komma från officiellt certifierad utsädespotatis, eller från miniknölar eller mikroplanter som härstammar från undersökta källor,
 - skall, för tomatproduktion, produktionen komma från frön som uppfyller kraven i direktiv 2000/29/EG eller, om de har förökats på vegetativ väg, som kommer från tomatplanter framställda från sådana frön och odlade under officiell kontroll,
 - skall officiella kontroller av program för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot detta, införas enligt vad som är lämpligt, för att hindra att skadegöraren sprids.

4.2. Utan att det påverkar tillämpningen av åtgärderna i 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 potatis- eller tomatproduktionen rengörs och desinfekteras på lämpligt sätt och med lämpliga metoder enligt punkt 3,
- b) omedelbart, och under åtminstone tre vegetationsperioder efter det att området har förklarats smittat,
- ba) när det avgränsade området har fastställts enligt artikel 5.1 a iv
- säkerställa övervakning genom sina ansvariga officiella organ av anläggningar där potatisknölar eller tomater odlas, lagras eller hanteras, och av anläggningar som bedriver entreprenadverksamhet med maskiner för potatis- och tomatproduktion,
 - 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 smittade enligt artikel 5.1 a iii, 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 ett system för rengöring och, när så är lämpligt, desinfektion mellan hanteringen av partier av utsädespotatis och partier av annan potatis,
 - kräva att plantering sker endast av tomatplanter från frön som uppfyller kraven i direktiv 2000/29/EG eller, om de har förökats på vegetativ väg, som kommer från tomatplanter framställda från sådana frön och odlade under officiell kontroll,
 - genomföra en officiell undersökning enligt artikel 2.1,
- bb) när ytvattnet har förklarats smittat enligt artikel 5.1 c ii eller kan finnas med bland de faktorer som kan sprida skadegöraren i enlighet med punkt 2 i bilaga V
- genomföra en årlig undersökning vid lämplig tidpunkt som omfattar provtagning av ytvatten och, i förekommande fall, värdväxter av familjen *solanaceae* i de relevanta vattnen och testning enligt de lämpliga metoder som anges i bilaga II för det förtecknade växtmaterialet och för övriga fall,

- införa officiella kontroller av programmen för bevattning och duschning, inklusive ett förbud mot att vatten som förklarats smittat används för bevattning och duschning av förtecknat växtmaterial, och, när så är lämpligt, av andra värdväxter för att hindra att skadegöraren sprids. Detta förbud kan tas upp till granskning igen mot bakgrund av resultaten från den nämnda årliga undersökningen, och förklaringar om smitta kan upphävas om de ansvariga officiella organen har förvissat sig om att ytvattnet inte längre är smittat. Användning av vatten som belagts med förbud får tillåtas för bevattning och duschning av värdväxter, om detta sker under officiell kontroll och om officiellt godkänd teknik som utrotar skadegöraren och förhindrar dess spridning används,
 - när spillvattnets utlopp är smittade, införa officiella kontroller av bortskaffandet av utsläpp av fast och flytande avfall från anläggningar för industriell bearbetning eller förpackning av förtecknat växtmaterial,
- c) upprätta ett program, när så är lämpligt, för att ersätta alla partier utsädespotatis under en lämplig tidsperiod.
-

BILAGA VII

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

- i) Potatis- och tomatavfall (även kasserad potatis, skal och tomater) och allt annat fast avfall som kommit i kontakt med potatisen och tomaterna (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 eller kontakt med jordbruksmark eller vattenkällor som kan komma att användas för bevattning av 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 eller vattenkällor som kan komma att användas för bevattning av 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.”
