Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationsquelle, für deren Richtigkeit die Organe der Gemeinschaften keine Gewähr übernehmen

►**B**

RICHTLINIE 93/85 /EWG DES RATES

vom 4. Oktober 1993

zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel

(ABl. L 259 vom 18.10.1993, S. 1)

Geändert durch:

		Amtsblatt		
		Nr.	Seite	Datum
►**M1**	Richtlinie 2006/56/EG der Kommission vom 12. Juni 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

RICHTLINIE 93/85 /EWG DES RATES

vom 4. Oktober 1993

zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel

DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft, insbesondere auf Artikel 43,

auf Vorschlag der Kommission ([1]),

nach Stellungnahme des Europäischen Parlaments ([2]),

nach Stellungnahme des Wirtschafts- und Sozialausschusses ([3]),

in Erwägung nachstehender Gründe:

Die Kartoffelerzeugung nimmt in der Landwirtschaft der Gemeinschaft einen wichtigen Platz ein. Die Ernteerträge sind jedoch ständig durch Schadorganismen bedroht.

Mit dem Schutz des Kartoffelanbaus gegen diese Schadorganismen soll nicht nur die Produktionskapazität erhalten, sondern auch die Produktivität der Landwirtschaft gesteigert werden.

Die Schutzmaßnahmen gegen die Einschleppung von Schadorganismen in das Gebiet eines Mitgliedstaats wären nur von begrenzter Wirkung, wenn diese Schadorganismen nicht in der gesamten Gemeinschaft gleichzeitig systematisch bekämpft und nicht Maßnahmen zur Verhinderung ihrer Ausbreitung getroffen würden.

Einer der für die Kartoffel gefährlichen Schadorganismen ist Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., der Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel. Diese Krankheit ist in einigen Teilen der Gemeinschaft aufgetreten, und es gibt immer noch einige kleinere Befallsherde.

Der Kartoffelanbau in der gesamten Gemeinschaft ist in beträchtlichem Maße gefährdet, wenn nicht wirksame Maßnahmen getroffen werden, um den Krankheitsherd zu ermitteln, das Auftreten der Krankheit zu verhüten bzw. diese nach der Feststellung zu bekämpfen, um einer Verschleppung vorzubeugen bzw. die Krankheit zu tilgen.

Um dies sicherzustellen, müssen in der Gemeinschaft bestimmte Maßnahmen getroffen werden. Außerdem müssen die Mitgliedstaaten die Möglichkeit haben, notfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zu treffen, sofern der innergemeinschaftliche Handel mit Kartoffeln nicht über das nach der Richtlinie 77/93/EWG des Rates vom 21. Dezember 1976 über Maßnahmen zum Schutz der Gemeinschaft gegen die Einschleppung und Ausbreitung von Schadorganismen der Pflanzen und Pflanzenerzeugnisse ([4]) zulässige Maß hinaus behindert wird. Diese Maßnahmen sind den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.

Mit der Richtlinie 80/665/EWG des Rates vom 24. Juni 1980 zur Bekämpfung der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel ([5]) sind die von den Mitgliedstaaten gegen diese Krankheit zu treffenden Mindestmaßnahmen festgelegt worden.

Seither hat es neue wichtige Erkenntnisse in bezug auf die bakterielle Ringfäule und die Ermittlung des Erregers der bakteriellen Ringfäule gegeben.

([1]) ABl. Nr. C 93 vom 2. 4. 1993, S. 12.
([2]) ABl. Nr. C 176 vom 28. 6. 1993, S. 210.
([3]) ABl. Nr. C 161 vom 14. 6. 1993, S. 18.
([4]) ABl. Nr. L 26 vom 31. 1. 1977, S. 20. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 92/l03/EWG der Kommission (ABl. Nr. L 363 vom 11. 12. 1992, S. 1).
([5]) ABl. Nr. L 180 vom 14. 7. 1980, S. 30.

▼B

Zur Anwendung der gemeinschaftlichen Pflanzenschutzregelung in einer Gemeinschaft ohne Binnengrenzen war die Überprüfung und Neufassung einiger Vorschriften der Richtlinie 80/665/EWG erforderlich.

Dabei hat sich gezeigt, daß die Vorschriften der Richtlinie unzureichend sind und daß die Maßnahmen genauer umschrieben werden müssen.

Angesichts dessen sollte die Richtlinie 80/665/EWG aufgehoben und sollten die erforderlichen Maßnahmen erlassen werden.

Es muß berücksichtigt werden, daß der Erreger latent und unentdeckt sowohl in Feldbeständen als auch in eingelagerten Kartoffelknollen überleben und daher wirksam nur durch die Erzeugung und Verwendung von befallsfreien Pflanzkartoffeln bekämpft werden kann; zur Feststellung der Krankheit und zur Ermittlung ihres Ausgangspunktes sind darüber hinaus systematische amtliche Untersuchungen nötig. Die Ausbreitung des Erregers in Feldbeständen stellt nicht den wichtigsten Faktor dar, doch kann der Erreger im Durchwuchs überwintern, der damit die bedeutendste Infektionsquelle für die Übertragung von einer Vegetationsperiode zur nächsten darstellt. Die Verbreitung erfolgt hauptsächlich durch Kontakt mit befallenen Kartoffeln, mit Pflanz-, Ernte- und anderen Maschinen oder Geräten sowie mit Transport- oder Lagerbehältnissen, die durch früheren Kontakt mit befallenen Kartoffeln kontaminiert worden sind. Diese kontaminierten Gegenstände können während einer gewissen Zeit Träger von Krankheitserregern bleiben. Die Ausbreitung des Erregers kann durch Desinfizierung dieser Gegenstände eingedämmt oder verhindert werden. Die Kontamination von Pflanzkartoffeln stellt eine sehr große Gefahr im Hinblick auf die Verbreitung des Erregers dar.

Zur Festlegung der Einzelheiten dieser allgemeinen Maßnahmen sowie der strengeren oder zusätzlichen Maßnahmen, die von den Mitgliedstaaten getroffen werden können, um die Einschleppung des Erregers auf ihr Gebiet zu verhindern, empfiehlt es sich, daß die Mitgliedstaaten mit der Kommission in dem Ständigen Ausschuß für Pflanzenschutz, nachstehend „Ausschuß" genannt, eng zusammenarbeiten —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

Artikel 1

Diese Richtlinie betrifft die in den Mitgliedstaaten zu treffenden Maßnahmen gegen Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Korthoff) Davis et al., den Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (nachstehend „der Schadorganismus" genannt), mit denen folgendes erreicht werden soll:

a) Ermittlung des Ausgangspunktes der Krankheit und Feststellung ihrer Verbreitung,

b) Verhütung des Auftretens und der Ausbreitung bzw.

c) bei Befall Verhütung der Ausbreitung und Bekämpfung mit dem Ziel der Tilgung.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten führen systematische amtliche Erhebungen über das Auftreten des Schadorganismus an Kartoffelknollen und erforderlichenfalls Kartoffelpflanzen (Solanum tuberosum L.) mit Ursprung auf ihrem Gebiet durch, um die Befallsfreiheit zu bestätigen.

Für diese Erhebungen werden im Fall von Kartoffelknollen Proben von Pflanzkartoffeln und anderen Kartoffeln, vorzugsweise aus eingelagerten Partien, entnommen und nach dem Verfahren des Anhangs I amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchungen zur Feststellung und Diagnose des Schadorganismus unterzogen. Zusätzlich kann gegebenenfalls eine amtliche oder amtlich überwachte Beschau nach Durchschneiden von Knollen aus anderen Proben vorgenommen werden.

Im Fall von Kartoffelpflanzen werden diese Erhebungen nach geeigneten Verfahren durchgeführt und die Proben amtlichen oder amtlich überwachten Untersuchungen unterzogen.

▼B

Anzahl, Herkunft und Zusammensetzung der Proben und der Entnahmezeitpunkt werden von den zuständigen amtlichen Stellen im Sinne der Richtlinie 77/93/EWG nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsät- zen und nach Maßgabe der Biologie des Schadorganismus sowie unter Berücksichtigung der besonderen Kartoffelerzeugungssysteme der betreffenden Mitgliedstaaten festgelegt. Die diesbezüglichen Einzelheiten werden jährlich den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt, um die Gleichwertigkeit der Garantien der Mitgliedstaaten in bezug auf die Befallsfreiheit zu gewährleisten.

(2) Die übrigen Mitgliedstaaten und die Kommission werden mindestens einmal jährlich über die Ergebnisse der in Absatz l genannten amtlichen Erhebungen unterrichtet. Die Einzelheiten dieser Unterrichtung sind vertraulich. Sie können dem Ausschuß nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgelegt werden.

(3) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Einzelheiten der in Absatz l vorgesehenen Erhebungen, die nach anerkannten wissenschaftlichen und statistischen Grundsätzen durchzuführen sind;

— die Einzelheiten der in Absatz 2 vorgesehenen Unterrichtung.

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG wird folgendes festgelegt:

— das geeignete Verfahren für die Erhebungen und die Untersuchungen gemäß Absatz l Unterabsatz 3.

Artikel 3

Die Mitgliedstaaten sorgen dafür, daß jeglicher Verdacht des Auftretens des Schadorganismus in ihrem Hoheitsgebiet oder die Bestätigung eines solchen Verdachts bei Kartoffelpflanzen oder -knollen bzw. geernteten, eingelagerten oder vermarkteten Kartoffelknollen ihren hierfür zuständigen amtlichen Stellen gemeldet wird.

Artikel 4

(1) Bei Verdacht des Auftretens des Schadorganismus müssen die zuständigen amtlichen Stellen des Mitgliedstaats, in dem diese Verdachtsfälle gemeldet worden sind, gewährleisten, daß amtliche oder amtlich überwachte Laboruntersuchungen nach dem Verfahren des Anhangs I und in Anwendung der Vorschriften gemäß Anhang II Nummer l durchgeführt und abgeschlossen werden, um den Verdacht abzuklären. Bei Bestätigung des Verdachts gelten die Vorschriften gemäß Anhang II Nummer 2.

(2) Bis zur Abklärung des Verdachts im Sinne von Absatz l müssen bei Verdachtsfällen, bei denen

i) verdächtige sichtbare Symptome der Krankheit diagnostiziert wurden oder

ii) ein Immunfluoreszenztest gemäß Anhang I oder ein anderer geeigneter Test positiv ausgefallen ist,

die zuständigen amtlichen Stellen der Mitgliedstaaten

a) die Verbringung aller Partien oder Sendungen verbieten, aus denen die Proben entnommen worden sind, es sei denn, die Verbringung erfolgt unter ihrer Überwachung und es ist nachgewiesen worden, daß keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht;

b) Schritte unternehmen, um den Ursprung des vermuteten Befalls festzustellen;

c) auf der Grundlage einer Risikoeinschätzung weitere angemessene Vorsichtsmaßnahmen treffen, um eine Verschleppung des Schadorganismus zu verhindern; hierzu gehört unter Umständen auch die amtliche Kontrolle der Verbringung aller sonstigen Knollen oder Pflanzen innerhalb von oder aus Betrieben, die mit dem vermuteten Auftreten in Zusammenhang stehen.

▼B

(3) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Maßnahmen gemäß Absatz 2 Buchstabe c).

(4) Nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG wird festgelegt:

— der andere geeignete Test gemäß Absatz 2 Ziffer ii).

Artikel 5

(1) Wird bei amtlichen oder amtlich überwachten Laboruntersuchungen, die nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführt werden, der Verdacht auf ein Vorhandensein des Schadorganismus in einer Probe von Knollen, Pflanzen oder Pflanzenteilen bestätigt, so müssen die zuständigen amtlichen Stellen eines Mitgliedstaats unter Berücksichtigung anerkannter wissenschaftlicher Grundsätze, der Biologie des Schadorganismus und der besonderen Produktions-, Vermarktungs- und Verarbeitungssysteme in dem betreffenden Mitgliedstaat

a) die Knollen oder Pflanzen, die Partie und/oder Sendung, die Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, aus denen die Probe entnommen wurde, sowie gegebenenfalls den (die) Produktionsort(e) und die Anbaufläche(n), in denen die Knollen oder Pflanzen geerntet wurden, für kontaminiert erklären;

b) unter Berücksichtigung von Anhang III Nummer l das Ausmaß der wahrscheinlichen, durch Kontakt vor oder nach Ernte oder durch produktionstechnische Berührungspunkte hervorgerufenen Kontamination bestimmen und

c) auf der Grundlage der Kontaminationserklärung gemäß Buchstabe a), der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Buchstabe b) und der möglichen Ausbreitung des Schadorganismus eine Zone (Sicherheitszone) unter Berücksichtigung von Anhang III Nummer 2 abgrenzen.

(2) Die Mitgliedstaaten unterrichten die übrigen Mitgliedstaaten und die Kommission gemäß Anhang III Nummer 3 unverzüglich über jede Kontaminationserklärung gemäß Absatz l Buchstabe a) und die Einzelheiten der Zonenabgrenzung gemäß Absatz l Buchstabe c).

Die Einzelheiten dieser Unterrichtung sind vertraulich. Sie können dem Ausschuß nach dem Verfahren des Artikel 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgelegt werden.

(3) Infolge der Unterrichtung gemäß Absatz 2 und der dabei mitgeteilten Einzelheiten geben andere darin genannte Mitgliedstaaten gegebenenfalls Kontaminationserklärungen gemäß Absatz l Buchstabe a) ab, bestimmen das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Absatz l Buchstabe b) und grenzen eine Sicherheitszone gemäß Absatz l Buchstabe c) ab.

Artikel 6

Für den Fall, daß Knollen oder Pflanzen gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe a) für kontaminiert erklärt worden sind, schreiben die Mitgliedstaaten vor, daß der Kartoffelbestand, der mit dem befallenen Bestand klonal verbunden ist, gemäß Artikel 4 Absatz l untersucht wird. Die Untersuchungen werden vorzugsweise nach Risikograd vorgenommen und erfassen so viele Knollen oder Pflanzen, wie nötig sind, um den wahrscheinlichen Ausgangspunkt und das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination festzustellen.

Je nach Untersuchungsergebnis wird gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe a), b) bzw. c) gegebenenfalls eine weitere Kontaminationserklärung vorgenommen, das Ausmaß der wahrscheinlichen Kontamination neu bestimmt und die Sicherheitszone neu abgegrenzt.

▼B

Artikel 7

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe a) für kontaminiert erklärt worden sind, nicht angebaut werden dürfen und unter Kontrolle der zuständigen amtlichen Stellen

— entweder vernichtet oder

— im Rahmen einer amtlich überwachten Maßnahme oder amtlich überwachter Maßnahmen gemäß Anhang IV Nummer l auf andere Weise beseitigt werden, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

(2) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe b) für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, nicht angebaut werden dürfen und unbeschadet der Ergebnisse der in Artikel 6 genannten Untersuchung von klonal verbundenen Beständen unter Überwachung der zuständigen amtlichen Stellen einer geeigneten Verwendung oder Behandlung gernäß Anhang IV Nummer 2 zugeführt werden, sofern nachweislich keine Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus besteht.

(3) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Geräte, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe a) für kontaminiert oder gemäß Buchstabe b) für wahrscheinlich kontaminiert erklärt worden sind, entweder vernichtet oder nach geeigneten Verfahren gemäß Anhang IV Nummer 3 gereinigt und desinfiziert werden müssen. Nach der Desinfizierung gelten diese Gegenstände als nicht mehr kontaminiert.

(4) Unbeschadet der Maßnahmen gemäß den Absätzen l, 2 und 3 schreiben die Mitgliedstaaten für die Sicherheitszone gemäß Artikel 5 Absatz l Buchstabe c) das Maßnahmenpaket gemäß Anhang IV Nummer 4 vor.

Artikel 8

(1) Die Mitgliedstaaten schreiben vor, daß Pflanzkartoffeln den Anforderungen der Richtlinie 77/93/EWG genügen und in direkter Linie von Pflanzenmaterial stammen müssen, das im Rahmen eines amtlich genehmigten Programms gewonnen und infolge von Untersuchungen, die entweder amtlich oder unter amtlicher Überwachung nach dem Verfahren des Anhangs I durchgeführt worden sind, als frei, vom Schadorganismus befunden wurde.

Die vorgenannten Untersuchungen werden durchgeführt

— in den Fällen, in denen die Pflanzkartoffelerzeugung von der Kontamination betroffen ist, an den Pflanzen des klonalen Ausgangsmaterials;

— in anderen Fällen entweder an den Pflanzen des klonalen Ausgangsmaterials oder an repräsentativen Stichproben des Basispflanzguts oder früherer Generationen.

(2) Nach dem Verfahren des Artikel 16a der Richtlinie 77/93/EWG können festgelegt werden:

— die Durchführungsbestimmungen zu Absatz l Unterabsatz 2 erster Gedankenstrich und

— die Vorschriften betreffend die repräsentativen Stichproben gemäß Absatz l Unterabsatz 2 zweiter Gedankenstrich.

Artikel 9

Die Mitgliedstaaten verbieten das Halten des Schadorganismus sowie das Arbeiten mit diesem Schadorganismus.

Artikel 10

Unbeschadet der Bestimmungen der Richtlinie 77/93/ EWG können die Mitgliedstaaten für wissenschaftliche Untersuchungen und Versuche sowie Züchtungsvorhaben Ausnahmen von den in den Artikeln 6, 7 und

▼B

9 der vorliegenden Richtlinie genannten Maßnahmen zulassen, soweit hierdurch die Bekämpfung des Schadorganismus nicht beeinträchtigt wird und keine Gefahr seiner Verschleppung entsteht.

Artikel 11

Die Mitgliedstaaten können erforderlichenfalls zusätzliche oder strengere Maßnahmen zur Bekämpfung des Schadorganismus oder zur Verhütung seiner Ausbreitung erlassen, sofern sie mit den Bestimmungen der Richtlinie 77/93/ EWG in Einklang stehen.

Zu den zusätzlichen Maßnahmen nach Absatz l kann die Vorschrift gehören, daß nur Pflanzkartoffeln angebaut werden dürfen, die amtlich zertifiziert bzw. amtlich darauf untersucht worden sind, daß sie die erforderlichen Pflanzenschutzvorschriften erfüllen. Diese Vorschrift könnte ins- besondere in Fällen Anwendung finden, bei denen Erzeuger in ihrem eigenen Betrieb Pflanzkartoffeln aus eigenem Anbau verwenden dürfen, sowie in anderen Fällen, in denen selbsterzeugte Pflanzkartoffeln angebaut werden.

Die Einzelheiten dieser Maßnahmen werden den übrigen Mitgliedstaaten und der Kommission mitgeteilt.

Artikel 12

Die aufgrund neuer wissenschaftlicher und technischer Erkenntnisse notwendig werdenden Änderungen der Anhänge dieser Richtlinie werden nach dem Verfahren des Artikels 16a der Richtlinie 77/93/EWG vorgenommen.

Artikel 13

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen und veröffentlichen bis zum 15. November 1993 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie unterrichten die Kommission unverzüglich davon.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in den Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten der Bezugnahme.

Sie wenden diese Vorschriften ab 16. November 1993 an.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission unverzüglich alle innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen. Die Kommission setzt die anderen Mitgliedstaaten davon in Kenntnis.

Artikel 14

Die Richtlinie 80/665/EWG wird zum 16. November 1993 aufgehoben.

Artikel 15

Diese Richtlinie ist an die Mitgliedstaaten gerichtet.

▼**M1**

ANHANG I

TESTSCHEMA FÜR DIE DIAGNOSE, DEN NACHWEIS UND DIE IDENTIFIZIERUNG DES ERREGERS DER BAKTERIELLEN RINGFÄULE DER KARTOFFEL, *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* **(Smith) Davis** *et al.* **ssp.** *SEPEDONICUS* **(Spieckermann et Kotthoff) Davis** *et al.*

ANWENDUNGSBEREICH DES TESTSCHEMAS

Das folgende Testschema beschreibt die verschiedenen Verfahren

i) zur Diagnose der bakteriellen Ringfäule in Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen,

ii) zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in Proben von Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen,

iii) zur Identifizierung von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*C. m.* subsp. *sepedonicus*).

GRUNDREGELN

Optimierte Protokolle für die verschiedenen Methoden, validierte Reagenzien sowie die Einzelheiten für die Vorbereitung der Test- und Kontrollmaterialien sind in den Anlagen festgelegt. Anlage 1 enthält eine Liste der an der Optimierung und Validierung von Protokollen beteiligten Laboratorien.

Da die Protokolle dem Nachweis eines Quarantäneschadorganismus dienen und als Kontrollmaterialen lebensfähige Kulturen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* (Cms) voraussetzen, müssen die Testverfahren in geeigneten Quarantäneeinrichtungen durchgeführt werden, die über angemessene Abfallentsorgungsanlagen und über eine entsprechende Zulassung durch die für Pflanzenquarantäne zuständige Behörde verfügen.

Die Testparameter müssen den eindeutigen und reproduzierbaren Nachweis von *C. m.* subsp. *sepedonicus* auf den für die gewählten Methoden vorgegebenen Schwellenwerten gewährleisten.

Die präzise Vorbereitung von Positivkontrollen ist unerlässlich.

Das Testen auf der Grundlage vorgegebener Schwellenwerte erfordert auch eine korrekte Einstellung, Wartung und Eichung der Testgeräte, den sorgfältigen Umgang mit und die Aufbewahrung von Reagenzien sowie Vorkehrungen zur Verhütung der Kontamination zwischen Proben, beispielsweise durch Trennung der Positivkontrollen von Testproben. Zur Vermeidung administrativer und sonstiger Fehler, insbesondere bei der Etikettierung und Dokumentierung, sind Qualitätskontrollen durchzuführen.

Ein Verdachtsfall im Sinne von Artikel 4 Absatz 2 der Richtlinie 93/85/EWG setzt ein positives Ergebnis der Diagnose- oder Screeningtests an einer Probe nach den Vorgaben der Flussdiagramme voraus.

Fällt der erste Screeningtest (IF- oder PCR-/FISH-Test) positiv aus, so besteht Verdacht einer *C. m.*-subsp.-*sepedonicus*-Kontamination, und es muss ein zweiter Screeningtest durchgeführt werden. Fällt dieser zweite Test ebenfalls positiv aus, so gilt der Verdacht als bestätigt (Befallsverdacht) und die im Flussdiagramm vorgegebenen Tests müssen fortgesetzt werden. Fällt der zweite Screeningtest negativ aus, so gilt die Probe als nicht kontaminiert.

Ein positiver IF-Test im Sinne von Artikel 4 Absatz 2 wird daher definiert als ein durch einen zweiten Screeningtest (PCR/FISH) bestätigter positiver IF-Befund.

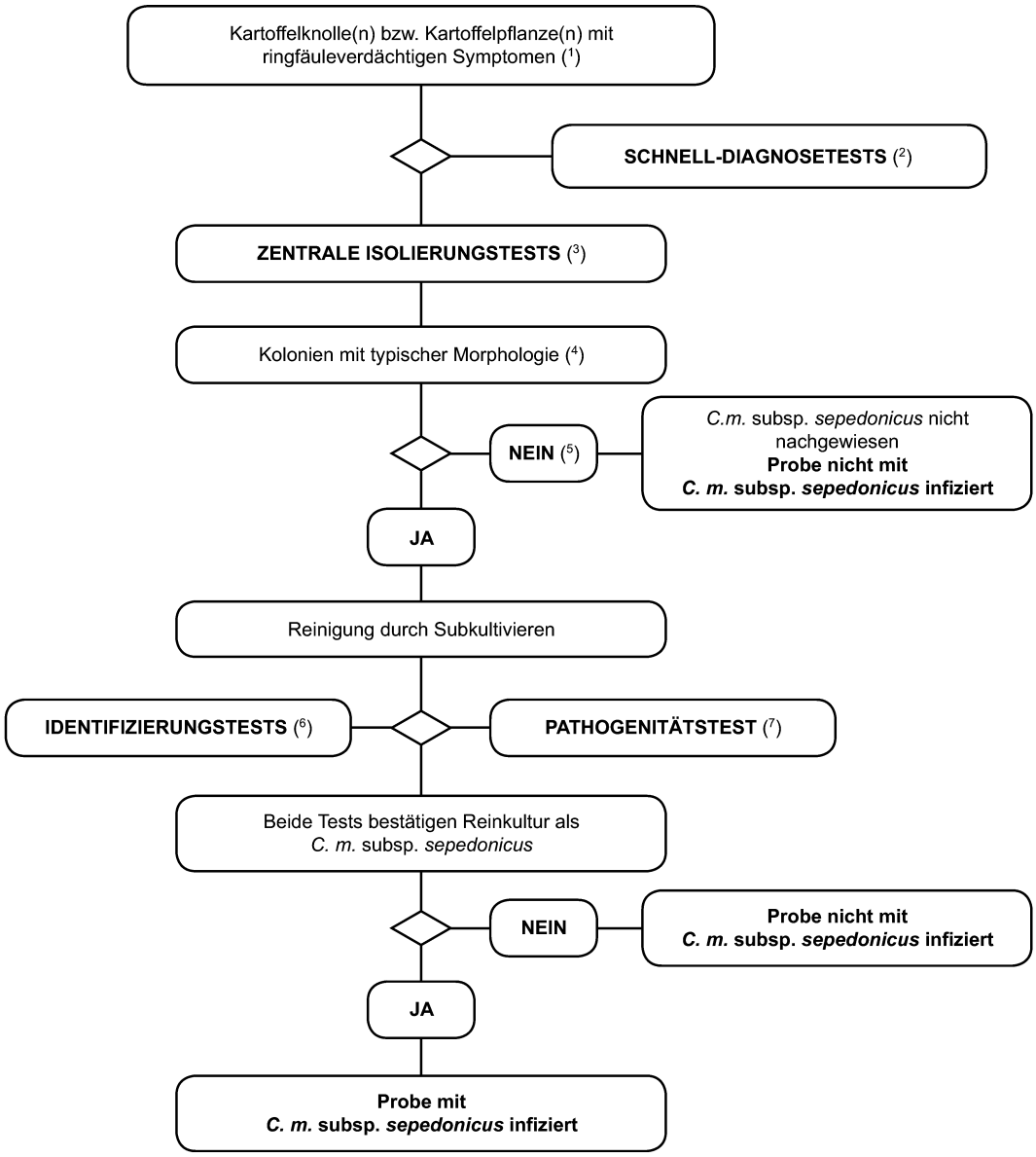
Ein bestätigter Verdacht im Sinne von Artikel 5 Absatz 1 der Richtlinie 93/85/EWG erfordert die Isolierung und Identifizierung einer *C. m.*-subsp.-*sepedonicus*-Reinkultur und die Bestätigung der Pathogenität.

1. FLUSSDIAGRAMME

1.1. **Nachweisverfahren zur Diagnose der bakteriellen Ringfäule in Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen mit Ringfäulesymptomen**

Das Testverfahren ist für Kartoffelknollen und Kartoffelpflanzen mit ringfäuletypischen oder ringfäuleverdächtigen Symptomen geeignet. Es umfasst einen Schnell-Screeningtest, die Isolierung des Erregers aus infiziertem Gefäßgewebe auf Diagnosemedien und — bei positivem Ergebnis — die Identifizierung der Kultur als *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼M1



(1) Beschreibung der Symptome in Abschnitt 2.

(2) Geeignete Tests:
— IF-Test (Abschnitt 4).
— PCR-Test (Abschnitt 6).
— FISH-Test (Abschnitt 5).

(3) Obgleich sich der Erreger durch Verdünnungsausstrich relativ einfach aus Pflanzenmaterial mit typischen Symptomen isolieren lässt, kann das Kultivieren in fortgeschrittenem Infektionsstadium scheitern. Auf krankem Gewebe wachsende saprophytische Bakterien können den Erreger auf dem Isolierungsmedium überwuchern oder sein Wachstum hemmen. Daher wird empfohlen, sowohl nichtselektive als auch selektive Medien, vorzugsweise MTNA (Abschnitt 8) oder den Biotest (Abschnitt 7) zu verwenden.

(4) Beschreibung einer typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt 8.

(5) Fällt der Isolierungstest negativ aus, liegen aber typische Krankheitssymptome vor, so ist die Isolierung zu wiederholen.

(6) Eine Reinkultur von *C. m.* subsp. *sepedonicus* wird durch die Tests gemäß Abschnitt 9 verlässlich identifiziert.

(7) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt 10.

▼M1

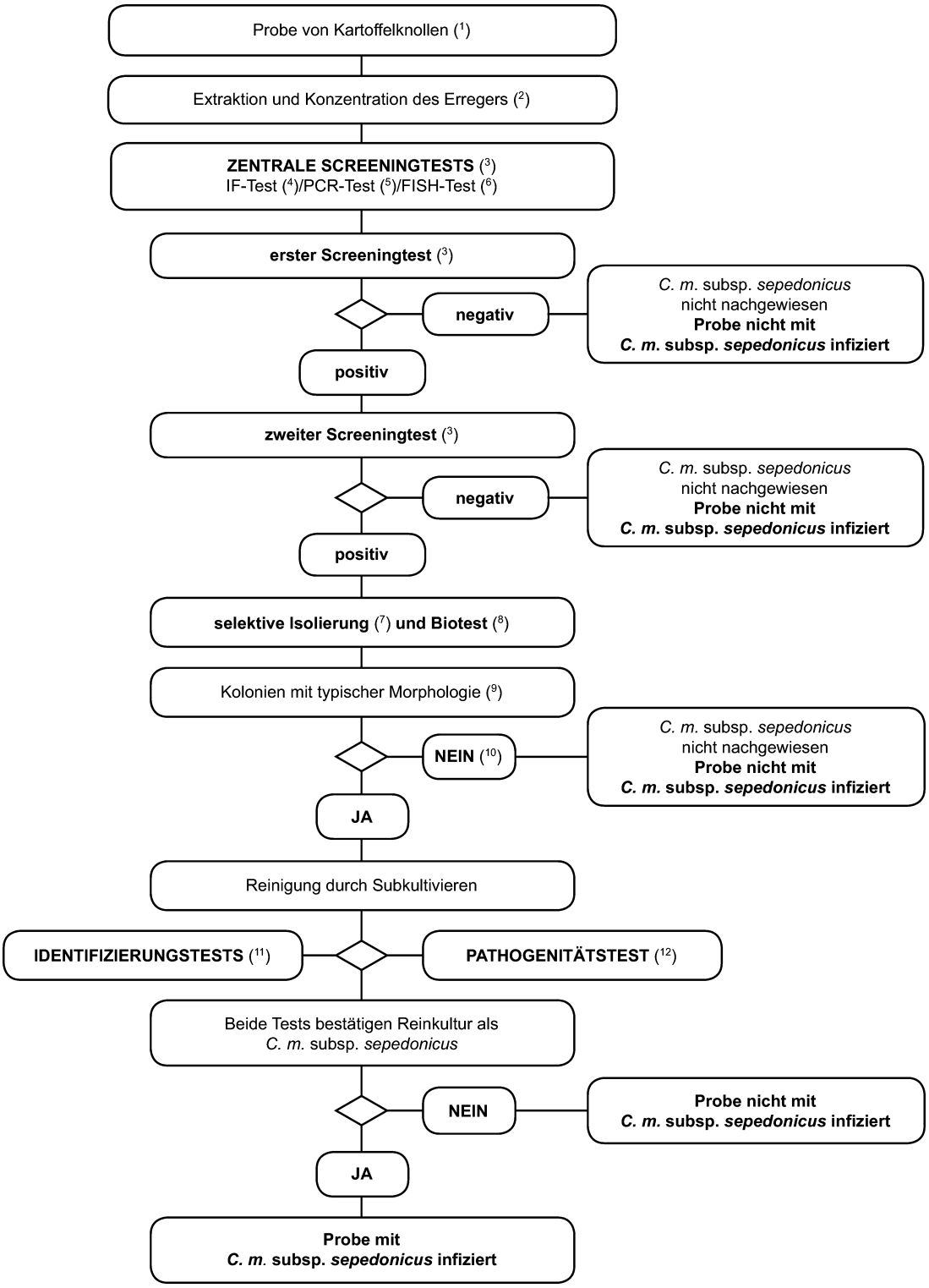
1.2. **Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von** *C. m.* **subsp.** *sepedonicus* **in Proben symptomfreier Kartoffelknollen**

Grundsatz

Das Testverfahren dient dem Nachweis latenter Infektionen von Kartoffelknollen. Ein positives Ergebnis bei mindestens zwei Screeningtests, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, ist durch Isolierung des Erregers zu bestätigen. Bei Isolierung typischer Kolonien ist eine Reinkultur als *C. m.* subsp. *sepedonicus* zu bestätigen. Ein positiver Screeningtest allein reicht nicht aus, um die Probe als verdächtig einzustufen.

Screeningtests und Isolierungstests müssen eine Nachweisgrenze von 10^3 bis 10^4 Zellen/ml resuspendiertes Pellet gewährleisten, die als Positivkontrollen in jede Testreihe einzubeziehen sind.

▼M1


Probe von Kartoffelknollen (1)
Extraktion und Konzentration des Erregers (2)
ZENTRALE SCREENINGTESTS (3)
IF-Test (4)/PCR-Test (5)/FISH-Test (6)
erster Screeningtest (3)
negativ
C. m. subsp. sepedonicus nicht nachgewiesen Probe nicht mit C. m. subsp. sepedonicus infiziert
positiv
zweiter Screeningtest (3)
negativ
C. m. subsp. sepedonicus nicht nachgewiesen Probe nicht mit C. m. subsp. sepedonicus infiziert
positiv
selektive Isolierung (7) und Biotest (8)
Kolonien mit typischer Morphologie (9)
NEIN (10)
C. m. subsp. sepedonicus nicht nachgewiesen Probe nicht mit C. m. subsp. sepedonicus infiziert
JA
Reinigung durch Subkultivieren
IDENTIFIZIERUNGSTESTS (11)
PATHOGENITÄTSTEST (12)
Beide Tests bestätigen Reinkultur als C. m. subsp. sepedonicus
NEIN
Probe nicht mit C. m. subsp. sepedonicus infiziert
JA
Probe mit C. m. subsp. sepedonicus infiziert

▼**M1**

(1) Eine Standardprobe besteht aus 200 Knollen; das Verfahren ist aber auch für kleinere Proben geeignet, wenn keine 200 Knollen zur Verfügung stehen.

(2) Beschreibung der Methoden der Erregerextraktion und -konzentration in Abschnitt 3.1.

(3) Fallen mindestens zwei Tests, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, positiv aus, so muss der Erreger isoliert und bestätigt werden. Es ist mindestens ein Screeningtest durchzuführen. Fällt dieser Test negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Fällt der Test positiv aus, so sind zur Abklärung des ersten positiven Ergebnisses und nach unterschiedlichen biologischen Grundsätzen ein zweiter oder weitere Screeningtests durchzuführen. Fallen der zweite oder andere Tests negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.

(4) Immunfluoreszenztest (IF-Test).
Für den IF-Test stets polyklonale Antikörper verwenden; zusätzlich können monoklonale Antikörper eine größere Spezifität gewährleisten (siehe Abschnitt 4).

(5) PCR-Test.
Validierte PCR-Reagenzien und -Protokolle verwenden (siehe Abschnitt 6).

(6) Fish-Test.
Validierte Reagenzien und Protokolle verwenden (siehe Abschnitt 5).

(7) Selektive Isolierung.
Mittels MTNA-Medium oder NCP-88-Medium und einer 1/100-Verdünnung des resuspendierten Pellets; in den meisten Fällen ist diese Methode für die direkte Isolierung von *C. m.* subsp. *sepedonicus* geeignet. Typische Kolonien bilden sich 3-10 Tage nach dem Ausstrich. Der Erreger kann sodann gereinigt und identifiziert werden. Zur vollen Ausschöpfung des Testpotenzials sind die Nabelendstücke sorgfältig vorzubereiten, um Sekundärbakterien aus den Knollen, die auf dem Medium mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* konkurrieren und den Erreger überwuchern könnten, zu vermeiden. Scheitert der Ausstrichtest, so ist der Erreger aus Pflanzen zu isolieren, die für den Biotest (siehe Abschnitt 8) verwendet werden.

(8) Der Biotest wird verwendet für die Isolierung von *C. m.* subsp. *sepedonicus* aus Kartoffelextraktpellets durch selektive Anreicherung in Auberginen (*Solanum melongena*). Der Biotest setzt optimale Inkubationsbedingungen, wie im Testverfahren beschrieben, voraus. Bakterien, die das Wachstum von *C. m.* subsp. *sepedonicus* auf dem MTNA-Medium oder dem NCP-88-Medium hemmen, dürften diesen Test nicht beeinträchtigen (siehe Abschnitt 7).

(9) Beschreibung einer typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt 8.

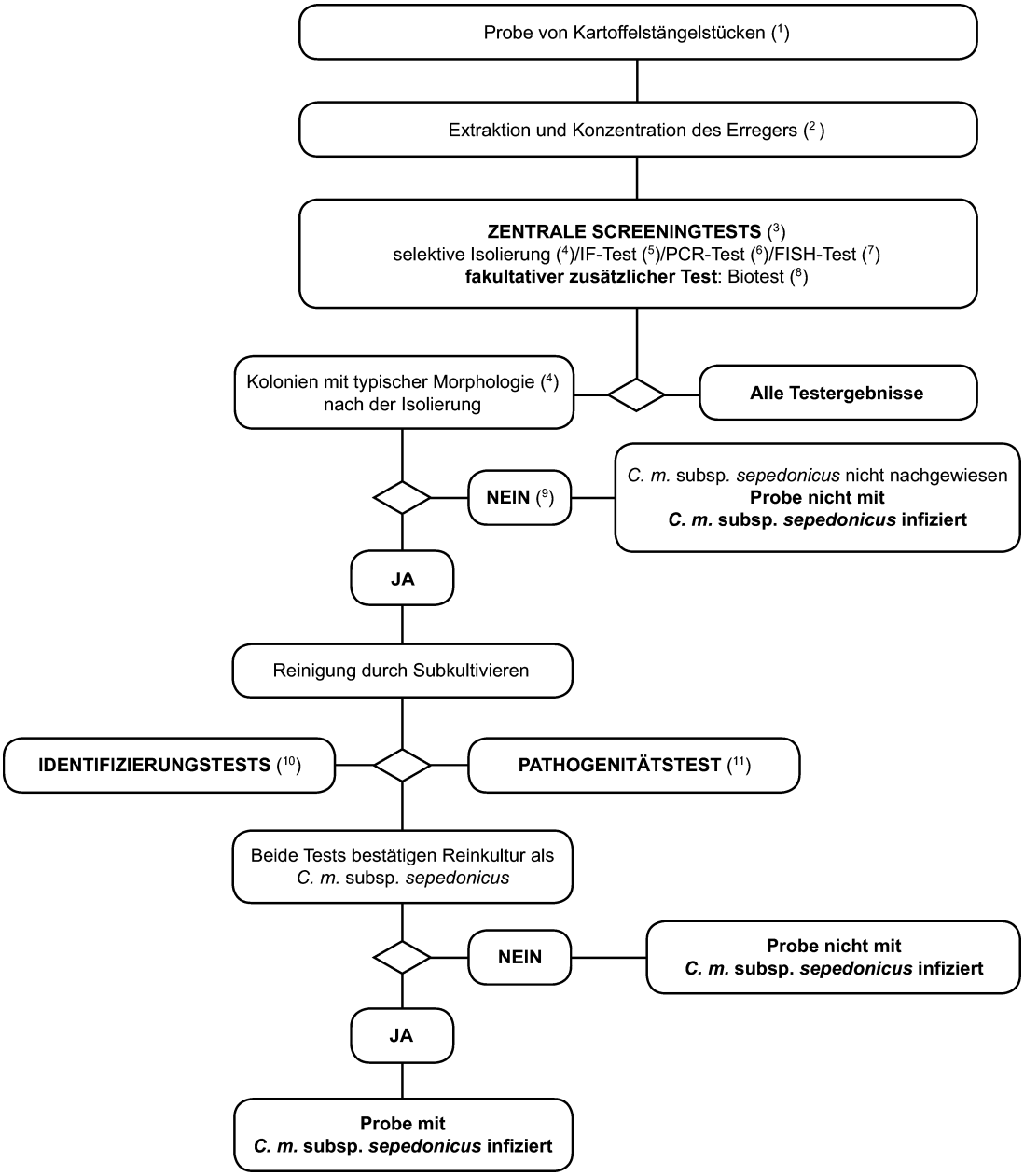
(10) Das Kultivieren oder Biotest können aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Fallen Screeningtests positiv, die Isolierungstests jedoch negativ aus, so sind die Isolierungstests aus demselben Pellet oder durch Entnahme zusätzlichen Gefäßgewebes am Nabelende durchschnittener Knollen derselben Probe zu wiederholen; erforderlichenfalls sind weitere Proben zu testen.

(11) Eine Reinkultur von *C.-m.*-subsp.-*sepedonicus*-verdächtigen Kulturen wird durch die Tests gemäß Abschnitt 9 verlässlich identifiziert.

(12) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt 10.

▼M1

1.3. **Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung von** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **in Proben symptomfreier Kartoffelpflanzen**



▼**M1**

(1) Empfohlene Probengrößen in Abschnitt 3.2.

(2) Beschreibung von Methoden zur Erregerextraktion und -konzentration in Abschnitt 3.2.

(3) Fallen mindestens zwei Tests, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, positiv aus, so muss der Erreger isoliert und bestätigt werden.
Es ist mindestens ein Screeningtest durchzuführen. Fällt dieser Test negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Fällt der Test positiv aus, so sind zur Abklärung des ersten positiven Ergebnisses und nach unterschiedlichen biologischen Grundsätzen ein zweiter oder weitere Screeningtests durchzuführen. Fallen der zweite oder andere Tests negativ aus, so gilt die Probe als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.

(4) Beschreibung des selektiven Isolierungstests und einer typischen Kolonienmorphologie in Abschnitt 8.

(5) Beschreibung des IF-Tests in Abschnitt 4.

(6) Beschreibung des PCR-Tests in Abschnitt 6.

(7) Beschreibung des FISH-Tests in Abschnitt 5.

(8) Beschreibung des Biotests in Abschnitt 7.

(9) Das Kultivieren oder Biotests können aufgrund konkurrierender oder hemmender saprophytischer Bakterien scheitern. Fallen Screeningtests positiv, die Isolierungstests jedoch negativ aus, so sind die Isolierungstests zu wiederholen; erforderlichenfalls sind weitere Proben zu testen.

(10) Eine Reinkultur von *C.-m.*-subsp.*sepedonicus*-verdächtigen Kulturen wird durch die Tests gemäß Abschnitt 9 verlässlich identifiziert.

(11) Beschreibung des Pathogenitätstests in Abschnitt 10.

▼M1

2. VISUELLE PRÜFUNG AUF RINGFÄULESYMPTOME

2.1. **Kartoffelpflanzen**

Unter europäischen Klimabedingungen zeigen sich Symptome in Feldbeständen nur selten und häufig nur gegen Ende der Saison. Die Symptome sind außerdem oft verschleiert oder werden mit anderen Krankheiten, Alterungsprozessen oder mechanischen Schäden verwechselt. Daher können Ringfäulesymptome bei Feldbesichtigungen leicht übersehen werden. Welkesymptome unterscheiden sich stark von denen der Schleimkrankheit; der Welkeprozess ist gewöhnlich langsam und zunächst auf die Blattränder beschränkt. Infizierte junge Blätter wachsen oft weiter, allerdings in infizierten Zonen weniger. Dadurch entstehen ungewöhnliche Blattformen. An Blättern, deren Gefäßgewebe weiter unten am Stängel blockiert ist, entwickeln sich häufig chlorotische, gelb bis schwach-bräunliche Verfärbungen zwischen den Blattadern. Infizierte Blättchen, Blätter und selbst Stängel können absterben. Oft bleiben Blätter und Knollen auch einfach kleiner. Mitunter bleiben die Pflanzen in ihrem Wachstum gestaucht. Farbabbildungen verschiedener Ringfäulesymptome können über folgende Internet-Website abgerufen werden: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

2.2. **Kartoffelknollen**

Erste Symptome sind eine leichte Glasigkeit oder Durchsichtigkeit des Gewebes insbesondere nah am Nabelende ohne Aufweichen des Gewebes um das Gefäßsystem. Der Gefäßbündelring am Nabelende kann leicht dunkler gefärbt sein als üblich. Die ersten erkennbaren Symptome sind eine Gelbfärbung des Gefäßbündelrings und, wenn auf die Knolle ein leichter Druck ausgeübt wird, eine aus den Gefäßen austretende käsige Substanz. Diese Absonderung enthält Millionen von Bakterien. In diesem Stadium kann sich eine Braunfärbung des Gefäßgewebes entwickeln, und die Knollensymptome sind mit denen der durch *Ralstonia solanacearum* verursachten Schleimkrankheit vergleichbar. Die Symptome können zunächst auf einen Teil des Rings, der sich nicht unbedingt in der Nähe des Nabelendes befinden muss, beschränkt sein und sich dann allmählich auf den gesamten Ring ausdehnen. Mit fortschreitender Infektion wird das Gefäßgewebe zerstört, der äußerlich dem Gefäßbündelgefäß angrenzende Gewebebereich kann sich ablösen. In fortgeschrittenen Stadien der Infektion erscheinen auf der Oberfläche der Knolle Risse, die an den Rändern oft eine gelblich-braune Färbung aufweisen. In Europa sind kürzlich verschiedene Fälle aufgetreten, in denen das Knolleninnere zur gleichen Zeit verfault wie der Gefäßbündelring, wodurch eine sekundäre Ausbreitung erfolgt, die dazu führt, dass das Knolleninnere zerfällt und Nekrose eintritt. Sekundärer Pilz- oder Bakterienbefall kann die Symptome verschleiern, und es kann schwierig, wenn nicht sogar unmöglich werden, die Symptome einer fortgeschrittenen Ringfäule von anderen Knollenfäulen zu unterscheiden. Es können auch atypische Symptome auftreten. Farbabbildungen der verschiedenen Symptome können über folgende Internet-Website abgerufen werden: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

3. PROBENAUFBEREITUNG

3.1. **Kartoffelknollen**

Hinweis:

— Die Standardprobe umfasst 200 Knollen je Test. Für umfangreichere Testreihen müssen mehr Proben dieser Größe untersucht werden. Mehr als 200 Knollen in der Probe führen zu Hemmreaktionen oder erschweren die Ergebnisauswertung. Das Verfahren ist aber auch für Proben mit weniger als 200 Knollen geeignet, wenn nur wenige Knollen zur Verfügung stehen.

— Die Validierung aller im Folgenden beschriebenen Nachweismethoden beruht auf der Untersuchung von Proben einer Größe von 200 Knollen.

— Der im Folgenden beschriebene Kartoffelextrakt kann auch zum Nachweis des Erregers der Schleimkrankheit der Kartoffel, *Ralstonia solanacearum*, verwendet werden.

Fakultative Vorbehandlung vor der Probenaufbereitung:

Knollen waschen. Zwischen den einzelnen Proben geeignete Desinfektionsmittel (Chlorverbindungen im Falle des PCR-Tests, um etwa vorhandene pathogene DNA zu entfernen) und Detergenzien verwenden. Knollen an der Luft trocknen lassen. Dieses Waschver-

▼M1

fahren ist besonders für Proben mit viel überschüssiger Erde und in Fällen hilfreich (jedoch nicht vorgeschrieben), in denen ein PCR-Test oder ein direktes Isolierungsverfahren durchgeführt werden sollte.

3.1.1. Mit einem sauberen, sterilen Skalpell oder Gemüsemesser die Schale am Nabelende der Knolle entfernen, so dass das Gefäßbündelgewebe sichtbar wird. Am Nabelende jeder Knolle sorgfältig ein kleines, kegelförmiges Gewebestück aus dem Gefäßbereich herausschneiden. Dabei darauf achten, dass möglichst wenig nicht vaskuläres Gewebe erfasst wird (siehe Internet-Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Hinweis:

Knollen mit ringfäuleverdächtigen Symptomen (sichtbarer Fäulnis) sind auszusondern und separat zu testen.

Werden beim Entfernen des kegelförmigen Gewebestückchens ringfäuleverdächtige Symptome festgestellt, so sollte diese Knolle visuell geprüft werden, nachdem sie am Nabelende durchgeschnitten wurde. Durchschnittene Knollen mit verdächtigen Symptomen sollten zur Wundenverkorkung 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend unter Quarantänebedingungen (bei 4-10 °C) gelagert werden, bis alle Tests abgeschlossen sind. Alle Knollen der Probe, einschließlich solcher mit Verdachtssymptomen, sind gemäß Anhang II aufzubewahren.

3.1.2. Die kegelförmigen Nabelendstückchen in unbenutzten verschließbaren und/oder verplombbaren Einwegbehältnissen sammeln (werden Behältnisse wieder verwendet, so sind sie mit Chlorverbindungen gründlich zu reinigen und zu desinfizieren). Die Gewebestückchen sind möglichst sofort zu verarbeiten bzw. — soweit dies nicht möglich ist — in ihrem Behältnis ohne Zugabe von Puffer für maximal 72 Stunden gekühlt bzw. für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur aufzubewahren. Ein Austrocknen und Verkorken der Gewebestückchen und Saprophyten-Bewuchs während der Lagerung können den Nachweis des Ringfäulebakteriums verhindern.

3.1.3. Die Gewebestückchen nach einem der folgenden Verfahren verarbeiten: Entweder

a) die Stückchen mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 3) bedecken und auf einem Schüttler (50-100 rpm) für 4 Stunden bei einer Temperatur von weniger als 24 °C bzw. 16-24 Stunden bei Kühlschranktemperatur schütteln;

oder

b) die Stückchen mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 3) entweder in einem Waring- oder Ultra-Thurax-Mixer oder durch Zerkleinerung in einem robusten verschlossenen Einweg-Mazerationsbeutel (z. B. Stomacher- oder Bioreba-Plastikbeutel, 150 mm × 250 mm; strahlensterilisiert) mit einem Gummihammer oder einem geeigneten Zerkleinerungsgerät (z. B. Homex) homogenisieren.

Hinweis:

Das Risiko der Kreuzkontamination von Proben ist groß, wenn letztere mit einem Mixer homogenisiert werden. Es sind Vorkehrungen zu treffen, um jedes Versprühen oder Verschütten während des Extraktionsprozesses zu vermeiden. Ferner ist sicherzustellen, dass für jede Probe frisch sterilisierte Mixerblätter und Gefäße verwendet werden. Beim PCR-Test ist eine DNA-Übertragung auf Behälter oder Zerkleinerungsgeräte zu vermeiden. Die Zerkleinerung sollte in Einwegbeuteln und Einwegröhrchen erfolgen, wenn der PCR-Test angewendet werden soll.

3.1.4. Den Überstand umfüllen. Wenn er sehr trübe ist, entweder durch langsames Zentrifugieren (bei nicht mehr als 180 g für 10 Minuten zwischen 4-10 °C) oder durch Vakuumfiltration (40-100 µm) klären und den Filter mit zusätzlichem (10 ml) Extraktionspuffer (Anlage 3) waschen.

3.1.5. Die Bakterien durch 15-minütiges Zentrifugieren des erhaltenen Überstandes bei 7 000 g (oder für 10 Minuten bei 10 000 g) bei einer Temperatur zwischen 4-10 °C konzentrieren und den Überstand verwerfen, ohne das Pellet aufzurühren.

3.1.6. Das Pellet in 1,5 ml Pelletpuffer (Anlage 3) resuspendieren. 500 µl für das Testen auf *C. m.* subsp. *sepedonicus*, 500 µl für *Ralstonia solanacearum* und 500 µl für Referenzzwecke verwenden. Zum Referenzaliquot von 500 µl und den restlichen Testaliquots steriles Glyzerin zugeben, um eine Endkonzentration von 10–25 % (v/v) zu erreichen,

▼M1

vortexen und bei –16 bis –24 °C (Wochen) oder bei –68 bis –86 °C (Monate) lagern. Die Testaliquots während der Testung bei 4–10 °C aufbewahren.

Von wiederholtem Einfrieren und Auftauen wird abgeraten.

Muss der Extrakt befördert werden, so ist sicherzustellen, dass der Transport innerhalb von 24 bis 48 Stunden erfolgt und eine Kühlbox verwendet wird.

3.1.7. Zur Vermeidung von Kontaminationen müssen alle *C. m.* subsp. *sepedonicus* Positivkontrollen und Proben unbedingt separat behandelt werden. Dies gilt für IF-Objektträger und für sämtliche Tests.

3.2. **Kartoffelpflanzen**

Hinweis:

Zum Nachweis latenter *C. m.* subsp. *sepedonicus* Populationen wird empfohlen, Mischproben zu testen. Das Verfahren ist für Mischproben von bis zu 200 Stängelstücken geeignet. (Werden Erhebungen durchgeführt, so sollten diese an einer statistisch repräsentativen Probe der zu untersuchenden Pflanzenpopulation ausgerichtet werden.)

3.2.1. Mit einem sauberen, sterilen Messer oder einer Gartenschere am Stängelansatz genau über der Erde ein 1-2 cm großes Stängelstück herausschneiden.

Die Stängelstücke kurz mit 70 %igem Ethanol desinfizieren und sofort auf Papiertüchern trocken tupfen.

Die Stängelstücke in einem verschlossenen sterilen Behältnis sammeln und wie folgt verfahren:

3.2.2. Die Stängelstücke einer der folgenden Behandlungen unterziehen: Entweder

a) die Stücke mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 3) bedecken und auf einem Schüttler (bei 50-100 rpm) für 4 Stunden bei einer Temperatur von weniger als 24 °C bzw. für 16-24 Stunden bei Kühlschranktemperatur schütteln;

oder

b) die Stücke mit einer ausreichenden Menge (ungefähr 40 ml) Extraktionspuffer (Anlage 3) durch Zerkleinern in einem robusten Mazerationsbeutel (z. B. Stomacher- oder Bioreba-Beutel) mit einem Gummihammer oder einem geeigneten Zerkleinerungsgerät (z. B. Homex) unverzüglich verarbeiten. Soweit dies nicht möglich ist, die Stängelstücke für maximal 72 Stunden bei Kühlschranktemperatur und höchstens 24 Stunden bei Raumtemperatur lagern.

3.2.3. Den Überstand umfüllen, nachdem das Mazerat 15 Minuten gestanden hat.

3.2.4. Eine weitere Klärung des Extrakts oder Konzentration der Bakterien ist in der Regel nicht erforderlich, kann jedoch durch Filtrieren und/oder Zentrifugieren (siehe Abschnitte 3.1.4-3.1.6) erreicht werden.

3.2.5. Den unverdünnten bzw. konzentrierten Probenextrakt in zwei gleiche Teile teilen. Eine Hälfte während der Testung bei 4-10 °C aufbewahren, die andere Hälfte mit 10-25 %igem (v/v) sterilem Glyzerin bei -16 bis –24 °C (Wochen) oder bei –68 bis –86 °C (Monate) lagern für den Fall, dass weitere Tests erforderlich werden.

4. IF-TEST

Grundsatz

Der IF-Test wird als Hauptscreeningtest empfohlen, weil er nachweislich stabil genug ist, um die vorgeschriebenen Schwellenwerte zu erreichen.

Wird der IF-Test als Hauptscreeningtest angewandt und fällt der IF-Befund positiv aus, so muss als zweiter Screeningtest der PCR- oder der FISH-Test durchgeführt werden. Wird der IF-Test als zweiter Screeningtest angewandt und fällt der IF-Befund positiv aus, so sind zum Abschluss der Analyse weitere Tests (siehe Flussdiagramm) erforderlich.

▼**M1**

Hinweis:

Stets einen polyklonalen Antikörper verwenden, wenn der IF-Test als Hauptscreeningtest angewandt wird. Bei positivem IF-Befund mit polyklonalem Antikörper kann ein weiterer Test der Proben mit einem monoklonalen Antikörper unter Umständen spezifischer sein, wenn auch weniger empfindlich.

Antikörper gegen einen Referenzstamm von *C. m.* subsp. *sepedonicus* verwenden. Es wird empfohlen, für jede neue Antikörpercharge den Titer zu bestimmen. Der Titer wird definiert als die höchste Verdünnung, bei der eine optimale Reaktion eintritt, wenn eine Suspension aus 10^5 bis 10^6 Zellen/ml des homologen Stammes von *C. m.* subsp. *sepedonicus* mit einem geeigneten Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)-Konjugat nach Herstellerspezifikationen getestet wird. Das polyklonale oder monoklonale Rohserum sollte einen IF-Titer von mindestens 1:2000 ergeben. Beim Test sollten die Antikörper in Arbeitsverdünnung(en) (AV) sehr nahe am oder auf dem Titerwert verwendet werden. Validierte Antikörper verwenden (siehe Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

Der Test ist an frisch vorbereitenen Probenextrakten durchzuführen. Er kann erforderlichenfalls auch an Extrakten vorgenommen werden, die bei –68 bis –86 °C unter Glyzerinzugabe gelagert wurden. Das Glyzerin kann durch Zugabe von 1 ml Pelletpuffer (Anlage 4), 15-minütiges Rezentrifugieren bei 7 000 g und Resuspendieren in gleicher Menge Pelletpuffer entfernt werden. Dieser Arbeitsschritt ist häufig nicht erforderlich, vor allem, wenn die Proben durch Abflammen am Objektträger fixiert werden (siehe Abschnitt 2.2).

Separate Objektträger mit Positivkontrollen des homologen Stammes oder eines anderen Referenzstammes von *C. m.* subsp. *sepedonicus*, nach Anlage 2 in Kartoffelextrakt und fakultativ in Puffer suspendiert, herstellen.

Als ähnliche Kontrolle auf demselben Objektträger nach Möglichkeit natürlich infiziertes Gewebe (durch Lyophilisierung oder Einfrieren bei –16 bis –24 °C gelagert) verwenden.

Als Negativkontrollen Aliquots des Probenextrakts verwenden, deren vorheriges Testergebnis negativ war.

Multiwell-Objektträger mit vorzugsweise 10 Sichtfeldern von mindestens 6 mm Durchmesser verwenden.

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe (n).

4.1. Die Objektträger nach einem der folgenden Verfahren vorbereiten:

i) Pellets mit relativ wenig Stärkesediment:

Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des 1/100 verdünnten resuspendierten Kartoffelpellets auf das erste Feld pipettieren. Dieselbe Menge unverdünntes Pellet (1/1) auf die restlichen Felder der Reihe pipettieren. Die zweite Reihe kann, wie in Abbildung 1 dargestellt, als Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

ii) Andere Pellets:

Dezimalverdünnungen (1/10 und 1/100) des resuspendierten Pellets in Pelletpuffer herstellen. Ein abgemessenes Standardvolumen (15 µl reichen für ein Feld von 6 mm Durchmesser aus — bei größeren Feldern ein entsprechend größeres Volumen verwenden) des resuspendierten Pellets und jeder Verdünnung auf eine Felderreihe pipettieren. Die zweite Reihe kann, wie in Abbildung 2 dargestellt, als Duplikat oder für eine zweite Probe verwendet werden.

4.2. Tropfen bei Umgebungstemperatur oder durch Erwärmen auf 40 bis 45 °C trocknen lassen. Bakterienzellen entweder durch 15-minütiges Erhitzen bei 60 °C, Abflammen, mit 95 %igem Ethanol oder nach genauen Anweisungen des Antikörper-Lieferanten am Objektträger fixieren.

Soweit erforderlich können fixierte Objektträger vor weiteren Tests eingefroren in einem trockenen Behältnis für kurze Zeit (jedoch höchstens drei Monate) gelagert werden.

4.3. IF-Verfahren:

i) Bei Objektträgervorbereitung nach 4.1 i:

▼M1

Einen Satz Zweifachverdünnungen des Antikörpers in IF-Puffer herstellen. Im ersten Feld sollte 1/2 des Titers (T/2), in den anderen Feldern 1/4 des Titers (T/4), 1/2 des Titers (T/2), der Titer (T) und das Doppelte des Titers (2T) enthalten sein.

ii) Bei Objektträgervorbereitung nach 4.1 ii:

Herstellung der Arbeitsverdünnung (AV) des Antikörpers in IF-Puffer. Die Arbeitsverdünnung beeinflusst die Spezifität.

Abb. 1: Vorbereitung des Objektträgers nach 4.1 i und 4.3 i

	Verdünnungen des resuspendierten Pellets					
	1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	Verdünnung des resuspendierten Pellets
(T = Titer)	T/2	T/4	T/2	T	2T	Zweifachverdünnungen des Antiserums/Antikörpers

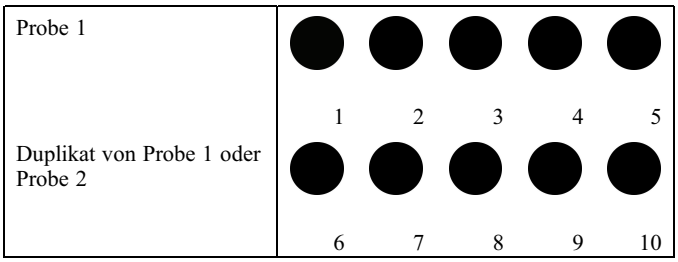
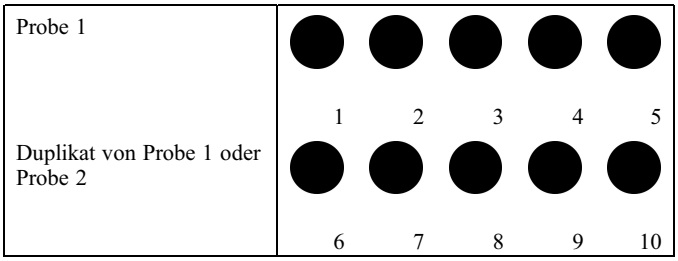


Abb. 2: Vorbereitung des Objektträgers nach 4.1 ii und 4.3 ii

	Arbeitsverdünnung des Antiserums/Antikörpers					
	1/1	1/10	1/100	leer	leer	Dezimalverdünnung des resuspendierten Pellets



4.3.1. Die Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen. Alle Testfelder mit Antikörperverdünnung(en) bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Antikörpervolumen muss mindestens dem Volumen des aufgetragenen Extraktes entsprechen.

Liegen keine spezifischen Anweisungen des Antikörper-Lieferanten vor, so ist folgendes Verfahren anzuwenden:

4.3.2. Objektträger abgedeckt für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 ° C) auf feuchten Papiertüchern inkubieren.

4.3.3. Antikörpertropfen vom Objektträger abschütteln, und die Objektträger sorgfältig mit IF-Puffer spülen. 5 Minuten mit IF-Puffer-Tween (Anlage 3) und anschließend 5 Minuten in IF-Puffer waschen. Kreuzkontaminationen durch Sprüh- oder Tropfenbildung vermeiden. Überschüssige Feuchtigkeit durch Abtupfen sorgfältig entfernen.

4.3.4. Objektträger auf feuchten Papiertüchern auslegen. Testfelder mit der zur Titer-Bestimmung verwendeten Verdünnung des FITC-Konjugats bedecken. Das auf die Felder aufgetragene Konjugatvolumen muss dem Volumen des aufgetragenen Antikörpers entsprechen.

4.3.5. Objektträger abgedeckt für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 ° C) auf feuchten Papiertüchern inkubieren.

4.3.6. Tropfen vom Objektträger abschütteln. Wie unter 4.3.3 angegeben waschen und spülen.

Überschüssige Feuchtigkeit sorgfältig entfernen.

▼M1

4.3.7. Auf jedes Feld 5-10 µl 0,1 M phosphatgepuffertes Glyzerin (Anlage 3) oder eine handelsübliche Antifading-Deckflüssigkeit auftragen und Deckglas auflegen.

4.4. IF-Test-Befund:

4.4.1. Test-Objektträger auf einem Epifluoreszenz-Mikroskop mit Filtern, die für FITC-Anregung geeignet sind, unter Öl- oder Wasserimmersion bei einer Vergrößerung von 500-1 000 untersuchen. Jedes Feld in zwei rechtwinklig zueinander stehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen. Bei Proben, die keine oder nur wenige Zellen zeigen, mindestens 40 Mikroskopfelder untersuchen.

Zunächst den Objektträger mit der Positivkontrolle prüfen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und bei dem festgelegten Antikörpertiter oder der festgelegten Arbeitsverdünnung vollständig gefärbt sein. Bei abweichender Färbung zum Normalzustand ist der IF-Test (Abschnitt 4) zu wiederholen.

4.4.2. Auf Anwesenheit hell fluoreszierender Zellen mit charakteristischer *C. m.* subsp. *sepedonicus* Morphologie in den Testfeldern auf den Testobjektträgern prüfen (siehe Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Die Intensität der Fluoreszenz muss der des positiven Kontrollstammes bei gleicher Antikörperverdünnung zumindest entsprechen oder besser sein. Unvollständig gefärbte oder nur schwach fluoreszierende Zellen sind nicht zu berücksichtigen.

Bei jeglichem Verdacht auf eine Kontamination ist der Test zu wiederholen. Dies kann der Fall sein, wenn alle Objektträger in einer Charge wegen Pufferkontamination positive Zellen zeigen oder wenn auf der Objektträgerbeschichtung (außerhalb der Felder) positive Zellen gefunden werden.

4.4.3. Der Immunofluoreszenztest hat in Bezug auf die Spezifität verschiedene Probleme. Es ist damit zu rechnen, dass in Pellets aus Kartoffelnabelenden und Stängelstücken Hintergrundpopulationen mit fluoreszierenden Zellen und atypischer Morphologie sowie kreuzreagierende saprophytische Bakterien mit *C. m. sepedonicus* ähnlicher Größe und Morphologie auftreten.

4.4.4. Nur fluoreszierende Zellen von typischer Größe und Morphologie bei Verwendung des Titers oder der Arbeitsverdünnung des Antikörpers (siehe 4.3) berücksichtigen.

4.4.5. Auswertung des IF-Befundes:

i) Für jede Probe, bei der stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie gefunden werden, sind die mittlere Anzahl typischer Zellen je Mikroskopfeld zu schätzen und die Zahl typischer Zellen je ml resuspendiertes Pellet zu berechnen (Anlage 4).

Der IF-Befund gilt bei Proben mit mindestens 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet als positiv. Die Probe gilt in diesem Falle als potenziell kontaminiert, und es sind weitere Tests erforderlich.

ii) Der IF-Befund gilt bei Proben mit weniger als 5×10^3 Zellen je ml resuspendiertes Pellet als negativ. Weitere Tests sind in diesem Falle nicht erforderlich.

5. FISH-TEST

Grundsatz

Wird der FISH-Test als Hauptscreeningtest angewandt und fällt dieser Test positiv aus, so muss obligatorisch als zweiter Screeningtest der IF-Test durchführt werden. Wird der FISH-Test als zweiter Screeningtest durchgeführt und fällt der Test positiv aus, so sind zur Sicherung der Diagnose weitere Tests nach dem Flussdiagramm erforderlich.

Hinweis:

Validierte *C. m.* subsp. *sepedonicus* spezifische Oligo-Sonden (Anlage 7) verwenden. Vorausgehende Tests mit diesem Verfahren müssen gewährleisten, mindestens 10^3-10^4 Zellen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* je ml, die Probenextrakten mit zuvor negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen.

Das im Folgenden beschriebene Verfahren ist vorzugsweise an frisch vorbereitetem Probenextrakt durchzuführen, kann aber auch bei Probenextrakten angewendet werden, die bei –16 bis –24 °C oder bei –68 bis –86 °C unter Glyzerinzugabe gelagert wurden.

▼M1

Als Negativkontrollen sind Aliquots von Probenextrakten zu verwenden, die zuvor mit negativem Testergebnis auf *C. m.* subsp. *sepedonicus* untersucht wurden.

Als Positivkontrollen aus einer 3-5 Tage alten Kultur Suspensionen mit 10^5 bis 10^6 *C. m.* subsp. *sepedonicus* Zellen je ml (z. B. Stamm NCPPB 4053 oder PD 406) in 0,01M Phosphatpuffer (PB) herstellen (siehe Anlage 2). Separate Objektträger mit Positivkontrollen des homologen Stammes oder eines anderen Referenzstammes von *C. m.* subsp. *sepedonicus*, in Kartoffelextrakt suspendiert, herstellen (siehe Anlage 2).

Die FITC-markierte eubakterielle Oligo-Sonde bietet insofern eine Kontrolle für den Hybridisierungsprozess, als sie alle Eubakterien anfärbt, die in der Probe vorhanden sind.

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren testen wie die Probe (n).

5.1. **Fixierung des Kartoffelextrakts**

Das folgende Protokoll basiert auf Wullings *et al.*, (1998):

5.1.1. Fixierlösung herstellen (siehe Anlage 7).

5.1.2. 100 µl von jedem Probenextrakt in ein Eppendorf-Röhrchen pipettieren und für 8 Minuten bei 7 000 g zentrifugieren.

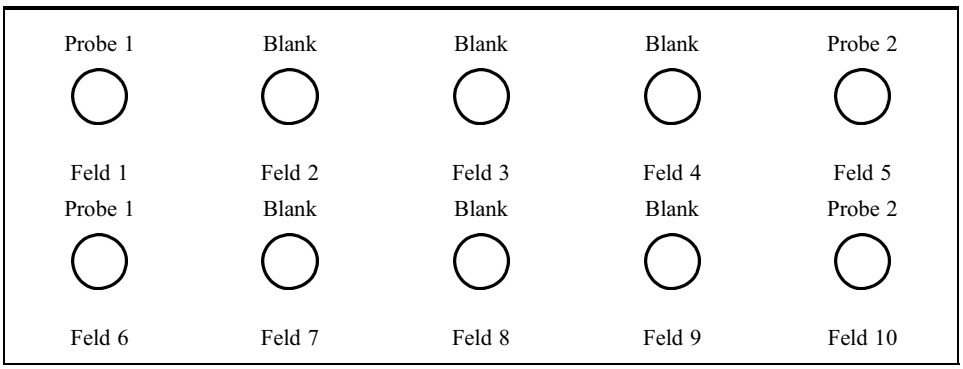
5.1.3. Überstand verwerfen und das Pellet in 500 µl Fixiermittel, das < 24 Stunden zuvor angesetzt wurde, auflösen. Vortexen und über Nacht bei 4 °C inkubieren.

Als alternatives Fixiermittel kann 96 %iges Ethanol verwendet werden. Dazu das Pellet (Punkt 5.1.2) in 50 µl 0,01M PB und 50 µl 96 %igem Ethanol auflösen. Vortexen und für 30-60 Minuten bei 4 °C inkubieren.

5.1.4. Für 8 Minuten bei 7 000 g zentrifugieren. Überstand verwerfen und das Pellet in 75 µl 0,01M PB resuspendieren (siehe Anlage 3).

5.1.5. 16 µl der fixierten Suspensionen auf einen sauberen Multitest-Objektträger (siehe Abb. 3) auftragen. Zwei verschiedene Proben je Objektträger auftragen, unverdünnt, und 10 µl zur Herstellung einer 1/100 Verdünnung (in 0,01M PB) verwenden. Die restliche Probenlösung (49 µl) kann nach Zugabe von 1 Volumen 96 %igem Ethanol bei –20 °C gelagert werden. Für den Fall, dass der FISH-Test wiederholt werden muss, das Ethanol abzentrifugieren und dasselbe Volumen von 0,01M PB zugeben (durch Vortexen vermischen).

Abb. 3: Layout des FISH-Objektträgers



5.1.6. Objektträger an der Luft (oder bei 37 °C auf einer Wärmebank) trocknen lassen und anschließend durch Abflammen fixieren.

In dieser Phase des Verfahrens kann die Hybridisierung unterbrochen und am nächsten Tag fortgesetzt werden. Objektträger sind staubfrei und trocken bei Raumtemperatur zu lagern.

5.2. **Vorhybridisierung und Hybridisierung**

5.2.1. Eine Lysozymlösung mit 10 mg Lysozym (Sigma L-6876) in 10 ml Puffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0) herstellen. Diese Lösung kann gelagert, sollte jedoch höchstens einmal aus dem Frost aufgetaut werden. Jede Probe sorgfältig mit ungefähr 50 µl Lysozym-

▼M1

lösung bedecken und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Objektträger anschließend nur einmal in entmineralisiertes Wasser tauchen und mit Filterpapier trocknen.

Alternativ können anstelle von Lysozym 50 µl von 40-400 µg ml^{-1} Proteinase K in Puffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 7,4) auf jedes Feld gegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert werden.

5.2.2. Die Zellen in aufsteigender Ethanolreihe von 50 %, 80 % und 96 % für jeweils 1 Minute dehydratisieren. Objektträger in einem Objektträgerhalter lufttrocknen lassen.

5.2.3. Durch Auslegen des Bodens einer luftdichten Box mit Zellstoff- oder Filterpapier, das in 1x Hybmix (Anlage 7) eingeweicht wurde, eine feuchte Inkubationskammer vorbereiten. Die Box im Hybridisierungsofen bei 55 °C für mindestens 10 Minuten vorinkubieren.

5.2.4. Die Hybridisierungslösung (Anlage 7) herstellen (45 µl je Objektträger) und für 5 Minuten bei 55 °C vorinkubieren.

5.2.5. Objektträger auf eine heiße (45 °C) Platte legen und 10 µl Hybridisierungslösung in jede der 4 Felder auf dem (den) Objektträger(n) geben.

5.2.6. Jeden Objektträger ohne Lufteinschluss mit zwei Deckgläsern (24 × 24 mm) abdecken. Objektträger in die vorgewärmte feuchte Kammer stellen und im Hybridisierungsofen über Nacht bei 55 °C im Dunkeln inkubieren.

5.2.7. Drei Becher vorbereiten mit 1 l Reinstwasser (UPW), 1 l 1x Hybmix (334 ml 3x Hybmix und 666 ml UPW) und 1 l 1/2x Hybmix (167 ml 3x Hybmix und 833 ml UPW) und jeweils im Wasserbad bei 55 °C einzeln vorinkubieren.

5.2.8. Deckgläser abnehmen und Objektträger in einen Objektträgerhalter stellen.

5.2.9. Auswaschen der überschüssigen Sonde durch 15-minütige Inkubation im Becher mit 1x Hybmix bei 55 °C.

5.2.10. Objektträgerhalter in 1/2 Hybmix-Waschlösung stellen und für weitere 15 Minuten inkubieren.

5.2.11. Objektträger kurz in den Becher mit Reinstwasser (UPW) tauchen und auf Filterpapier setzen. Überschüssige Feuchtigkeit durch leichtes Abdecken der Oberfläche mit Filterpapier aufsaugen. 5-10 µl Antifading-Deckflüssigkeit (z. B. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA o. Ä.) auf jedes Feld geben und den gesamten Objektträger mit einem großen Deckglas (24 × 60 mm) abdecken.

5.3. **FISH-Test-Befund**

5.3.1. Den Objektträger unverzüglich unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop bei 630- oder 1 000facher Vergrößerung unter Ölimmersion untersuchen. Mit einem für die Fluorescein-Isothiocyanat-Markierung (FITC) geeigneten Filter werden eubakterielle Zellen (einschließlich der meisten Gram-negativen Zellen) in der Probe leuchtend grün angefärbt. Mit einem Filter für Tetramethylrhodamin-5-Isothiocyanat leuchten Cy3-angefärbte Zellen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* fluoreszierend rot. Die Zellmorphologie mit der der Positivkontrollen vergleichen. Die Zellen müssen stark fluoreszieren und vollständig gefärbt sein. Der FISH-Test (Abschnitt 9.4) ist bei abweichender Färbung zum Normalzustand zu wiederholen. Jedes Sichtfeld in zwei rechtwinklig zueinander stehenden Durchmessern sowie entlang des Feldrandes mikroskopisch untersuchen. Bei Proben, die keine oder nur wenige Zellen zeigen, mindestens 40 Mikroskopfelder untersuchen.

5.3.2. Auf stark fluoreszierende Zellen mit charakteristischer Morphologie von *C. m.* subsp. *sepedonicus* in den Testfeldern auf den Testobjektträgern untersuchen (siehe Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Die Intensität der Fluoreszenz muss der des positiven Kontrollstammes entsprechen oder stärker sein. Unvollständig gefärbte oder schwach fluoreszierende Zellen sind nicht zu berücksichtigen.

5.3.3. Bei jeglichem Verdacht auf eine Kontamination ist der Test zu wiederholen. Dies kann der Fall sein, wenn alle Objektträger in einer Charge wegen Pufferkontamination positive Zellen zeigen oder wenn positive Zellen auf der Objektträgerbeschichtung (außerhalb der Felder) gefunden werden.

▼**M1**

5.3.4. Der FISH-Test hat in Bezug auf die Spezifität verschiedene Probleme. Es ist damit zu rechnen, dass in Pellets aus Kartoffelnabelenden und Stängelstücken Hintergrundpopulationen fluoreszierender Zellen mit atypischer Morphologie und kreuzreagierende saprophytische Bakterien mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* ähnlicher Größe und Morphologie auftreten, wenn auch weniger häufig als beim IF-Test.

5.3.5. Es sind nur fluoreszierende Zellen typischer Größe und Morphologie (siehe 5.3.2) zu berücksichtigen.

5.3.6. Auswertung des FISH-Test-Befundes:

i) Gültig sind FISH-Test-Ergebnisse, wenn mit Hilfe des FITC-Filters grün fluoreszierende Zellen mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* typischer Größe und Morphologie und mit Hilfe des Rhodaminfilters rot fluoreszierende Zellen in allen Positivkontrollen, jedoch in keiner einzigen Negativkontrolle festgestellt werden. Werden hell fluoreszierende Zellen einer charakteristischen Morphologie festgestellt, für jedes mikroskopische Feld die durchschnittliche Anzahl typischer Zellen schätzen und die Zahl der typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet (Anlage 4) berechnen. Proben mit mindestens 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet gelten als potenziell kontaminiert, und weitere Tests sind erforderlich. Proben mit weniger als 5×10^3 typischen Zellen je ml resuspendiertes Pellet gelten als negativ.

ii) Der FISH-Test ist negativ, wenn mit dem Rhodaminfilter keine rot fluoreszierenden Zellen mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* typischer Größe und Morphologie festgestellt werden, vorausgesetzt allerdings, dass sich in den Positivkontrollen bei Verwendung des Rhodaminfilters typische rot fluoreszierende Zellen nachweisen lassen.

6. PCR-TEST

Grundsatz

Wird der PCR-Test als Hauptscreeningtest angewandt und fällt dieser Test positiv aus, so muss obligatorisch als zweiter Screeningtest der IF-Test durchgeführt werden. Wird der PCR-Test als zweiter Screeningtest durchgeführt und fällt der Test positiv aus, so sind zur Sicherung der Diagnose weitere Tests nach dem Flussdiagramm erforderlich.

Dieses Testverfahren wird als Hauptscreeningtest nur empfohlen, wenn es fachkundig durchgeführt werden kann.

Hinweis:

Vorausgehende Tests mit diesem Verfahren müssen gewährleisten, mindestens 10^3 bis 10^4 Zellen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* je ml, die Probenextrakten mit zuvor negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen. Möglicherweise sind Optimierungsversuche erforderlich, um in allen Laboratorien ein höchstmögliches Niveau an Sensitivität und Spezifität zu gewährleisten.

Validierte PCR-Reagenzien und -Protokolle verwenden. Vorzugsweise eine Methode mit interner Kontrolle wählen.

Alle erforderlichen Vorkehrungen treffen, um eine Kontamination der Probe mit Ziel-DNA zu vermeiden. Der PCR-Test ist von erfahrenen Technikern und in für molekularbiologische Arbeiten vorgesehenen Laboratorien durchzuführen, um das Risiko einer Kontamination mit Ziel-DNA auf ein Mindestmaß zu begrenzen.

Negativkontrollen (für DNA-Extraktions- und PCR-Verfahren) sind stets als letzte Probe zu behandeln, damit nachvollziehbar bleibt, ob eine DNA-Verschleppung stattgefunden hat.

Die folgenden Negativkontrollen sollten in den PCR-Test einbezogen werden:

— Probenextrakt, der zuvor negativ auf *C. m.* subsp. *sepedonicus* getestet wurde,

— Pufferkontrollen, die zum Extrahieren des Bakteriums und der DNA aus der Probe verwendet werden,

— PCR-Reaktionsmischung.

Die folgenden Positivkontrollen sollten in den PCR-Test einbezogen werden:

— Aliquots resuspendierter Pellets, denen *C. m.* subsp. *sepedonicus* zugegeben wurde (für die Vorbereitung siehe Anlage 2),

▼M1

— eine Suspension aus 10^6 Zellen je ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* in Wasser aus einem virulenten Isolat (z. B. NCPPB 2140 oder NCPPB 4053),

— soweit möglich während des PCR-Tests auch DNA aus positiven Kontrollproben verwenden.

Um potenzielle Kontaminationen zu vermeiden, sind Positivkontrollen von den Testproben räumlich getrennt vorzubereiten.

Probenextrakte sollten möglichst frei von Erdresten sein. Daher empfiehlt sich in bestimmten Fällen, Extrakte aus gewaschenen Kartoffeln herzustellen, wenn PCR-Protokolle angewendet werden sollen.

6.1. **DNA-Reinigungsmethoden**

Positive und negative Kontrollproben wie oben beschrieben verwenden.

Kontrollmaterial wie die Probe(n) vorbereiten.

Es stehen diverse Methoden zur Reinigung der Ziel-DNA aus komplexen Probensubstraten zur Verfügung, wodurch PCR-Inhibitoren entfernt und andere enzymatische Reaktionen ausgeschlossen werden und die Ziel-DNA im Probenextrakt konzentriert wird.

Die folgende Methode wurde zur Verwendung mit der validierten PCR-Methode (siehe Anlage 6) optimiert.

6.1. a) Methode nach Pastrik (2000):

1. 220 µl Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettieren.
2. 100 µl Probenextrakt zugeben und bei 95 °C für 10 Minuten in einen Thermoblock oder ein Wasserbad stellen.
3. Röhrchen 5 Minuten auf Eis kühlen.
4. 80 µl Lysozym-Stammlösung (50 mg Lysozym je ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
5. 220 µl Easy DNA® Lösung A (Invitrogen) zugeben, durch Vortexen mischen und bei 65 °C für 30 Minuten inkubieren.
6. 100 µl Easy DNA® Lösung B (Invitrogen) zugeben und kräftig vortexen, bis das Präzipitat im Röhrchen frei fließt und die Probe gleichmäßig viskös ist.
7. 500 µl Chloroform zugeben und vortexen, bis die Viskosität nachlässt und die Mischung homogen wird.
8. Zur Phasentrennung und Ausbildung der Interphase bei 15 000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugieren.
9. Oberphase in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen überführen.
10. 1 ml 100 % Ethanol (–20 °C) zugeben, kurz vortexen und für 10 Minuten auf Eis inkubieren.
11. Bei 15 000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugieren und das Ethanol vom Pellet entfernen.
12. 500 µl 80 % Ethanol (–20 °C) zugeben und durch Invertieren des Röhrchens mischen.
13. Bei 15 000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugieren, das Pellet bewahren und das Ethanol entfernen.
14. Pellet an der Luft oder in einer DNA-Speedvac trocknen lassen.
15. Pellet in 100 µl sterilem Reinstwasser (UPW) resuspendieren und bei Raumtemperatur mindestens 20 Minuten stehen lassen.
16. Bei –20 °C lagern, bis es für die PCR benötigt wird.
17. Etwa vorhandenes weißes Präzipitat abzentrifugieren und 5 µl des DNA-haltigen Überstands für die PCR verwenden.

6.1. b) Andere Methoden

Andere Methoden der DNA-Extraktion (z. B. Qiagen DNeasy Plant Kit) sind akzeptabel, sofern sie DNA aus Kontrollproben mit 10^3 bis 10^4 Zellen des Krankheitserregers je ml nachweislich ebenso wirksam reinigen.

▼M1

6.2. **PCR**

6.2.1. Test- und Kontroll-Templates nach dem validierten Protokoll (Anlage 6) für die PCR vorbereiten. Eine Dezimalverdünnung des Proben-DNA-Extrakts (1:10 in UPW) herstellen.

6.2.2. Nach dem vorgegebenen Protokoll (Anlage 6) in einem kontaminationsfreien Umfeld eine geeignete PCR-Reaktionsmischung herstellen. Das validierte PCR-Protokoll ist eine multiplexe Reaktion, die auch eine interne PCR-Kontrolle enthält.

6.2.3. 5 µl DNA-Extrakt je 25 µl PCR-Reaktion in sterile PCR-Röhrchen geben.

6.2.4. Eine negative Kontrollprobe mit ausschließlich PCR-Reaktionsmischung einbeziehen und anstelle der Probe UPW zugeben, das zur Herstellung der PCR-Mischung verwendet wird.

6.2.5. Die Röhrchen in den Thermocycler stellen, der für die vorausgehenden Tests verwendet wurde, und das entsprechend optimierte PCR-Programm (Anlage 6) verwenden.

6.3. **Analyse des PCR-Produktes**

6.3.1. PCR-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen. Dazu mindestens 12 µl amplifizierte DNA-Reaktionsmischung jeder Probe, mit 3 µl Beladungspuffer (Anlage 6) gemischt, in 2,0 %igem (w/v) Agarose-Gelen in Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (Anlage 6) bei 5-8 V je cm laufen lassen. Einen geeigneten DNA-Marker, z. B. 100 bp ladder, verwenden.

6.3.2. DNA-Banden durch Anfärben in Ethidiumbromid (0,5 mg je l) für 30-45 Minuten sichtbar machen. *Dieses Mutagen vorsichtig handhaben*.

6.3.3. Das angefärbte Gel unter UV-Transillumination (z. B. λ = 302 nm) auf amplifizierte PCR-Produkte der erwarteten Größe (Anlage 6) untersuchen und dokumentieren.

6.3.4. Bei neuen Feststellungen/Fällen ist die Authentizität des PCR-Fragments durch Restriktionsenzymanalyse an einer Probe der verbliebenen amplifizierten DNA zu bestätigen, d. h. die Probe bei optimaler Temperatur und Zeitdauer mit einem geeigneten Enzym und Puffer (siehe Anlage 6) zu inkubieren. Die verdauten Fragmente wie zuvor durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen, nach Anfärben mit Ethidiumbromid charakteristische Restriktionsfragmentmuster unter UV-Transillumination prüfen und mit der unverdauten und verdauten Positivkontrolle vergleichen.

Auswertung des PCR-Testergebnisses:

Der PCR-Test ist negativ, wenn das *C. m.* subsp. *sepedonicus* spezifische PCR-Produkt der erwarteten Größe nicht für die untersuchte Probe, jedoch für alle positiven Kontrollproben nachgewiesen wird (bei der Multiplex-PCR mit pflanzenspezifischen internen Kontrollprimern muss ein zweites PCR-Produkt in erwarteter Größe in der untersuchten Probe amplifiziert werden).

Der PCR-Test ist positiv, wenn das *C. m.* subsp. *sepedonicus* spezifische PCR-Produkt der erwarteten Größe und (soweit erforderlich) des erwarteten Restriktionsmusters nachgewiesen wird, vorausgesetzt, es wird nicht in einer der negativen Kontrollproben amplifiziert. Ein positiver Befund kann auch durch Wiederholung des Tests mit einem zweiten PCR-Primerset (Abschnitt 9.3) verlässlich bestätigt werden.

Hinweis:

Es besteht Verdacht auf PCR-Hemmung, wenn das erwartete Fragment aus der positiven Kontrollprobe stammt, die *C. m.* subsp. *sepedonicus* in Wasser enthält, bei positiven Kontrollproben, die *C. m.* subsp. *sepedonicus* in Kartoffelextrakt enthalten, jedoch negative Ergebnisse erzielt werden. In Multiplex-PCR-Protokollen mit internen PCR-Kontrollen liegt eine Reaktionshemmung vor, wenn keines der beiden Fragmente erhalten wird.

Es besteht Verdacht auf Kontamination, wenn das erwartete Fragment in einer oder mehrerer der Negativkontrollen erhalten wird.

▼**M1**

7. BIOTEST

Hinweis:

Vorausgehende Tests mit diesem Verfahren müssen gewährleisten, mindestens 10^3 bis 10^4 koloniebildende Einheiten von *C. m.* subsp. *sepedonicus* je ml, die Probenextrakten mit zuvor negativem Testergebnis zugefügt wurden, reproduzierbar nachzuweisen (für die Vorbereitung siehe Anlage 2).

Optimale Nachweisempfindlichkeit ist unter optimalen Wachstumsbedingungen und bei Verwendung von frisch hergestelltem Probenextrakt gegeben. Die Methode ist jedoch auch für Extrakte geeignet, die bei –68 bis –86 °C unter Glyzerinzugabe gelagert wurden.

Einige Auberginensorten sind ein ausgezeichnetes selektives Anreicherungsmedium für das Wachstum von *C. m.* subsp. *sepedonicus*, selbst wenn keine Symptome erkennbar sind, und perfekt geeignet für Bestätigungstests an der Wirtpflanze.

Die Wachstumsbedingungen müssen optimal sein, um falsch-negative Testergebnisse zu vermeiden.

Für Einzelheiten zur Kultivierung siehe Anlage 8.

7.1. Das gesamte restliche Testaliquot des resuspendierten Pellets (siehe Abschnitt 3.1.6 bzw. 3.2.5) nach einer der nachstehend beschriebenen Methoden (Abschnitt 7.3 oder 7.4) auf die Auberginenpflanzen verteilen. Nur Pflanzen im Blattstadium 2-3, d. h. bis zur vollen Ausbildung des dritten Blattes, verwenden. Um zu gewährleisten, dass das resuspendierte Pellet vollständig verwendet wird und die Beimpfung wirksam ist, sind für die nachstehend beschriebenen Verfahren 15-25 Auberginen je Probe erforderlich.

7.2. Die Auberginen für 1 bis 2 Tage vor der Beimpfung nicht wässern, um den osmotischen Druck (Turgor) zu verringern.

7.3. Schlitzinokulation

7.3.1. Die Auberginenpflanze zwischen zwei Fingern halten, einen Tropfen (etwa 5 bis 10 µl) des suspendierten Pellets zwischen den Keimblättern und dem ersten Blatt auf den Stängel pipettieren.

7.3.2. Mit einem sterilen Skalpell den Stängel vom Pellettropfen aus diagonal 1,0 cm lang und etwa zwei Drittel der Stängeldicke tief einritzen.

7.3.3. Den Schnitt mit steriler Vaseline (Spritze) versiegeln.

7.4. Spritzeninokulation

Die Auberginenstängel mit einer Spritze, die mit einer hypodermischen Nadel (nicht weniger als 23G) versehen ist, direkt über den Keimblättern beimpfen. Die Probe auf die Auberginenpflanze verteilen.

7.5. Als Positivkontrollen 5 Auberginenpflanzen nach derselben Inokulationsmethode (7.3 bzw. 7.4) mit einer wässrigen Suspension von 10^5 bis 10^6 Zellen je ml einer bekannten Kultur von *C. m.* subsp. *sepedonicus* und, soweit möglich, mit natürlich infiziertem Knollengewebe (siehe Abschnitt 4) beimpfen.

7.6. Als Negativkontrolle 5 Pflanzen nach derselben Inokulationsmethode (7.3 bzw. 7.4) mit sterilem Pelletpuffer beimpfen.

7.7. Die Pflanzen in Quarantäneeinrichtungen bei 18-24 °C für bis zu vier Wochen inkubieren. Dabei für ausreichende Beleuchtung und hohe Feuchtigkeit (70-80 %) sorgen und regelmäßig wässern, um Staunässe oder Welken durch Wassermangel zu verhindern. *C. m.* subsp. *sepedonicus* Zellen werden bei Temperaturen von über 30 °C abgetötet; die optimale Temperatur liegt bei 21 °C. Um Kontaminationen zu vermeiden, positive und negative Kontrollpflanzen auf getrennten Arbeitstischen in einem Gewächshaus oder einer Wachstumskammer inkubieren oder, bei Platzmangel, sicherstellen, dass die Behandlungen streng getrennt erfolgen. Müssen verschiedene Proben eng nebeneinander inkubiert werden, so sind sie durch geeignete Schutzwände zu trennen. Beim Düngen, Wässern, Untersuchen oder anderen Behandlungen sind alle erforderlichen Vorkehrungen zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Gewächshäuser und Wachstumskammern müssen unbedingt frei von Insekten jeder Art gehalten werden, da diese das Bakterium von Probe zu Probe übertragen können.

▼M1

7.8. Nach einer Woche regelmäßig auf Symptome untersuchen. Pflanzen mit Symptomen zählen. *C. m.* subsp. *sepedonicus* verursacht Welken, das mit einer Schlaffheit der Blätter an den Rändern oder zwischen den Blattnerven beginnen kann. Welkes Gewebe kann zunächst dunkelgrün oder gesprenkelt aussehen, erblasst jedoch, bevor es nekrotisch wird. Welke Stellen zwischen den Blattnerven haben häufig ein öliges wässrig durchtränktes Aussehen. Nekrotisches Gewebe hat oft einen hellgelben Rand. Die Auberginen sterben nicht unbedingt ab; je länger es dauert, bis sich Symptome entwickeln, desto größer die Überlebenschancen. Die Pflanzen können aus der Infektion herauswachsen. Junge Auberginen sind gegenüber niedrigen Populationen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* wesentlich empfindlicher als ältere Pflanzen; deshalb sollten die Pflanzen im oder kurz vor Blattstadium 3 verwendet werden.

Das Welken kann auch durch das Vorhandensein anderer Bakterien oder Pilze hervorgerufen werden, die sich im Knollengewebepellet befinden. Dazu gehören *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* und *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata* sowie große Populationen saprophytischer Bakterien. Insbesondere *Erwinia chrysanthemi* kann Blattsymptome und eine Welke hervorrufen, die den Welkesymptomen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* sehr ähnlich ist. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Stängel bei *Erwinia-chrysanthemi*-Infektionen schwarz werden. Andere Welken lassen sich von der durch *C. m.* subsp. *sepedonicus* hervorgerufenen Welke dadurch unterscheiden, dass rasch ganze Blätter oder ganze Pflanzen welken. Zur Differenzierung zwischen *C. m.* subsp. *sepedonicus* und *Erwinia* spp. kann auch eine Gram-Färbung vorgenommen werden.

7.9. Sobald an den Auberginenpflanzen Symptome festgestellt werden, sollte an welken Blattabschnitten oder Stängelteilen der Pflanzen (siehe 3.1.3 für Gewebezerkleinerung) eine Reisolierung vorgenommen werden. Die Oberfläche der Auberginenblätter und -stängel durch Abreiben mit 70 %igem Ethanol desinfizieren. Einen IF- oder PCR-Test am Pflanzensaft durchführen und auf einem geeigneten (selektiven) Medium (siehe Abschnitt 8) isolieren. Es kann auch eine Gram-Färbung (siehe Anlage 9) vorgenommen werden. Reinkulturen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* verdächtigen Isolaten identifizieren und die Pathogenität bestätigen (siehe Abschnitte 9 und 10).

7.10. Unter bestimmten Umständen, insbesondere dann, wenn die Wachstumsbedingungen nicht optimal sind, kann es vorkommen, dass *C. m.* subsp. *sepedonicus* in den Auberginen selbst nach einer Inkubationszeit von bis zu vier Wochen als latente Infektion weiter besteht. Werden nach vier Wochen keine Symptome festgestellt, den IF-/PCR-Test an einer Mischprobe von 1 cm langen Stängelabschnitten jeder Testpflanze, die über der Inokulationsstelle herausgeschnitten werden, durchführen. Fällt der Test positiv aus, so sollte nach dem Verfahren gemäß Abschnitt 8 eine Reisolierung auf geeigneten (selektiven) Medien vorgenommen werden. Reinkulturen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* verdächtigen Isolaten identifizieren und die Pathogenität bestätigen (siehe Abschnitte 9 und 10).

Auswertung des Biotest-Ergebnisses:

Gültig sind Biotest-Ergebnisse, wenn Pflanzen der Positivkontrolle typische Symptome zeigen, das Bakterium aus diesen Pflanzen reisoliert werden kann und bei den Negativkontrollen keine Symptome festgestellt werden.

Das Testergebnis ist negativ, wenn die Testpflanzen nicht mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* infiziert sind und sofern *C. m.* subsp. *sepedonicus* in Positivkontrollen nachgewiesen wird.

Das Testergebnis ist positiv, wenn die Testpflanzen mit *C. m.* subsp. *sepedonicus* infiziert sind.

8. ISOLIERUNG VON *C. M.* SUBSP. *SEPEDONICUS*

Hinweis:

Die Diagnose gilt erst als gesichert, wenn *C. m.* subsp. *sepedonicus* isoliert und anschließend identifiziert (siehe Abschnitt 9) und durch einen Pathogenitätstest (Abschnitt 10) bestätigt wird. Obgleich *C. m.* subsp. *sepedonicus* ein anspruchsvoller Organismus ist, lässt er sich dennoch aus symptomatischem Gewebe isolieren.

Der Erreger kann jedoch von rasch wachsenden saprophytischen Bakterien überwuchert werden; daher ist das Isolieren direkt aus dem Knollen- oder Stängelgewebepellet (Abschnitt 3.1.6 bzw. 3.2.5) schwierig. Mit selektivem Medium und einer geeigneten Verdünnung

▼M1

der resuspendierten Pellets aus Nabelendenstücken der Kartoffel oder Stängeln von Kartoffelpflanzen lässt sich *C. m.* subsp. *sepedonicus* möglicherweise direkt isolieren.

Isolierungen sind bei allen Kartoffelknollen oder Stängelstücken mit entsprechenden Symptomen und bei Auberginen vorzunehmen, bei denen zwar keine Symptome festgestellt werden, deren Mischprobe bei der IF-/PCR-Testung jedoch positiv ausgefallen ist (siehe Abschnitt 7.10). Ist eine Zerkleinerung von Auberginenstängeln erforderlich, so sollte sie nach den Vorgaben vom Abschnitt 3.1.3 durchgeführt werden.

Als Positivkontrollen sind Dezimalverdünnungen aus einer Suspension von 10^6 cfu je ml *C. m.* subsp. *sepedonicus* (z. B. NCPPB 4053 oder PD 406) herzustellen. Um jegliches Risiko einer Kontamination zu vermeiden, sind die Positivkontrollen von den Testproben völlig getrennt herzustellen.

Für jede neu hergestellte Charge eines Selektivmediums ist dessen Eignung für das Wachstum des Erregers zu prüfen, bevor es zur Untersuchung von Routineproben verwendet wird.

Das Kontrollmaterial nach demselben Verfahren wie die Probe(n) testen.

8.1. **Selektivausstrich**

8.1.1. Aus einem 100 µl Aliquot einer resuspendierten Kartoffelpelletprobe oder von Auberginensaft 10fache Verdünnungen in Pelletpuffer (Anlage 3) herstellen.

8.1.2. Die Isolierung aus unverdünntem Kartoffelpellet gelingt aufgrund des problematischen Wachstumsverhaltens des Erregers und der Konkurrenz durch Saprophyten in der Regel nicht. Da das Bakterium gewöhnlich in hohen Populationen in infiziertem Gewebe vorliegt, können die Saprophyten in der Regel ausverdünnt werden, während der Erreger noch vorhanden bleibt. Daher wird empfohlen, 100 µl von jeder Probe, 1/100 bis 1/10 000 verdünnt, mit Ausstrichspateln („hockey sticks") nach dem Ausstrichverfahren auf MTNA-Medium oder NCP-88-Medium (Anlage 5) auszustreichen (für 90 mm Petrischalen geeignet, die Menge bei Verwendung anderer Schalengröße anpassen).

Hinweis:

Alternativ kann das ursprüngliche 100 µl Kartoffelpelletaliquot (1/100) mit einem Spatel auf einer ersten Agarplatte ausgestrichen werden. Anschließend das noch am Spatel anhaftende Restaliquot auf einer zweiten Agarplatte ausstreichen und den Vorgang schließlich mit einer dritten Platte wiederholen, wodurch mit dem Spatel ein Verdünnungsausstrich erreicht wird.

8.1.3. Die Platten im Dunkeln bei 21-23 °C inkubieren.

8.1.4. Die Platten nach drei Tagen erstmals untersuchen und, im Vergleich zu den Referenzplatten, alle *C. m.* subsp. *sepedonicus* ähnlichen Kolonien zählen; weitere Zählungen nach 5, 7 und ggf. 10 Tagen vornehmen.

8.2. **Reinigung verdächtiger Kolonien**

Hinweis:

Für die Inokulation der Auberginen und/oder anschließende Identifizierung sind *C. m.* subsp. *sepedonicus* ähnliche Kolonien zuvor auf YGM-Medium zu kultivieren; dies sollte geschehen, bevor die Platten all zu überwachsen sind, d. h. vorzugsweise nach 3-5 Tagen.

8.2.1. *C. m.* subsp. *sepedonicus* ähnliche Kolonien auf einem der folgenden Medien ausstreichen (Zusammensetzung siehe Anlage 5):

Dextrose-Nähragar (nur für die Subkultivierung verwenden),

Hefe-Pepton-Glucose-Agar,

Hefeextrakt-Mineralsalz-Agar.

Maximal 10 Tage bei 21-24 °C inkubieren.

C. m. subsp. *sepedonicus* wächst langsam und bildet innerhalb von 10 Tagen in der Regel winzige, cremefarbene, kuppelförmige Kolonien (für Fotos typischer Kolonien von *C. m.* subsp. *sepedonicus* siehe Internet-Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

▼M1

8.2.2. Zur Herstellung der Reinkultur erneut ausstreichen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit verbessert sich mit der Subkultivierung. Typische Kolonien sind cremig-weiß oder elfenbeinfarben, gelegentlich auch gelb, abgerundet, glatt, erhöht, konvex gewölbt, schleimig-flüssig, mit glatten Rändern und einem Durchmesser von in der Regel 1 bis 3 mm.

Eine einfache Gram-Färbung (siehe Anlage 9) kann bei der Auswahl von Kolonien für weitere Testungen hilfreich sein.

8.2.3. Verdächtige Kulturen identifizieren (siehe Abschnitt 9) und einen Pathogenitätstest durchführen (siehe Abschnitt 10).

9. IDENTIFIZIERUNG

Reinkulturen von *C. m.* subsp. *sepedonicus* verdächtigen Isolaten mit mindestens zwei der folgenden Testmethoden, die auf unterschiedlichen biologischen Grundsätzen beruhen, identifizieren.

Für jeden durchgeführten Test ggf. bekannte Referenzstämme einbeziehen.

9.1. **Nähr- und enzymatische Tests zur Identifizierung**

Die folgenden phänotypischen Eigenschaften, die bei *C. m.* subsp. *sepedonicus* entweder allgemein vorhanden oder nicht vorhanden sind, nach den Methoden von Lelliott and Stead (1987), Klement *et al.* (1990), Schaad (2001) und Anonymous (1987) bestimmen.

Alle Medien bei 21 °C inkubieren und nach sechs Tagen untersuchen. Wird kein Wachstum festgestellt, maximal 20 Tage weiter inkubieren.

Alle Tests müssen eine bekannte *C. m.* subsp. *sepedonicus* Kontrolle einschließen. Nährtests und physiologische Tests müssen mit Inokula aus Nähragar-Subkulturen durchgeführt werden. Morphologische Vergleiche müssen auf Dextrose-Nähragar-angezogenen Kulturen durchgeführt werden.

Tests	*Erwartetes Ergebnis*
Oxidations-/Fermentationstest (O/F)	inert oder schwach oxidativ
Oxidaseaktivität	–
Wachstum bei 37 °C	–
Ureaseaktivität	–
Aesculinhydrolyse	+
Stärkehydrolyse	– oder schwach
Toleranz von 7 % NaCl	–
Indolproduktion	–
Katalaseaktivität	+
H_2S-Produktion	–
Citratverwertung	–
Gelatineverflüssigung	–
Säure von Glyzerin	–
Säure von Laktose	– oder schwach
Säure von Rhamnose	–
Säure von Salizin	–
Gram-Färbung (Anlage 9)	+

9.2. **IF-Test**

a) Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in IF-Puffer herstellen (siehe Anlage 3).

b) Eine 2fache Verdünnungsreihe eines geeigneten Antikörpers herstellen.

c) IF-Verfahren anwenden (siehe Abschnitt 4).

d) Der IF-Test ist positiv, wenn der IF-Titer der Kultur dem der Positivkontrolle entspricht.

▼M1

9.3. **PCR-Test**

a) Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in Reinstwasser (UPW) herstellen.

b) 100 µl der Zellsuspension in geschlossenen Röhrchen in einem Thermoblock oder Siedewasserbad bei 100 °C für 4 Minuten erhitzen. Erforderlichenfalls kann die Zelllysis durch Zugabe frisch zubereiteter NaOH mit einer Endkonzentration von 0,05M unterstützt werden. Die Proben können anschließend bis zu ihrer Verwendung bei –16 bis –24 °C gelagert werden.

c) Geeignete PCR-Verfahren anwenden, um *C .m.*-subsp.-*sepedonicus*-spezifische PCR-Produkte (z. B. Pastrik, 2000; siehe Anlage 4; Li and de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999) zu amplifizieren.

d) *C. m.* subsp. *sepedonicus* gilt als positiv identifiziert, wenn die PCR-Produkte dieselbe Größe und dieselben Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen aufweisen wie der positive Kontrollstamm.

9.4. **FISH-Test**

a) Eine Suspension von annähernd 10^6 Zellen je ml in Reinstwasser (UPW) herstellen.

b) FISH-Verfahren anwenden (siehe Abschnitt 5).

c) Der FISH-Test ist positiv, wenn die Kultur ebenso reagiert wie die Positivkontrolle.

9.5. **Bestimmung des Fettsäureprofils (FAP)**

a) Die Kultur auf Trypticase-Soja-Agar (Oxoid) für 72 Stunden bei 21 °C (+/- 1°) anzüchten.

b) Ein geeignetes FAP-Verfahren anwenden (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Ein FAP-Test ist positiv, wenn das Profil der verdächtigen Kultur mit dem der Positivkontrolle identisch ist. Das Vorliegen charakteristischer Fettsäuren (15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso, 16:0 und 17:0 Anteiso) deutet mit hoher Sicherheit auf *C. m.* subsp. *sepedonicus* hin. Andere Gattungen wie *Curtobacterium, Arthrobacter* und *Micrococcus* weisen einige dieser Säuren ebenfalls auf, 15:1 Anteiso A ist bei diesen Bakterien jedoch eine Seltenheit, kommt allerdings zwischen 1-5 % in allen *Clavibacter* spp. vor. In *C. m.* subsp. *sepedonicus* liegt der Wert in der Regel bei 5 %.

9.6. **BOX-PCR**

a) Eine Suspension aus annähernd 10^6 Zellen je ml in Reinstwasser (UPW) herstellen.

b) Den Test nach dem entsprechenden Verfahren durchführen (Smith *et al.*, 2001).

10. BESTÄTIGUNGSTEST

Der Pathogenitätstest dient der endgültigen Bestätigung der Diagnose von *C. m.* subsp. *sepedonicus* und der Bewertung der Virulenz von als *C. m.* subsp. *sepedonicus* identifizierten Kulturen.

10.1. Aus drei Tage alten Kulturen des zu testenden Isolats und einem geeigneten positiven Kontrollstamm von *C. m.* subsp. *sepedonicus* ein Inokulum mit einer Zelldichte von etwa 10^6/ml herstellen.

10.2. 5-10 Stängel junger Auberginensämlinge im Blattstadium 3 beimpfen (siehe Abschnitt 7.3 oder 7.4).

10.3. Die Pflanzen bei 18-24 °C inkubieren. Dabei für ausreichende Beleuchtung und hohe relative Feuchtigkeit sorgen und regelmäßig wässern, um Staunässe bzw. Trockenheitsstress zu verhindern (siehe Abschnitt 7.7). Bei Reinkulturen setzt die typische Welke innerhalb von zwei Wochen ein, symptomfreie Pflanzen (siehe Abschnitt 7.8) sollten danach jedoch für bis zu drei Wochen inkubiert werden, und zwar bei Temperaturen, die das Auberginenwachstum fördern, jedoch 25 °C nicht überschreiten (siehe Anlage 8). Treten nach drei Wochen keine Symptome auf, so kann die Kultur nicht als eine pathogene Form von *C. m.* subsp. *sepedonicus* bestätigt werden.

10.4. Von Pflanzen mit Symptomen wie folgt isolieren: Ein Stängelstück 2 cm oberhalb der Inokulationsstelle herausschneiden, zerkleinern und in wenig sterilem destilliertem Wasser oder 50 mM Phosphatpuffer (siehe Anlage 3) suspendieren. Aus der Suspension durch

▼**M1**

Verdünnungsausstrich oder Ausstrich auf MTNA und YPGA (siehe Anlage 5) isolieren, 3-5 Tage bei 21-23 °C inkubieren und auf Bildung typischer *C. m.* subsp. *sepedonicus* Kolonien achten.

▼**M1**

Anlage 1

An der Optimierung und Validierung von Protokollen beteiligte Laboratorien

Labor [1]	Ort	Land
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien und Linz	Österreich
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgien
Plantedirektoratet	Lyngby	Dänemark
Central Science Laboratory	York	England
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Schottland
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Frankreich
Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Station de Quarantaine de la Pomme de Terre	Le Rheu	Frankreich
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Deutschland
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Deutschland
State Laboratory	Dublin	Irland
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Niederlande
Norwegian Crop Research Institute, Plant Protection Centre	Aas	Norwegen
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugal
Nacionalni institut za biologijo	Ljubljana	Slowenien
Centro de Diagnóstico de Aldearrubia	Salamanca	Spanien

[1] Kontaktperson: siehe Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main

▼M1

Anlage 2

Vorbereitung der Positiv- und Negativkontrollen für die Haupt-Screening-tests (PCR/IF und FISH)

Eine 72 Stunden alte Kultur eines virulenten Stammes von *C. m.* subsp. *sepedonicus* [NCPPB 4053 oder PD 406] auf MTNA-Basismedium anzüchten und in 10 mM Phosphatpuffer suspendieren, um eine Zelldichte von annähernd 1 bis 2 × 10^8 cfu je ml zu erhalten. Dieses Ergebnis wird in der Regel erzielt durch eine leicht trübe Suspension mit einer optischen Dichte von 0,20 bei 600 nm.

An den Nabelenden von 200 Knollen einer gelbschaligen Kartoffelsortenpartie, die nachweislich frei von *C. m.* subsp. *sepedonicus* ist, Stückchen aus dem Gefäßbündelring herausschneiden.

Die Nabelenden wie gewöhnlich verarbeiten und das Pellet in 10 ml resuspendieren.

10 sterile 1,5-ml-Mikroröhrchen mit 900 µl des resuspendierten Pellets herstellen.

100 µl der Suspension von *C. m.* subsp. *sepedonicus* in das erste Röhrchen geben und vortexen.

In den nächsten fünf Röhrchen weitere Dezimalverdünnungen anlegen.

Die sechs kontaminierten Röhrchen als Positivkontrollen, die vier nicht kontaminierten Röhrchen als Negativkontrollen verwenden. Die Röhrchen entsprechend beschriften.

100 µl Aliquots in sterilen 1,5-ml-Röhrchen anlegen, um von jeder Kontrollprobe 9 Parallelproben zu erhalten. Bis zur weiteren Verwendung bei –16 bis –24 °C lagern.

Das Vorhandensein und die Quantifizierung von *C. m.* subsp. *sepedonicus* in den Kontrollproben sollte zunächst durch den IF-Test bestätigt werden.

Für den PCR-Test bei jeder Testprobenreihe eine DNA-Extraktion aus positiven und negativen Kontrollproben vornehmen.

Für den IF- und FISH-Test bei jeder Testprobenreihe positive und negative Kontrollproben testen.

Beim IF-, FISH- und PCR-Test muss *C. m.* subsp. *sepedonicus* zumindest in den Positivkontrollen mit 10^6 und 10^4 Zellen/ml, darf jedoch in keiner der Negativkontrollen nachgewiesen werden.

▼M1

Anlage 3

Puffer für Testverfahren

ALLGEMEINE ANMERKUNG: Sterile Puffer können ungeöffnet bis zu einem Jahr lang gelagert werden.

1. **Puffer für Extraktionsverfahren**

1.1. *Extraktionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0)*

Dieser Puffer wird für die Extraktion des Bakteriums aus Pflanzengewebe durch Homogenisierung oder Schütteln verwendet.

Na_2HPO_4 (anhydrid)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen lösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Die folgenden zusätzlichen Komponenten können zweckdienlich sein:

	Zweck	Menge (je Liter)
Lubrolflocken	Verflüssigungs-mittel (*)	0,5 g
DC-Silicon-Antischaum	Schaumdämpfungs-mittel (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrophosphat	Antioxidations-mittel	1,0 g
Polyvinylpyrrolidon-40 000 (PVP-40)	Bindung von PCR-Inhibitoren	50 g

(*) Für die Extraktion durch Homogenisierung.

1.2. *Pelletpuffer (10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2)*

Dieser Puffer wird für die Resuspendierung und Verdünnung von Extrakten von Gewebestückchen verwendet, die an den Nabelenden von Kartoffelknollen herausgeschnitten wurden, nachdem sie durch Zentrifugieren zu Pellets konzentriert worden waren.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen auflösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

2. **Puffer für den IF-Test**

2.1. *IF-Puffer (10 mM phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2)*

Dieser Puffer wird für die Verdünnung von Antikörpern verwendet.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCL	8,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen, pH-Wert messen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

2.2. *IF-Puffer-Tween*

Dieser Puffer wird zum Waschen von Objektträgern verwendet.

0,1 % Tween 20 zum IF-Puffer geben.

2.3. *Phosphatgepuffertes Glyzerin, pH 7,6*

Dieser Puffer wird als Einbettungsmittel auf den Feldern der IF-Objektträger zur Verbesserung der Fluoreszenz verwendet.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,20 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glyzerin	50 ml
Destilliertes Wasser	100 ml

▼**M1**

Antifading-Eindeckungsmittel sind beispielsweise als Vectashield® (Vector Laboratories) oder Citifluor® (Leica) im Handel erhältlich.

▼**M1**

Anlage 4

Ermittlung des Kontaminationsgrads im IF- und FISH-Test

1. Mittlere Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je Sichtfeld (c) zählen.
2. Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je Mikroskopfeld des Objektträgers (C) berechnen.

   $C = c \times S/s$

   wobei S = Fläche eines Feldes eines Multiwell-Objektträgers und

   s = Fläche des Objektivfelds

   $s = \pi i^2/4G^2K^2$ wobei i = Feldkoeffizient (variiert zwischen 8 und 24 je nach Okulartyp)

   K = Tubuskoeffizient (1 oder 1,25)

   G = Vergrößerung des Objektivs (100fach, 40fach usw.).

3. Anzahl typischer fluoreszierender Zellen je ml resuspendiertes Pellet (N) berechnen.

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

   wobei y = Volumen des resuspendierten Pellets auf jedem Objekträgerfeld und

   F = Verdünnungsfaktor des resuspendierten Pellets.

▼**M1**

Anlage 5

Medien zur Isolierung und Kultivierung von *C. m.* **subsp.** *sepedonicus*

a) *Universalnährmedien*

Nähragar (NA)

Nähragar (Difco)	23,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Dextrose-Nähragrar (NDA)

Difco-Bacto-Nähragrar mit 1 % D(+)-Glucose (Monohydrat). Sterilisieren durch 20-minütiges Autoklavieren bei 115 °C.

Hefe-Pepton-Glucose-Agar (YPGA)

Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
Bacto-Pepton (Difco)	5,0 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

Hefeextrakt-Mineralsalzmedium (YGM)

Difco-Bacto-Hefeextrakt	2,00 g
D(+)-Glucose (Monohydrat)	2,50 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,10 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Difco-Bacto-Agar	18,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und je 1/2 Liter des Mediums durch 20-minütiges Autoklavieren bei 115 °C sterilisieren.

b) *Validierte Selektivnährmedien*

MTNA-Medium

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Komponenten des Mediums von BDH.

Hefeextrakt (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid Nr. 1)	16,0 g
Destilliertes Wasser	1,0 L

Substanzen auflösen und pH auf 7,2 einstellen. Nach 15-minütigem Autoklavieren bei 121 °C und Abkühlen auf 50 °C die Antibiotika Trimethoprim 0,06 g, Nalixidinsäure 0,002 g, Amphotericin B 0,01 g zugeben.

▼**M1**

Antibiotika-Stammlösungen: Trimethoprim (Sigma) und Nalixidinsäure (Sigma) (beide 5 mg/ml) in 96 %igem Methanol, Amphotericin B (Sigma) (1 mg/ml) in Dimethylsulfoxid. Stammlösungen sind filtersterilisiert.

Hinweis:

Basismedium ist 3 Monate lang haltbar. Nach Zugabe von Antibiotika beträgt die Haltbarkeitsdauer bei Kühlschranklagerung 1 Monat.

NCP-88-Medium

Nähragar (Difco)	23 g
Hefeextrakt (Difco)	2 g
D-Mannitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Destilliertes Wasser	1,0 l

Substanzen auflösen und pH auf 7,2 einstellen. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C die Antibiotika Polymyxin-B-sulfat (Sigma) 0,003g, Nalixidinsäure (Sigma) 0,008 g und Cycloheximid (Sigma) 0,2 g zugeben.

Antibiotika wie folgt in Stammlösungen auflösen: Nalixidinsäure in 0,01 M NaOH, Cycloheximid in 50 %igem Ethanol, Polymyxin-B-sulfat in destilliertem Wasser. Stammlösungen sind filtersterilisiert.

Hinweis:

Basismedium ist 3 Monate lang haltbar. Nach Zugabe von Antibiotika beträgt die Haltbarkeitsdauer bei Kühlschranklagerung 1 Monat.

▼M1

Anlage 6

Validiertes PCR-Protokoll und validierte Reagenzien

Hinweis:

Vorausgehende Tests müssen den reproduzierbaren Nachweis von mindestens 10^3 bis 10^4 Zellen von *C. m. sepedonicus* je ml Probenextrakt garantieren.

Vorausgehende Tests dürfen keine falsch-positiven Ergebnisse bei bestimmten ausgewählten Bakterienstämmen zeigen.

1. **Multiplex-PCR-Protokoll mit interner PCR-Kontrolle (Pastrik, 2000)**

1.1. *Oligonucleotid-Primer*

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

Erwartete Fragmentlänge des *C.-m.*-subsp.-*sepedonicus-spezifischen PCR-Produktes* = 502 bp (PSA-Primerset).

Erwartete Fragmentlänge der 18S-rRNA-internen PCR-Kontrolle = 377 bp (NS-Primerset).

1.2. *PCR-Reaktionsmischung*

Reagenz	Menge je Reaktion	Endkonzentration
Steriles Reinstwasser (UPW)	15,725 µl	
10x PCR-Puffer (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1x (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (Fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-Mix (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10 µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
TaqPolymerase (5 U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Probenvolumen	5,0 µl	
Gesamtvolumen	25,0 µl	

(1) Die Methoden wurden validiert mit den Taq-Polymerasen von Perkin Elmer (AmpliTaq oder Gold) und Gibco BRL.

(2) Die Konzentrationen der Primer NS-7 F und NS-8-R wurden optimiert für die Extraktion von Gewebestückchen von Kartoffelnabelenden durch Homogenisierung und DNA-Reinigung nach Pastrik (2000) (siehe Abschnitte 6.1.a und 6.2). Eine erneute Optimierung der Reagenzkonzentrationen wird erforderlich, wenn die Extraktion durch Schütteln oder nach anderen DNA-Isolierungsmethoden erfolgt.

1.3. *PCR-Reaktionsbedingungen*

Programmablauf:

1 Zyklus:	i)	3 Minuten bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
10 Zyklen:	ii)	1 Minute bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
	iii)	1 Minute bei 64 °C (Primer-Anlagerung)
	iv)	1 Minute bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)
25 Zyklen	v)	30 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung der Ziel-DNA)
	vi)	30 Sekunden bei 62 °C (Primer-Anlagerung)
	vii)	1 Minute bei 72 °C (Verlängerung der Kopie)

▼**M1**

1 Zyklus:	viii)	5 Minuten bei 72 °C (Endverlängerung)
	ix)	auf 4 °C abkühlen.

Hinweis:

Dieses Programm wurde für den MJ-Research-PTC-200-Thermocycler optimiert. Bei anderen Modellen (Geräten) kann eine Änderung der Dauer der Zyklusschritte ii, iii, iv, v, vi und vii erforderlich sein.

1.4. *Restriktionsenzymanalyse des Fragments*

PCR-Produkte, die von *C.-m.*-subsp.-*sepedonicus*-DNA amplifiziert werden, zeigen nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C mit Enzym *Bgl* II einen erkennbaren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Die Restriktionsfragmente der *C.-m.*-subsp.-*sepedonicus*-spezifischen Fragmente haben eine Größe von 282 bp und 220 bp.

2. **Vorbereitung des Beladungspuffers**

2.1. *Bromphenolblau (10 %-Stammlösung)*

Bromphenolblau	5 g
Destilliertes Wasser (bidest)	50 ml

2.2. *Beladungspuffer*

Glyzerin (86 %)	3,5 ml
Bromphenolblau (5,1)	300 µl
Destilliertes Wasser (bidest)	6,2 ml

3. **10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), pH 8,0**

Tris-Puffer	48,40 g
Eisessig	11,42 ml
EDTA (Dinatriumsalz)	3,72 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Vor Gebrauch auf 1x verdünnen.

Auch im Handel erhältlich (z. B. Invitrogen oder gleichwertiges Produkt).

▼M1

Anlage 7

Validierte Reagenzien für den FISH-Test

1. **Oligo-Sonden**

Cms-spezifische Sonde CMS-CY3-01:	5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg -3'
Eubakterielle Universalsonde EUB-338-FITC:	5' gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fixierlösung**

[ACHTUNG! FIXATIV ENTHÄLT TOXISCHES PARAFORMALDEHYD. HANDSCHUHE TRAGEN UND NICHT EINATMEN. ES WIRD EMPFOHLEN, UNTER DEM ABZUG ZU ARBEITEN.]

i) 9 ml molekular reines Wasser (z. B. Reinstwasser (UPW)) auf ca. 60 ° C erhitzen und 0,4 g Paraformaldehyd hinzufügen. Paraformaldehyd mit 5 Tropfen 1N NaOH auflösen und mit einem Magnetrührer rühren.

ii) Durch Hinzufügen von 1 ml 0,1M Phosphatpuffer (PB; pH 7,0) und 5 Tropfen 1N HCl auf pH-Wert 7,0 einstellen. pH-Wert mit Indikatorstreifen prüfen und erforderlichenfalls mit HCl oder NaOH justieren.

[ACHTUNG! IN PARAFORMALDEHYD-LÖSUNGEN KEIN PH-MESSGERÄT VERWENDEN.]

iii) Lösung durch 0,22-µm-Membranfilter filtern und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung staubfrei lagern.

iv) *Hinweis:*

Alternative Fixierlösung: 96 %iges Ethanol.

3. **3x Hybmix**

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (filtersterilisiert und autoklaviert)	15 mM

Verdünnen auf 1x Hybmix vor Gebrauch.

4. **Hybridisierungslösung**

1x Hybmix

Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	0,01 %
EUB-338-Sonde	5 ng/µl
CMSCY301-Sonde	5 ng/µl

Zubereitung der Hybridisierungslösung in den nach Tabelle 1 berechneten Mengen. Für jeden Objektträger (mit 2 duplizierten unterschiedlichen Proben) sind 90 µl Hybridisierungslösung erforderlich.

Tabelle: Empfohlene Mengen für die Zubereitung der Hybridisierungsmischung

	2 Objektträger	8 Objektträger
Steriles UPW	50,1	200,4
3x Hybmix	30,0	120,0
1 % SDS	0,9	3,6
EUB-338-Sonde (100 ng/µl)	4,5	18,0
CMSCY301-Sonde (100 ng/µl)	4,5	18,0
Gesamtvolumen (µl)	90,0	360,0

Anmerkung: Alle Lösungen mit den lichtempfindlichen Oligo-Sonden bei -20 °C im Dunkeln lagern. Während des Gebrauchs vor direktem Sonnenlicht und künstlichem Licht schützen.

▼**M1**

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

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g
Destilliertes Wasser	1,00 l

Substanzen auflösen, den pH-Wert prüfen und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisieren.

▼M1

Anlage 8

Auberginenkultivierung

Auberginensamen (*Solanum melongena*) in pasteurisierte Anzuchterde säen. Sämlinge mit voll entfalteten Keimblättern (nach 10 bis 14 Tagen) in pasteurisierte Topferde umsetzen.

Auberginen in einem Gewächshaus anziehen, das die folgenden Umweltbedingungen erfüllt:

Tageslänge:		14 Stunden oder natürliche Tageslänge, wenn länger.
Temperatur:	tagsüber:	21 bis 24 °C,
	nachts:	15 °C.

Anfällige Auberginensorten:
„Black Beauty”,
„Long Tom”,
„Rima”,
„Balsas”.

Lieferant: siehe Website: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main.

▼M1

Anlage 9

Gram-Färbungsverfahren (modifiziert nach Hucker) (Doetsch, 1981) ([1])

Kristallviolett-Lösung

2 g Kristallviolett in 20 ml 95 %igem Ethanol auflösen.

0,8 g Ammoniumoxalat in 80 ml destilliertem Wasser auflösen.

Die beiden Lösungen mischen.

Lugols Jodlösung

Jod	1 g
Kaliumjodid	2 g
Destilliertes Wasser	300 ml

Die festen Stoffe mit einem Stößel im Mörser zerreiben. In einem geschlossenen Behältnis zum Wasser hinzufügen und umrühren, bis sie sich auflösen.

Safranin-Gegenfärbelösung

Stammlösung:

Safranin O	2,5 g
95 %iges Ethanol	100 ml

Mischen und Lagern.

Im Verhältnis 1:10 verdünnen, um eine Arbeitslösung zu erhalten.

Färbeverfahren

1. Luftgetrocknete und hitzefixierte Ausstriche herstellen.
2. Objektträger für 1 Minute mit Kristallviolettlösung überspülen.
3. Kurz mit Leitungswasser abspülen.
4. Für 1 Minute mit Lugols Jod überspülen.
5. Mit Leitungswasser abspülen und trocken tupfen.
6. Mit tropfenweise hinzugefügtem 95 %igem Ethanol entfärben, bis keine weitere Farbe mehr entfernt wird, oder für 30 Sekunden unter leichtem Rühren eintauchen.
7. Mit Leitungswasser abspülen und trocken tupfen.
8. Für 10 Sekunden mit Safranin-Lösung überspülen.
9. Mit Leitungswasser abspülen und trocken tupfen.

Gram-positive Bakterien färben sich violettblau; Gram-negative Bakterien färben sich rosarot.

BIBLIOGRAPHIE

1. Anonymous, 1987. Scheme of the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Luxembourg. Publ EUR 11288 EN, 21 pp.
2. Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.
3. Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.
4. Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
5. Hugh, R. and Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24-26.
6. Janse, J. D., 1991. Infra- and intra-specific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty-acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14; 335-345.

([1]) Es können auch gewerblich angebotene Lösungen und Färbungskits verwendet werden.

▼**M1**

7. Janse, J. D. and J. Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Corynebacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., No 17, 1987, pp. 1-10.

8. Jansing, H. and K. Rudolph, 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. Journal of Plant Diseases and Protection, 105, 590-601.

9. Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

10. Klement Z.; Rudolph, K and D. C. Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, 568 pp.

11. Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114-118.

12. Lelliott, R. A., E. Billing and A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470-489.

13. Lelliott, R. A. and P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. et Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 (2), 101-106.

14. Li, X. and S.H. de Boer, 1995. Selection of Polymerase Chain Reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Phytopathology, 85, 837-842.

15. Mills, D., Russell, B., W. and J., W. Hanus, 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology, 87, 8, 853-861.

16. Pastrik, K. -H. and R.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathology 147; 687-693.

17. Pastrik, K.-H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology, 106, 155-165.

18. Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

19. Schaad, W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095-1100.

20. Schaad, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad [Hrsg.]. - 3. ed.; St. Paul, Minnesota:, 373 pp.

21. Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd ed., William and Wilkins Company, Baltimore.

22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. Repetetive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 *Ralstonia solanacearum* primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. European Journal of Plant Pathology, 107 (7), 739-748.

23. Sneath, P. H. A. and V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of Pseudomonas working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481-527.

24. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty-acid profiles. International Journal of Systematic Bacteriology 42; 281-295.

25. Wullings, B. A.; van Beuningen, A. R.; Janse, J. D. and A. D. L. Akkermans, 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23s rRNA-targeted probes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4546-4554.

▼**M1**

ANHANG II

1. In jedem Verdachtsfall, in dem der (die) nach dem Verfahren von Anhang I durchgeführten Screeningtest(s) positiv ausgefallen ist (sind) und der bisher nicht nach den genannten Verfahren bestätigt bzw. entkräftet wurde, sollte folgendes Material aufbewahrt und in geeigneter Form konserviert werden:

   — alle Knollen der Stichprobe und, soweit möglich, alle Pflanzen der Stichprobe,

   — verbleibende Extrakte und weiteres für den (die) Screeningtest(s) vorbereitetes Material, z. B. Objektträger für Immunfluoreszenztests,

   und

   — alle sachdienlichen Unterlagen,

   bis die genannten Verfahren vollständig abgeschlossen sind.

   Mit Hilfe der zurückbehaltenen Knollen können gegebenenfalls Sortenprüfungen vorgenommen werden.

2. Bei Bestätigung des Schadorganismus sollte nach Ablauf des Meldeverfahrens gemäß Artikel 5 Absatz 2 folgendes Material für mindestens einen Monat aufbewahrt und konserviert werden:

   — das in Absatz 1 genannte Material,

   und

   — eine mit Knollen- oder Pflanzenextrakt beimpfte Probe infizierten Auberginenmaterials,

   und

   — die isolierte Schadorganismuskultur.

▼**M1**

ANHANG III

1. Faktoren, die bei der Bestimmung des Ausmaßes der wahrscheinlichen Kontamination gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b zu berücksichtigen sind:

   — Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a an einem Produktionsort angebaut worden sind, der für kontaminiert erklärt wurde;

   — Produktionsorte, die produktionstechnisch mit den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in Zusammenhang stehen, einschließlich Produktionsorte, die Geräte und Anlagen direkt (über Maschinenringe) oder einen gemeinsamen Subunternehmer gemeinsam nutzen;

   — Knollen oder Pflanzen, die an den im zweiten Gedankenstrich genannten Produktionsorten erzeugt wurden oder die zu der Zeit an diesen Produktionsorten vorhanden waren, als sich die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen an den im ersten Gedankenstrich genannten Produktionsorten befanden;

   — Räumlichkeiten, in denen Kartoffeln von den Produktionsorten im Sinne der vorstehenden Gedankenstriche behandelt werden;

   — Maschinen, Fahrzeuge, Schiffe, Lagerräume oder Teile davon und alle anderen Gegenstände einschließlich Verpackungsmaterial, die mit den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen in Berührung gekommen sein könnten;

   — Knollen oder Pflanzen, die vor dem Reinigen und Desinfizieren der vorgenannten Räumlichkeiten oder Gegenstände darin gelagert wurden bzw. damit in Berührung gekommen sind;

   — als Ergebnis der Tests nach Artikel 6 Knollen oder Pflanzen mit geschwisterlicher oder elterlicher klonaler Beziehung zu den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Knollen oder Pflanzen und bei denen, auch wenn sie möglicherweise mit negativem Testergebnis auf den Schadorganismus untersucht worden sind, ein Befall aufgrund einer klonalen Verbindung wahrscheinlich ist; zur Überprüfung der Identität der kontaminierten und klonal verbundenen Knollen bzw. Pflanzen können Sortenprüfungen durchgeführt werden;

   und

   — Produktionsorte, an denen die Knollen oder Pflanzen gemäß dem vorhergehenden Gedankenstrich erzeugt worden sind.

2. Faktoren, die bei der Bestimmung der möglichen Verbreitung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c zu berücksichtigen sind:

   — die Nähe anderer Produktionsorte, an denen Kartoffeln oder andere Wirtspflanzen angebaut werden;

   — die gemeinsame Erzeugung und Verwendung von Pflanzkartoffelherkünften.

3. Die Einzelheiten der Mitteilung gemäß Artikel 5 Absatz 2 Unterabsatz 1 umfassen:

   — unmittelbar nach Bestätigung des Auftretens des Schadorganismus durch Laboruntersuchungen nach den Methoden gemäß Anhang I zumindest folgende Angaben:

      — Sortenbezeichnung der Kartoffelpartie,

      — der Kartoffeltyp (Speise-, Wirtschaftskartoffel, Pflanzkartoffel usw.) und ggf. die Pflanzgutkategorie,

   — im Falle des Risikos der Kontamination von Kartoffelsendungen aus anderen oder in andere Mitgliedstaaten teilt der Mitgliedstaat, in dem das Vorkommen bestätigt worden ist, den betreffenden Mitgliedstaaten unverzüglich die Angaben mit, die erforderlich sind, um den Vorschriften von Artikel 5 Absatz 3 nachzukommen, wie zum Beispiel:

      — der Sortenbezeichnung der Kartoffelpartie,

      — Name und Anschrift von Versender und Empfänger,

      — Lieferdatum der Kartoffelpartie,

      — Größe der gelieferten Kartoffelpartie,

      — eine Kopie des Pflanzenpasses oder zumindest die Pflanzenpassnummer oder gegebenenfalls die Zulassungsnummer des Erzeugers oder Händlers sowie eine Kopie des Lieferscheins.

   Die Kommission wird unverzüglich unterrichtet, sobald diese Angaben vorliegen;

▼**M1**

— nach Abschluss aller Untersuchungen in jedem einzelnen Fall folgende Angaben:

  — das Datum der Kontaminationsbestätigung,

  — eine kurze Beschreibung der zur Identifizierung des Befallsursprungs und einer etwaigen Verbreitung der Kontamination durchgeführten Untersuchungen einschließlich des Probenumfangs,

  — Informationen über die identifizierten bzw. vermuteten Ursache(n) der Kontamination,

  — Einzelheiten über das Ausmaß der erklärten Kontamination, einschließlich der Zahl der betroffenen Produktionsorte und Partien mit Angabe der Sorte und, falls es sich um Pflanzkartoffeln handelt, der Kategorie,

  — Einzelheiten über die Abgrenzung der Sicherheitszone, einschließlich der Zahl derjenigen Produktionsorte, die zwar nicht für kontaminiert erklärt jedoch in die Zone einbezogen wurden,

  — sonstige Informationen zu den bestätigten Ausbrüchen, die die Kommission ggf. anfordert.

▼**M1**

ANHANG IV

1. Als amtlich überwachte Maßnahmen im Sinne von Artikel 7 Absatz 1 gelten:

   — die Verwendung als Tierfutter nach einer Hitzebehandlung, die die Gefahr des Überlebens des Schadorganismus ausschließt,

   oder

   — die Entsorgung in einer amtlich zugelassenen, speziell für diesen Zweck vorgesehenen Abfallentsorgungsanlage, bei der keine erkennbare Gefahr besteht, dass der Schadorganismus zum Beispiel durch Versickerung in Agrarflächen in die Umwelt entweicht,

   oder

   — das Verbrennen

   oder

   — die industrielle Verarbeitung durch direkte, unverzügliche Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit amtlich zugelassenen Abfallentsorgungsanlagen, wobei keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus festgestellt wurde, und mit einem System, das eine Reinigung und Desinfizierung zumindest der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge ermöglicht,

   oder

   — andere Maßnahmen, sofern keine erkennbare Gefahr der Verschleppung des Schadorganismus festgestellt wurde; diese Maßnahmen und ihre Begründung sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen.

   Jeder verbleibende Abfall, der sich aus vorstehenden Maßnahmen ergibt oder damit im Zusammenhang steht, wird anhand amtlich zugelassener Verfahren gemäß Anhang V dieser Richtlinie entsorgt.

2. Die sachgerechte Verwendung bzw. Entsorgung der in Artikel 7 Absatz 1 genannten Knollen oder Pflanzen, die gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b für wahrscheinlich kontaminiert erklärt wurden, erfolgt wie nachstehend beschrieben, unter Kontrolle der zuständigen amtlichen Stellen der betreffenden Mitgliedstaaten, wobei sich diese Stellen gegenseitig unterrichten, um sicherzustellen, dass die Kontrolle konsequent durchgeführt wird und die im ersten und im zweiten Gedankenstrich genannten Abfallentsorgungsanlagen von den zuständigen amtlichen Stellen des Mitgliedstaats, in dem die Kartoffeln verpackt oder verarbeitet werden sollen, zugelassen sind:

   — Verwendung als Speisekartoffeln, die zur unmittelbaren Lieferung und Verwendung so verpackt sind, dass ein Umpacken nicht erforderlich ist, an einem Ort mit geeigneten Abfallentsorgungsanlagen; Kartoffeln, die zum Anpflanzen bestimmt sind, dürfen nur dann am selben Ort gehandhabt werden, wenn sie separat bzw. nach entsprechender Reinigung und Desinfektion der Anlagen behandelt werden;

   oder

   — Verwendung als Wirtschaftskartoffeln, die zur unmittelbaren und sofortigen Lieferung an einen Verarbeitungsbetrieb mit geeigneten Abfallentsorgungsanlagen und mit einem System, das eine Reinigung und Desinfektion zumindest der den Betrieb verlassenden Fahrzeuge ermöglicht, bestimmt sind;

   oder

   — andere Verwendung oder Entsorgung, sofern keine erkennbare Gefahr der Verbreitung des Schadorganismus festgestellt wurde sowie vorbehaltlich der Genehmigung durch die vorgenannten zuständigen amtlichen Stellen.

3. Als angemessene Verfahren zur Reinigung und Desinfektion der in Artikel 7 Absatz 3 genannten Gegenstände gelten Verfahren, bei denen keine erkennbare Gefahr der Verbreitung des Schadorganismus festgestellt wurde und die unter der Überwachung der zuständigen amtlichen Stellen des betreffenden Mitgliedstaats angewandt werden.

4. Die in Artikel 7 Absatz 4 genannten Maßnahmen, die von den Mitgliedstaaten in der gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe c abgegrenzten Sicherheitszone anzuwenden sind, umfassen Folgende:

4.1. An den gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Produktionsorten wird

   a) bei gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a für kontaminiert erklärten Anbauflächen wie folgt verfahren:

▼M1

i) — Zumindest in den drei auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren

— werden Maßnahmen getroffen, um Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen des Schadorganismus auszurotten,

und

— werden keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen, Direktsaat oder andere, natürliche Wirtspflanzen des Schadorganismus oder Pflanzen, bei denen die Gefahr besteht, dass sich der Schadorganismus verbreiten kann, angebaut bzw. gesät;

— werden in der ersten auf den vorgenannten Zeitraum folgenden Kartoffelanbausaison und unter der Bedingung, dass die Anbaufläche im Rahmen amtlicher Kontrollen, die zumindest in den zwei aufeinander folgenden Jahren vor dem Anpflanzen durchgeführt wurden, für frei von Durchwuchs und anderen natürliche Wirtspflanzen des Schadorganismus befunden wurde, ausschließlich Speise- und Wirtschaftskartoffeln angebaut und die geernteten Knollen gemäß Anhang I getestet;

— können in der Kartoffelanbausaison, die auf die im vorstehenden Gedankenstrich genannte Saison folgt und im Rahmen einer geeigneten Fruchtfolge, die mindestens zwei Jahre umfasst, wenn Pflanzkartoffeln erzeugt werden sollen, Kartoffeln entweder zur Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffelerzeugung angebaut werden, und es werden amtliche Erhebungen im Sinne von Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt; oder es wird wie folgt verfahren:

ii) — in den vier auf das Jahr der Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahren

— werden Maßnahmen getroffen, um Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen des Schadorganismus auszurotten,

und

— werden die Anbauflächen brachgelegt oder in Dauergrünland umgewandelt, das regelmäßig kurz gemäht oder als Intensivweide genutzt und in diesem Zustand gehalten wird;

— werden in der ersten auf den vorgenannten Zeitraum folgenden Kartoffelanbausaison und unter der Bedingung, dass die Anbaufläche im Rahmen amtlicher Kontrollen, die zumindest in den zwei aufeinander folgenden Jahren vor dem Anpflanzen durchgeführt wurden, für frei von Durchwuchs und anderen natürlichen Wirtspflanzen des Schadorganismus befunden wurde, Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln erzeugt und die geernteten Knollen gemäß Anhang I getestet;

b) für alle anderen Anbauflächen an dem kontaminierten Produktionsort und unter der Bedingung, dass die zuständigen amtlichen Stellen sich vergewissert haben, dass kein Risiko von Durchwuchs und anderen natürlichen Wirtspflanzen besteht, gilt Folgendes:

— In dem auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr werden entweder keine Kartoffelknollen, Kartoffelpflanzen oder Direktsaat oder andere natürliche Wirtspflanzen angepflanzt bzw. gesät,

oder

— zertifizierte Pflanzkartoffeln werden zur ausschließlichen Erzeugung von Speise- und Wirtschaftskartoffeln angepflanzt;

— im zweiten auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr werden nur zertifizierte Pflanzkartoffeln oder Pflanzkartoffeln, die amtlich auf Freisein von bakterieller Ringfäule der Kartoffel getestet und unter amtlicher Kontrolle an anderen als den unter Nummer 4.1 genannten Produktionsorten angebaut wurden, zur Erzeugung von entweder Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln angebaut;

▼M1

— zumindest im dritten auf die Kontaminationserklärung folgenden Anbaujahr werden nur zertifizierte Pflanzkartoffeln oder Pflanzkartoffeln, die unter amtlicher Kontrolle aus zertifizierten Pflanzkartoffeln erzeugt wurden, zur Erzeugung von entweder Pflanz- oder Speise- und Wirtschaftskartoffeln angebaut;

— in jedem der unter den vorstehenden Gedankenstrichen genannten Anbaujahr werden Maßnahmen getroffen, um Durchwuchs und andere natürliche Wirtspflanzen auszurotten, falls sie vorhanden sind, und werden auf jeder Anbaufläche geerntete Kartoffeln nach dem Verfahren von Anhang I amtlich getestet;

c) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe a und nach dem ersten darauf folgenden Anbaujahr werden alle Maschinen und Lagerräume am Produktionsort, die zur Kartoffelerzeugung genutzt werden, ggf. nach geeigneten Verfahren gemäß Nummer 3 gereinigt und desinfiziert;

d) in geschützten Produktionssystemen, bei denen das gesamte Nährmedium ausgetauscht werden kann,

— dürfen Knollen, Pflanzen oder Direktsaat nur angepflanzt bzw. gesät werden, sofern in der Produktionseinheit amtlich überwachte Maßnahmen durchgeführt wurden, um den Schadorganismus zu eliminieren und das gesamte Wirtspflanzenmaterial zu entfernen, wobei zumindest auch das Kultursubstrat vollständig ausgetauscht wird und die Produktionseinheit und alle Ausrüstungen gereinigt und desinfiziert werden und die zuständigen amtlichen Stellen die Kartoffelerzeugung anschließend wieder genehmigt haben,

und

— müssen die Kartoffeln von zertifizierten Pflanzkartoffeln oder von Miniknollen oder Mikropflanzen, die von untersuchtem Ausgangsmaterial abstammen, erzeugt werden.

4.2. Innerhalb der abgegrenzten Sicherheitszone müssen die Mitgliedstaaten unbeschadet der Maßnahmen gemäß Nummer 4.1

a) unmittelbar nach der Kontaminationserklärung dafür Sorge tragen, dass in den Betrieben die Maschinen und Lagerräume, die für die Kartoffelerzeugung verwendet werden, ggf. nach geeigneten Verfahren gemäß Nummer 3 gereinigt und desinfiziert werden;

b) sofort und mindestens für die Dauer der auf die Kontaminationserklärung folgenden drei Anbaujahre

— vorschreiben, dass die Betriebe, die Kartoffelknollen anbauen, lagern oder umschlagen sowie die Betriebe, die Maschinen für die Kartoffelerzeugung vertraglich zur Verfügung stellen, von ihren zuständigen amtlichen Stellen überwacht werden,

— vorschreiben, dass in dieser Sicherheitszone für alle Kartoffelkulturen ausschließlich zertifiziertes Pflanzgut oder unter amtlicher Überwachung erwachsenes Pflanzgut angepflanzt wird und die Pflanzkartoffeln, die an gemäß Artikel 5 Absatz 1 Buchstabe b als wahrscheinlich kontaminiert eingestuften Produktionsorten, erzeugt wurden, nach der Ernte getestet werden,

— vorschreiben, dass in allen Betrieben der Sicherheitszone der Umgang mit geernteten Pflanzkartoffeln und Speise- sowie Wirtschaftskartoffeln getrennt gehalten wird oder dass zwischen den Arbeitsgängen für Pflanz- sowie Speise- und Wirtschaftskartoffeln Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchgeführt werden,

— eine amtliche Erhebung gemäß Artikel 2 Absatz 1 durchgeführt wird;

c) gegebenenfalls ein Programm aufstellen, um alle Pflanzkartoffelbestände in angemessener Zeit auszutauschen.

▼**M1**

ANHANG V

Die amtlich zugelassenen Abfallentsorgungsverfahren gemäß Anhang IV Nummer 1 müssen nachstehende Bedingungen erfüllen, um jede erkennbare Gefahr einer Verschleppung des Schadorganismus auszuschalten:

i) Kartoffelabfälle (einschließlich verworfener Kartoffeln und Kartoffelschalen) sowie andere feste Abfälle im Zusammenhang mit den Kartoffeln (einschließlich Erde, Steinen und anderem Material) sind wie folgt zu entsorgen:

— entweder durch Entsorgung in einer amtlich zugelassenen, speziell für diesen Zweck vorgesehenen Abfallentsorgungsanlage, bei der keine erkennbare Gefahr besteht, dass der Schadorganismus zum Beispiel durch Versickerung in Agrarflächen in die Umwelt entweicht. Der Abfall muss direkt zur Anlage verbracht werden und dabei so verpackt sein, dass keine Gefahr des Abfallverlustes besteht,

oder

— durch Verbrennen

oder

— durch andere Maßnahmen, sofern nachweislich keine erkennbare Gefahr der Ausbreitung des Schadorganismus besteht; diese Maßnahmen sind der Kommission und den anderen Mitgliedstaaten mitzuteilen;

ii) Abwässer: vor der Entsorgung sind Abwässer, die Schwimmstoffe enthalten, Filtern oder Absetzbecken zuzuleiten, um sie von diesen Schwimmstoffen zu reinigen. Die dabei anfallenden Feststoffe sind gemäß Ziffer i zu entsorgen.

Anschließend sind die Abwässer wie folgt zu behandeln:

— vor der Entsorgung mindestens dreißigminütige Erhitzung auf eine Kerntemperatur von mindestens 60 °C,

oder

— anderweitige amtlich zugelassene und überwachte Entsorgung, sodass keine erkennbare Gefahr besteht, dass die Abwässer mit landwirtschaftlichen Nutzflächen in Berührung kommen könnten. Die diesbezüglichen Einzelheiten sind den anderen Mitgliedstaaten und der Kommission mitzuteilen.

Die in diesem Anhang beschriebenen Möglichkeiten gelten auch für Abfälle im Zusammenhang mit der Bearbeitung, Beseitigung und Verarbeitung kontaminierter Partien.