Detta dokument är endast avsett som dokumentationshjälpmedel och institutionerna ansvarar inte för innehållet

►**B**

RÅDETS DIREKTIV 93/85/EEG

av den 4 oktober 1993

om bekämpning av ljus ringröta på potatis

(EGT L 259, 18.10.1993, s. 1)

Ändrat genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►**M1**	Kommissionens direktiv 2006/56/EG av den 12 juni 2006	L 182	1	4.7.2006

▼B

RÅDETS DIREKTIV 93/85/EEG

av den 4 oktober 1993

om bekämpning av ljus ringröta på potatis

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS RÅD HAR ANTAGIT DETTA DIREKTIV

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen, särskilt artikel 43 i detta,

med beaktande av kommissionens förslag ([1]),

med beaktande av Europaparlamentets yttrande ([2]),

med beaktande av Ekonomiska och sociala kommitténs yttrande ([3]), och

med beaktande av följande:

Potatisproduktionen intar en viktig plats inom gemenskapens jordbruk. Avkastningen hotas ständigt av växtskadegörare.

Genom att skydda potatisodlingarna mot sådana skadegörare skulle inte endast produktionskapaciteten upprätthållas utan jordbruksproduktionen skulle också öka.

Skyddsåtgärder mot införsel av växtskadegörare till en medlemsstats territorium skulle endast ha begränsad effekt om inte sådana skadegörare bekämpades samtidigt och metodiskt i hela gemenskapen och hindrades från att sprida sig.

En av skadegörarna på potatis är Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., den patogen som orsakar ljus ringröta på potatis. Denna sjukdom har förekommit i vissa delar av gemenskapen och det finns ännu några begränsade smittkällor.

Det föreligger en avsevärd risk för potatisodlingar i hela gemenskapen om effektiva åtgärder inte vidtas för att lokalisera denna sjukdom och kartlägga dess utbredning, för att förhindra dess förekomst och spridning och, om den konstateras, för att förhindra dess spridning och för att bekämpa den i syfte att utrota den.

För att säkerställa detta måste vissa åtgärder vidtas inom gemenskapen. Medlemsstaterna måste dessutom om nödvändigt kunna vidta ytterligare eller strängare åtgärder, förutsatt att dessa inte skapar andra hinder för handeln med potatis inom gemenskapen än de som fastställs i rådets direktiv 77/93/EEG av den 21 december 1976 om skyddsåtgärder mot att skadegörare på växter eller växtprodukter förs in till medlemsstaterna ([4]). Sådana åtgärder måste anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen.

I rådets direktiv 80/665/EEG av den 24 juni 1980 om bekämpning av ljus ringröta på potatis ([5]) fastställs minimiåtgärder som medlemsstaterna skall vidta mot ljus ringröta.

Sedan dess har en betydande utveckling skett angående förståelsen av ljus ringröta och upptäckten av den patogen som förorsakar ljus ringröta på potatis.

Tillämpningen av gemenskapens växtskyddsordning på gemenskapen som ett område utan inre gränser har påkallat en ny genomgång och omarbetning av vissa bestämmelser i direktiv 80/665/EEG.

Denna genomgång har visat att bestämmelserna i direktiv 80/665/EEG är otillräckliga och att det är nödvändigt att ytterligare specificera de åtgärder som skall vidtas.

([1]) EGT nr C 93, 2.4.1993, s. 12.
([2]) EGT nr C 176, 28.6.1993, s. 210.
([3]) EGT nr C 161, 14.6.1993, s. 18.
([4]) EGT nr L 26, 31.1.1977, s. 20. Direktiv senast ändrat genom kommissionens direktiv 92/103/EEG (EGT nr L 363,11.12.1992, s. 1).
([5]) EGT nr L 180, 14.7.1980, s. 30.

▼B

Under dessa omständigheter bör direktiv 80/665/EEG upphöra att gälla och nödvändiga åtgärder vidtas.

Åtgärderna måste för det första ta hänsyn till att sjukdomen kan vara latent utan synliga symptom både hos den växande grödan och i lagrade knölar, och kan således förebyggas effektivt endast genom produktion och användning av utsädespotatis som är fri från smitta, och för det andra till att systematiska officiella undersökningar är nödvändiga för att lokalisera den. Spridningen av patogenen mellan knölar under tillväxten är inte den viktigaste faktorn, men patogenen kan övervintra i kvarglämnade knölar och dessa är den huvudsakliga smittkällan då de för över smittan från en odlingssäson till nästa. Patogenen sprids huvudsakligen genom nedsmittning av potatis vid kontakt med angripen potatis och vid kontakt med utrustning för sättning, upptagning och hantering eller med transport- och lagringsbehållare som har nedsmittats av patogenen vid tidigare kontakt med angripen potatis. Sådana nedsmittade föremål kan bära på smitta en tid efter nedsmittningen. Spridningen av patogenen kan minskas eller förhindras genom desinfektion av sådana föremål. Varje nedsmittning av utsädespotatis innebär en stor risk att patogenen sprids.

För att kunna bestämma vilka allmänna åtgärder som skall vidtas liksom för de strängare eller ytterligare åtgärder som medlemsstaterna vidtar för att förhindra införsel av patogenen till sitt territorium, är det önskvärt att medlemsstaterna har ett nära samarbete med kommissionen inom Ständiga kommittén för fytosanitära frågor, nedan kallad ”kommittén”.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel l

Detta direktiv rör de åtgärder som skall vidtas i medlemsstaterna mot den organism som orsakar ljus ringröta på potatis, Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., nedan kallad ”skadegöraren”, för att

a) lokalisera den och kartlägga dess utbredning,

b) förhindra dess förekomst och spridning, och

c) om den konstateras, förhindra dess spridning och bekämpa den i syfte att utrota den.

Artikel 2

1. Medlemsstaterna skall utföra systematiska officiella undersökningar avseende skadegöraren på knölar och i tillämpliga fall på potatisplantor (Solanum tuberosum L.) med ursprung på deras territorium för att bekräfta att skadegöraren inte förekommer där.

Vid dessa undersökningar skall, vad avser knölar, stickprov tas både av utsädespotatis och annan potatis, helst av partier i lager, och de skall underkastas en officiell eller en officiellt övervakad laboratorieundersökning enligt den metod som avses i bilaga l för att upptäcka och diagnosticera skadegöraren. I tillämpliga fall kan dessutom en officiell eller officiellt övervakad visuell inspektion utföras på andra prover genom att knölarna skärs i delar.

Då det gäller plantor, skall dessa undersökningar genomföras enligt lämpliga metoder och på stickproven skall det utföras lämpliga officiella eller officiellt övervakade undersökningar.

Provernas antal, ursprung och stratifiering samt tidpunkt för deras insamlande skall beslutas av de ansvariga officiella organen i enlighet med direktiv 77/93/EEG på grundval av sunda vetenskapliga och statistiska principer och skadegörarens biologi, och med hänsyn till de särskilda system för potatisproduktion som de berörda medlemsstaterna har. Ovannämnda uppgifter skall årligen meddelas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen för att säkerställa att alla medlemsstater med samma säkerhet bekräftar att skadegöraren inte förekommer på deras territorium.

▼B

2. Resultaten av de officiella undersökningar som fastställs i punkt l skall anmälas till de andra medlemsstaterna och till kommissionen minst en gång per år. Innehållet i denna anmälan skall vara konfidentiellt. Den kan överlämnas till kommittén i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

3. Följande bestämmelser får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— Innehållet i de undersökningar som fastställs i punkt l ovan och som skall utföras enligt sunda vetenskapliga och statistiska principer.

— Innehållet i den anmälan som fastställs i punkt 2 ovan.

4. Följande bestämmelse skall fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De metoder som är lämpliga för de undersökningar som fastställs i tredje stycket i punkt l ovan.

Artikel 3

Medlemsstaterna skall säkerställa att den misstänkta förekomsten eller bekräftade närvaron av skadegöraren på potatisplantor och knölar, eller på skördade, lagrade eller saluförda knölar på deras territorium rapporteras till deras egna ansvariga officiella organ.

Artikel 4

1. Då det föreligger misstanke om att skadegöraren förekommer, skall de ansvariga officiella organen i den medlemsstat där förekomsten har rapporterats säkerställa att officiella eller officiellt övervakade laboratorieundersökningar utförs enligt den metod som anges i bilaga l och enligt de villkor som anges i bilaga 2.1 för att bekräfta eller vederlägga den misstänkta förekomsten. I det förstnämnda fallet skall de krav som fastställs bilaga 2.2 tillämpas.

2. I avvaktan på bekräftelse eller vederläggande av misstänkt förekomst såsom avses i punkt l, skall medlemsstaternas ansvariga officiella organ i de fall av misstänkt förekomst där

i) det antingen har konstaterats misstänkta synliga symptom,

eller

ii) ett positivt immunofluorescencetest enligt bilaga l eller ett annat lämpligt test med positivt resultat har gjorts

a) förbjuda flyttning av alla partier eller sändningar från vilka stickproven har tagits, förutom då det sker under deras övervakning och förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas,

b) vidta åtgärder för att spåra den misstänkta förekomstens ursprung,

c) införa ytterligare lämpliga försiktighetsåtgärder på grundval av hur stor risken bedöms vara, för att förhindra all spridning av skadegöraren. Dessa åtgärder får inbegripa officiell övervakning av alla andra knölars eller plantors flyttning inom eller utom det område som berörs av den misstänkta förekomsten.

3. Följande bestämmelse får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De åtgärder som avses i punkt 2. c ovan.

4. Följande bestämmelse skall fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— Det andra lämpliga test som fastställs i punkt 2 ii ovan.

Artikel 5

1. Om en officiell eller officiellt övervakad labo-ratorieundersökning enligt den metod som avses i bilaga l bekräftar närvaron av skadegöraren i ett stickprov av knölar, plantor, eller delar av plantor, skall de ansvariga officiella organen i en medlemsstat med hänsyn till sunda vetenskapliga principer, skadegörarens biologi och de särskilda systemen för produktion, saluföring och bearbetning i den medlemsstaten

▼B

a) förklara följande för nedsmittade: knölarna eller plantorna, sändningen eller partiet, och maskinerna, fordonet, fartyget, lagret, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterialet, från vilka stickprovet togs och, i de fall då det är lämpligt, produktionsplatsen eller -platserna och fältet eller fälten från vilka knölar eller plantor hade skördats,

b) med beaktande av bestämmelserna i bilaga 3.1, bestämma omfattningen av trolig nedsmittning genom kontakt före eller efter skörden eller genom produktionsmässig anknytning till den angivna nedsmittningen,

c) avgränsa ett område på grundval av förklaringen om nedsmittning enligt a, bestämma omfattningen av den troliga nedsmittningen enligt b och skadegörarens möjliga spridning, med beaktande av bestämmelserna i bilaga 3.2.

2. Medlemsstaterna skall, i enlighet med bestämmelserna i bilaga 3.3, omedelbart anmäla till de andra medlemsstaterna och till kommissionen om eventuell nedsmittning enligt punkt l a och om det avgränsade området enligt punkt l c.

Uppgifterna i denna anmälan skall vara konfidentiella. De kan lämnas till kommittén i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

3. Till följd av den anmälan som avses i punkt 2 och de element som nämns där, skall andra medlemsstater som anges i anmälan, om lämpligt avge en förklaring om nedsmittning, bestämma omfattningen av den troliga nedsmittningen och avgränsa ett område i enlighet med punkt l a-c.

Artikel 6

Medlemsstaterna skall föreskriva att om knölar eller plantor har förklarats vara nedsmittade enligt artikel 5.1 a skall potatispartier ur kloner som är närbesläktade med de som berörs av nedsmittningen undersökas enligt artikel 4.1. Undersökningarna skall utföras på så många knölar eller plantor som är nödvändigt för att fastställs den troliga primära smittkällan och omfattningen av den troliga nedsmittningen, helst efter avtagande smittorisk.

Till följd av testerna skall vid behov en förklaring om nedsmittning avges, omfattningen av den troliga nedsmittningen bestämmas och ett område avgränsas på nytt i enlighet med artikel 5.1 a-c.

Artikel 7

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att knölar eller plantor, som har förklarats vara nedsmittade enligt artikel 5.1 a inte får sättas och att de under deras ansvariga officiella organs tillsyn skall

— förstöras,

eller

— på annat sätt undanröjas inom ramen för en eller flera åtgärder under officiell kontroll i enlighet med bilaga 4.1, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas.

2. Medlemsstaterna skall föreskriva att knölar och plantor som har förklarats som troligen smittade enligt artikel 5.1 b, inte får sättas och att de, utan att det påverkar resultatet av de tester som avses i artikel 6 för potatispartier ur närbesläktade kloner, skall på lämpligt sätt användas eller undanröjas under tillsyn av deras ansvariga officiella organ, enligt vad som specificeras i bilaga 4.2, på ett sådant sätt att det är säkerställt att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas.

3. Medlemsstaterna skall föreskriva att alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål inklusive förpackningsmaterial som har förklarats som nedsmittade enligt artikel 5.1 a eller som har förklarats som troligen nedsmittade enligt artikel 5.1 b

▼B

antingen skall förstöras eller rengöras och desinficeras med lämpliga metoder som specificeras i bilaga 4.3. Efter desinfektion skall inga sådana föremål längre anses vara nedsmittade.

4. Utan att det påverkar tillämpningen av de åtgärder som införs i punkt 1-3 skall medlemsstaterna föreskriva att i det område som avgränsas enligt artikel 5.1 c skall ett antal åtgärder vidtas enligt bilaga 4.4.

Artikel 8

1. Medlemsstaterna skall föreskriva att utsädespotatis skall uppfylla kraven i direktiv 77/93/EEG och skall härstamma i direkt led från material som har erhållits genom ett officiellt godkänt program och som har befunnits vara frittfrån skadegöraren vid officiella eller officiellt övervakade tester enligt den metod som avses i bilaga 1.

Ovan nämnda tester skall utföras:

— på plantorna i det ursprungliga klonurvalet, i de fall då nedsmittningen påverkar produktionen av utsädespotatis,

— antingen på plantorna i det ursprungliga klonurvalet eller på representativa stickprov av basutsädespotatis eller av tidigare potatisgenerationer.

2. Följande bestämmelser får fastställas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG:

— De närmare tillämpningsföreskrifterna i punkt l andra stycket första strecksatsen i denna artikel.

— De bestämmelser avseende representativa stickprov som fastställs i punkt l andra stycket andra strecksatsen i denna artikel.

Artikel 9

Medlemsstaterna skall förbjuda innehav och hantering av skadegöraren.

Artikel 10

Utan att det påverkar tillämpningen av bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG får medlemsstaterna tillåta undantag från de åtgärder som avses i artiklarna 6, 7 och 9 i det här direktivet i experimentellt eller vetenskapligt syfte och för växtförädling, förutsatt att sådana undantag inte påverkar bekämpningen av skadegöraren och inte skapar någon risk för spridning av den.

Artikel 11

Medlemsstaterna får besluta om de ytterligare eller strängare åtgärder som kan krävas för att bekämpa skadegöraren eller för att förhindra att den sprids, så till vida som de är förenliga med bestämmelserna i direktiv 77/93/EEG.

De ytterligare åtgärder som avses i första stycket får inbegripa bestämmelser om att endast sådan utsädespotatis får användas som antingen är officiellt certifierad eller som i en officiell kontroll visat sig uppfylla fastställda sund-hetskrav. Det sist nämnda kan komma i fråga i synnerhet då en jordbrukare har tillstånd att i sitt eget jordbruksföretag använda utsädespotatis som de har erhållit från sin egen skörd och i andra fall då egen producerad utsädespotatis används.

De andra medlemsstaterna och kommissionen skall meddelas om åtgärderna.

Artikel 12

Ändringar till bilagorna i detta direktiv till följd av utvecklingen av det vetenskapliga eller tekniska kunnandet skall beslutas i enlighet med förfarandet i artikel 16a i direktiv 77/93/EEG.

▼B

Artikel 13

1. Senast den 15 november 1993 skall medlemsstaterna fastställa och publicera de bestämmelser som är nödvändiga för att följa detta direktiv. De skall omedelbart informera kommissionen om detta.

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

Medlemsstaterna skall tillämpa dessa bestämmelser från och med den 16 november 1993.

2. Medlemsstaterna skall omedelbart meddela kommissionen de bestämmelser i nationell lagstiftning som de antar inom det område som omfattas av detta direktiv. Kommissionen skall meddela de andra medlemsstaterna om detta.

Artikel 14

Direktiv 80/665/EEG skall upphöra att gälla från och med den 16 november 1993.

Artikel 15

Detta direktiv riktar sig till medlemsstaterna.

▼**M1**

BILAGA I

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

TESTPROGRAMMETS OMFATTNING

I programmet beskrivs de olika förfaranden som ingår i

i) diagnos av ljus ringröta på potatisknölar och potatisplantor,

ii) upptäckt av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* i prover av potatisknölar och potatisplantor,

iii) identifiering av *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus (C. m.* ssp. *sepedonicus*).

ALLMÄNNA PRINCIPER

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

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

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

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

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

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

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

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

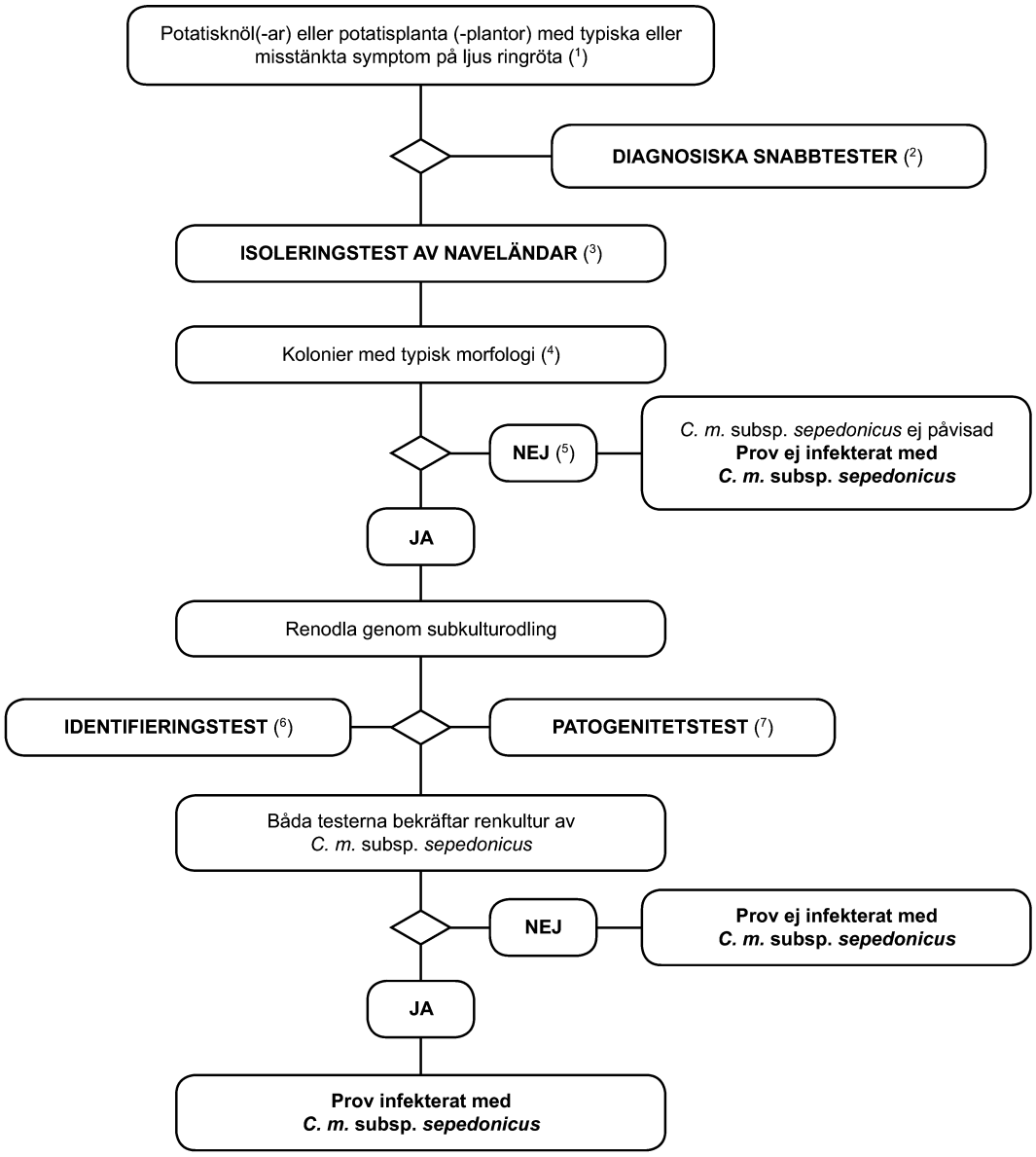
Bekräftad närvaro enligt artikel 5.1 i direktiv 93/85/EEG innebär isolering och identifiering av en renkultur av *C. m.* subsp. *sepedonicus* med bekräftad patogenitet.

1. FRAMSTÄLLNING VIA FLÖDESDIAGRAM

1.1 **Program för diagnos på ljus ringröta på potatisknölar och potatisplantor med symptom på ljus ringröta**

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

▼**M1**



(1) Symptomen beskrivs i avsnitt 2.

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

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

(4) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.

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

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

(7) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

▼**M1**

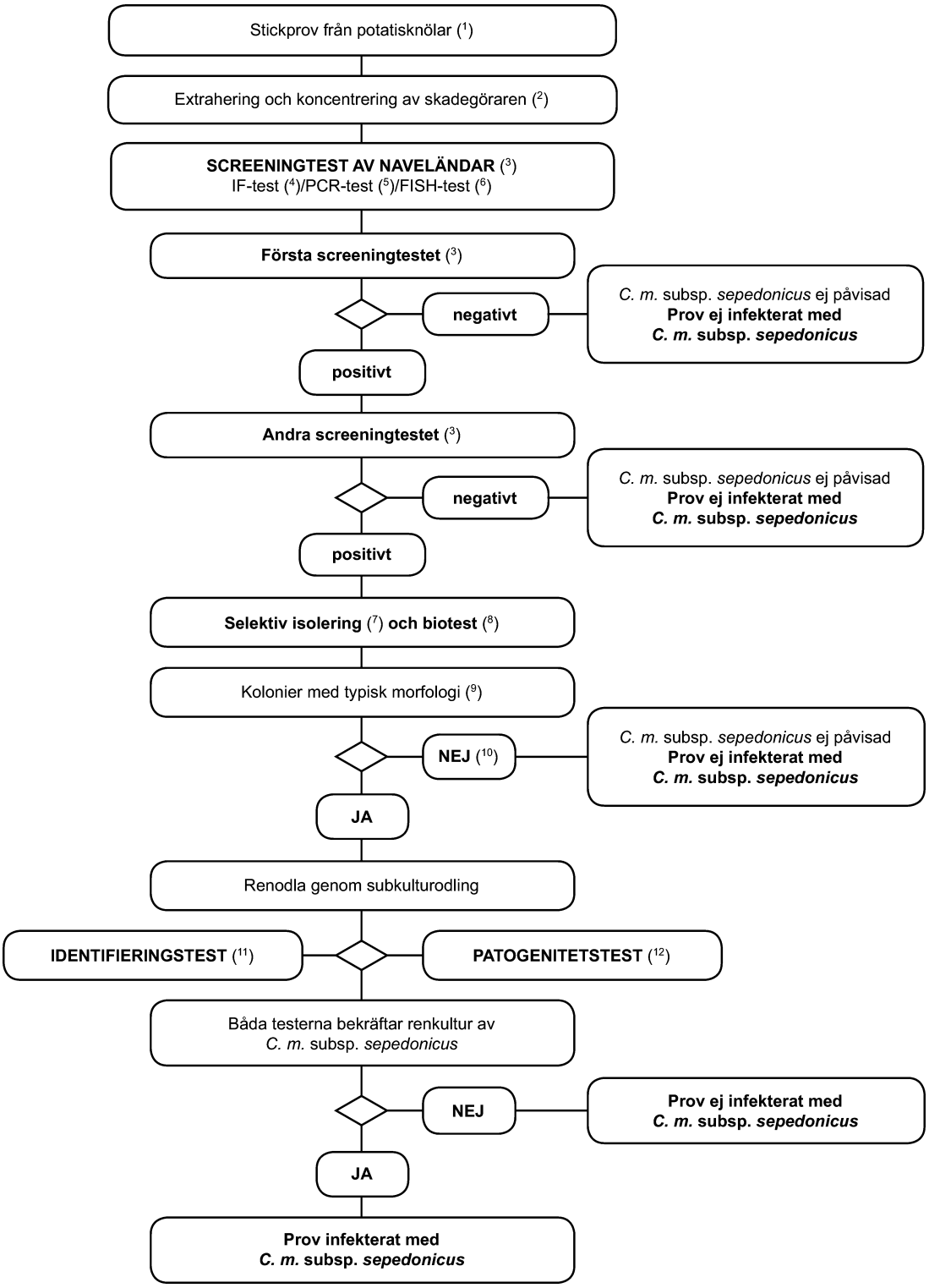
1.2 **Program för upptäckt och identifiering av** *Clavibacter michiganensis* **ssp.** *sepedonicus* **i prover av asymptomatiska potatisknölar**

Princip

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

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

▼M1


Stickprov från potatisknölar (1)
Extrahering och koncentrering av skadegöraren (2)
SCREENINGTEST AV NAVELÄNDAR (3)
IF-test (4)/PCR-test (5)/FISH-test (6)
Första screeningtestet (3)
negativt
C. m. subsp. sepedonicus ej påvisad
Prov ej infekterat med
C. m. subsp. sepedonicus
positivt
Andra screeningtestet (3)
negativt
C. m. subsp. sepedonicus ej påvisad
Prov ej infekterat med
C. m. subsp. sepedonicus
positivt
Selektiv isolering (7) och biotest (8)
Kolonier med typisk morfologi (9)
NEJ (10)
C. m. subsp. sepedonicus ej påvisad
Prov ej infekterat med
C. m. subsp. sepedonicus
JA
Renodla genom subkulturodling
IDENTIFIERINGSTEST (11)
PATOGENITETSTEST (12)
Båda testerna bekräftar renkultur av
C. m. subsp. sepedonicus
NEJ
Prov ej infekterat med
C. m. subsp. sepedonicus
JA
Prov infekterat med
C. m. subsp. sepedonicus

▼**M1**

(1) Standardiserad provmängd är 200 knölar. Färre prover kan emellertid användas till detta förfarande om det inte finns 200 knölar.

(2) Metoder för extrahering och koncentrering av patogen beskrivs i avsnitt 3.1.

(3) Om minst två tester baserade på olika biologiska principer är positiva, krävs isolering och bekräftelse. Utför minst ett screeningtest. Om testet är negativt, betraktas provet som negativt. Om testet är positivt krävs ytterligare ett eller flera screeningtester baserade på olika biologiska principer för att verifiera det första positiva resultatet. Om det andra testet eller övriga tester är negativa, betraktas provet som negativt. Det är inte nödvändigt att utföra ytterligare tester.

(4) Immunofluorescenstest (IF-test).
Använd alltid en polyklonal antikropp vid IF-test. Ytterligare monoklonala antikroppar kan ge högre specificitet (se avsnitt 4).

(5) PCR-test.
Använd korrekt validerade PCR-reagens och PCR-protokoll (se avsnitt 6).

(6) Fish-test.
Använd validerade reagens och protokoll (se avsnitt 5).

(7) Selektiv isolering.
Med substraten MTNA eller NCP-88, och med en utspädning på 1/100 av den återsuspenderade pelleten, är detta i många fall en godtagbar metod för direkt isolering av *C. m.* subsp. *sepedonicus*. Typiska kolonier kan erhållas 3–10 dagar efter odlingen. Patogenet kan sedan renas och identifieras. För fullt utnyttjande av testets potential krävs noggrann preparering av naveländarna för att undvika sekundära bakterier som följer med potatisknölen och som konkurrerar med *C. m.* subsp. *sepedonicus* på substratet och kan växa över patogenet. Om odlingstestet misslyckas skall isolering ske från de plantor som använts för biotestet (se avsnitt 8).

(8) Biotestet används för isolering av *C. m.* subsp. *sepedonicus* från potatisextraktpellets genom selektiv anrikning i äggplantor (*Solanum melongena*). Testet kräver optimala inkubationsförhållanden enligt metodens specifikation. Bakterier som hämmar *C. m.* subsp. *sepedonicus* på MTNA- eller NCP-88-substratet kommer sannolikt inte att interferera i detta test (se avsnitt 7).

(9) Typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.

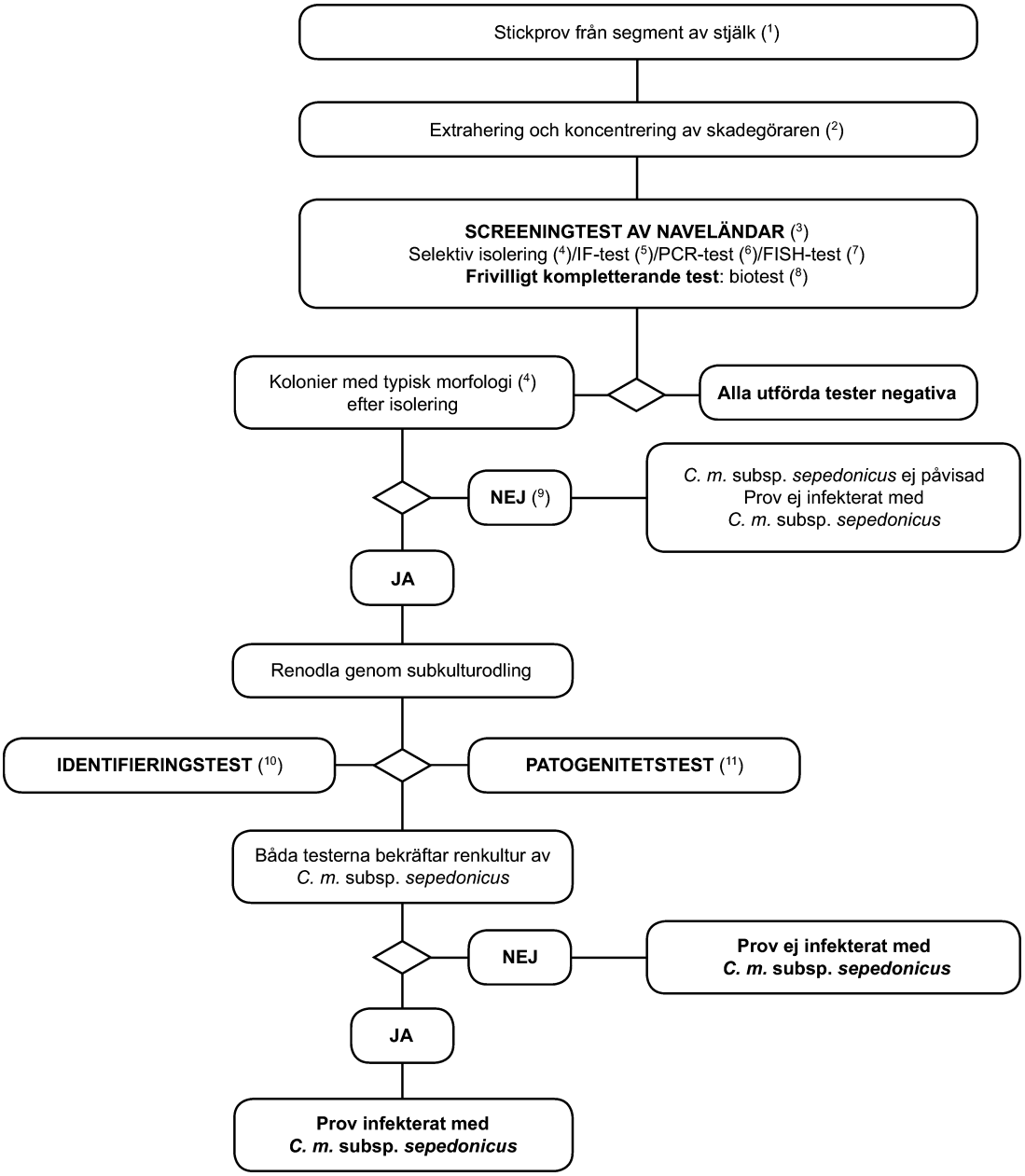
(10) Odling i kultur eller biotester kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om positiva resultat erhålls vid screeningtester men isoleringstesterna är negativa, upprepa isoleringstesterna från samma pellet eller genom att ta ytterligare kärlringvävnad nära naveländan från genomskurna knölar från samma prov. Gör vid behov tester på ytterligare prover.

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

(12) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

▼M1

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



▼**M1**

(1) Rekommenderade provstorlekar, se avsnitt 3.2.

(2) Metoder för extrahering och koncentrering av patogen beskrivs i avsnitt 3.2.

(3) Om minst två tester baserade på olika biologiska principer är positiva, krävs isolering och bekräftelse.
Utför minst ett screeningtest. Om testet är negativt betraktas provet som negativt. Om testet är positivt krävs ytterliga ett eller flera tester baserade på olika biologiska principer för att styrka det första positiva resultatet. Om det andra testet eller övriga tester är negativa, betraktas provet som negativt. Det är inte nödvändigt att utföra ytterligare tester.

(4) Selektivt isoleringstest och typisk kolonimorfologi beskrivs i avsnitt 8.

(5) IF test beskrivs i avsnitt 4.

(6) PCR test beskrivs i avsnitt 6.

(7) FISH test beskrivs i avsnitt 5.

(8) Biotest beskrivs i avsnitt 7.

(9) Odling i kultur eller biotester kan misslyckas på grund av konkurrens eller inhibering från saprofytiska bakterier. Om ett positivt resultat erhålls vid screeningtester men isoleringstesterna är negativa, upprepa isoleringstesterna och testa, vid behov, ytterligare prover.

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

(11) Patogenitetstestet beskrivs i avsnitt 10.

▼M1

2. OKULÄR UNDERSÖKNING AVSEENDE SYMPTOM PÅ LJUS RINGRÖTA

2.1 **Potatisplantor**

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

2.2 **Potatisknölar**

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

3. PREPARERING AV PROVER

3.1 **Potatisknölar**

Anmärkning:

— Den standardiserade provmängden är 200 knölar per test. Vid intensivare provtagning krävs fler tester på prover av denna storlek. Ett större antal knölar i provet medför inhibering eller svårighet att tolka resultaten. Förfarandet kan emellertid användas för prover med färre än 200 knölar, om det endast finns färre knölar tillgängliga.

— Valideringen av samtliga nedan behandlade metoder för upptäckt har skett på grundval av test av stickprover på 200 knölar.

— Det nedan beskrivna potatisextraktet kan även användas för upptäckt av den bakterie som orsakar mörk ringröta hos potatis, *Ralstonia solanacearum.*

Frivillig förbehandling före provpreparering:

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

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

▼M1

Anmärkning:

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

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

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

3.1.3 Behandla naveländarna enligt något av följande förfaranden: antingen

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

   eller

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

Anmärkning:

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

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

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

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

Upprepade nedfrysningar och upptiningar är inte tillrådliga.

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

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

3.2 **Potatisplantor**

Anmärkning:

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

▼M1

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

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

Samla stjälksegmenten i en tillsluten steril behållare enligt följande provtagningsförfaranden:

3.2.2 Behandla stjälksegmenten enligt något av följande förfaranden: antingen

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

eller

b) behandla omedelbart segmenten genom att krossa dem i en kraftig förseglad engångspåse för finfördelning (t.ex. Stomacherpåse eller Bioreba) i en tillräcklig mängd extraktionsbuffert (tillägg 3) med en gummihammare eller lämplig malapparat (t.ex. Homex). Om detta inte är möjligt, förvara stjälksegmenten under högst 72 timmar nedkylda eller under högst 24 timmar i rumstemperatur.

3.2.3 Dekantera supernatanten efter det att blandningen fått stå och sjunka under 15 minuter.

3.2.4 Ytterligare klarnande av extraheringen eller koncentrationen av bakteriedelen krävs vanligtvis inte men kan åstadkommas genom filtrering och/eller centrifugering enligt avsnitten 3.1.4–3.1.6.

3.2.5 Dela det outspädda eller koncentrerade provextraktet i två lika stora delar. Bibehåll ena hälften vid en temperatur av 4–10 °C under testet och lagra den andra hälften med 10–25-procentig (v/v) steril glycerol vid en temperatur av –16 till –24 °C (veckor) eller –68 till –86 °C (månader) för det fall att ytterligare tester krävs.

4. IF-TEST

Princip

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

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

Anmärkning:

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

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

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

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

▼M1

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

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

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

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

4.1 Preparera testobjektglasen enligt något av följande förfaranden:

i) För pelletar med relativt litet stärkelsesediment:

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

ii) För andra pelletar:

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

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

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

4.3 IF-förfarande

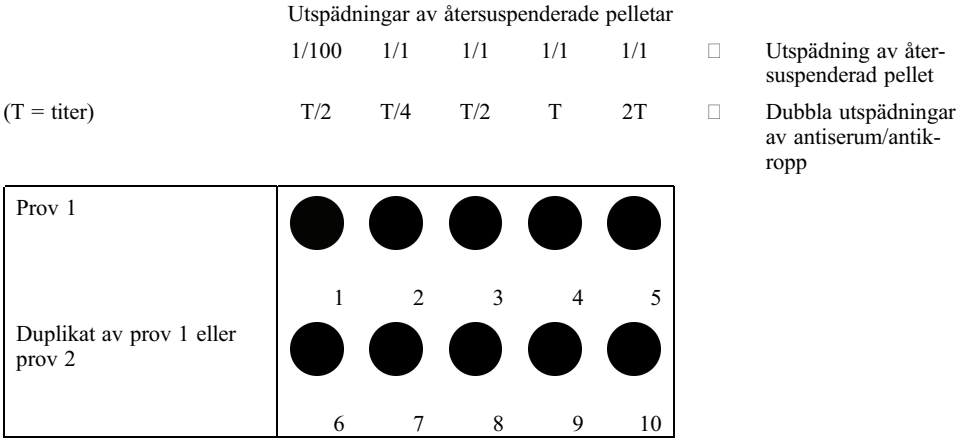
i) Enligt testglaspreparering i 4.1 i:

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

ii) Enligt testglaspreparering i 4.1 ii:

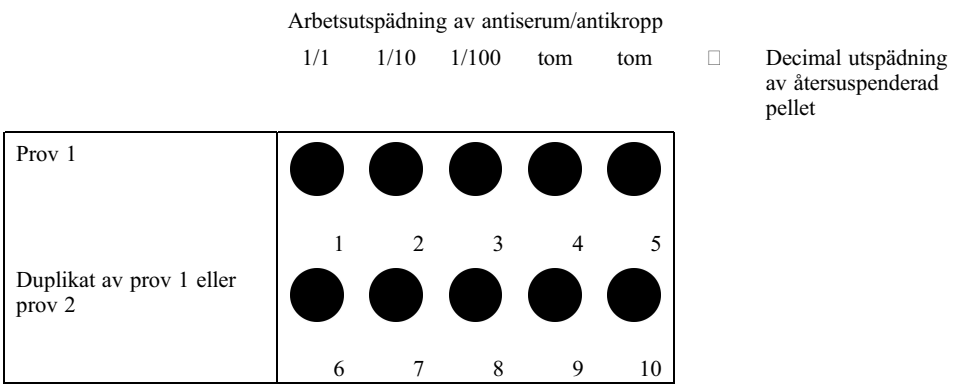
Preparera arbetsutspädningen av antikropp i IF-buffert. Arbetsutspädningen påverkar specificiteten.

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



▼M1

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



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

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

4.3.2 Inkubera objektglasen på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).

4.3.3 Skaka av dropparna från glaset och skölj glasen noga med IF-buffert. Tvätta genom att under 5 minuter sänka ned i IF-buffert – Tween (tillägg 3) och därefter under 5 minuter i IF-buffert. Undvik uppkomst av aerosoler eller överföring av droppar som kan orsaka korskontaminering. Avlägsna noga överskottsfukt genom att försiktigt torka med läskpapper.

4.3.4 Ordna glasen på fuktigt mjukpapper. Täck testfönstren med den utspädning av FITC-konjugat som används för att bestämma titern. Den volym konjugat som tillsätts fönstren skall vara lika med volymen tillsatt antikropp.

4.3.5 Inkubera glasen på fuktigt papper övertäckta under 30 minuter vid omgivande temperatur (18–25 °C).

4.3.6 Skaka av konjugatdropparna från glaset. Skölj och tvätta som ovan (4.3.3).

Avlägsna noga överskottsfukt.

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

4.4 Avläsning av IF-testet:

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

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

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

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

▼M1

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

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

4.4.5 Tolkning av IF-testet:

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

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

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

5. FISH-TEST

Princip

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

Anmärkning:

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

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

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

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

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

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

5.1 **Fixering av potatisextrakt**

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

5.1.1 Preparera fixeringslösningen (se tillägg 7).

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

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

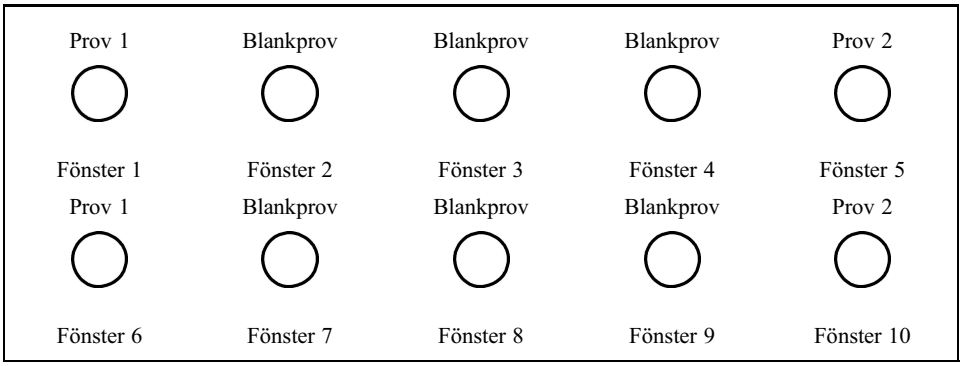
En alternativ fixeringsvätska är 96-procentig etanol. Vid användning av denna, lös pelleten från steg 5.1.2 i 50 µl 0,01 M fosfatbuffert och 50 µl 96-procentig etanol. Skaka och inkubera vid 4 °C under 30–60 minuter.

5.1.4 Centrifugera under 8 minuter på 7 000 g, avlägsna supernatanten och återsuspendera pelleten i 75 µl 0,01 M fosfatbuffert (se tillägg 3).

▼M1

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

Figur 3. FISH-glasets layout



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

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

5.2 **Förhybridisering och hybridisering**

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

Alternativt kan man i stället för lysozym tillsätta 50 µl av 40–400µg ml^{-1} proteas K i en buffert (20 mM Tris-HCl, 2mM $CaCl_2$, pH 7,4) till varje brunn och inkubera vid 37 °C under 30 minuter.

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

5.2.3 Preparera en fuktkammare för inkubation genom att täcka botten av en lufttät behållare med mjuk- eller filterpapper doppat i 1x hybmix (tillägg 7). Preinkubera behållaren i hybridiseringsugn vid 55 °C under minst 10 minuter.

5.2.4 Preparera hybridiseringslösningen (tillägg 7) med 45 µl per glas, och preinkubera under 5 minuter vid 55 °C.

5.2.5 Placera glasen på en värmeplatta vid 45 °C och tillsätt 10 µl hybridiseringslösning till var och en av de 4 brunnarna på glaset (glasen).

5.2.6 Anbringa 2 täckglas (24 × 24 mm) på varje glas utan att låta någon luft komma emellan. Placera glasen i den redan uppvärmda fuktkammaren och hybridisera över natten i ugn vid 55 °C i mörker.

5.2.7 Preparera 3 bägare innehållande 1 l ultrarent vatten, 1 l 1x hybmix (334 ml 3x hybmix och 666 ml ultrarent vatten) och 1 l av 1/2x hybmix (167 ml 3x hybmix och 833 ml ultrarent vatten). Preinkubera var och en i vattenbad vid 55 °C.

5.2.8 Avlägsna täckglasen från glasen och placera glasen i en hållare för objektglas.

5.2.9 Tvätta bort probe-överskott genom inkubation under 15 minuter i bägaren med 1x hybmix vid 55 °C.

5.2.10 För över hållaren för objektglas till 1/2 hybmix tvättlösning och inkubera under ytterligare 15 minuter

▼M1

5.2.11 Doppa glasen hastigt i ultrarent vatten och placera dem på filterpapper. Avlägsna överskottsfukt genom att försiktigt täcka ytan med filterpapper. Pipettera 5–10 µl av inbäddningslösning som motverkar blekning (t.ex. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA eller liknande) på varje fönster och lägg ett stort täckglas (24 × 60 mm) över hela glaset.

5.3 **Tolkning av FISH-testet**

5.3.1 Observera glasen omedelbart i ett mikroskop utrustat för epifluorescensmikroskopi vid 630 eller 1000x förstoring under oljeimmersion. Med ett filter lämpligt för fluoresceinisothiocyanat (FITC) färgas eubakteriecellerna (inklusive de flesta gramnegativa cellerna) i provet fluorescerande gröna. Med ett filter för tetrametylrodamin-5-isotiocyanat framträder Cy3-infärgade celler av *C. m.* subsp. *sepedonicus* som fluroscerande röda. Jämför cellmorfologin med de positiva kontrollernas cellmorfologi. Cellerna skall vara klart fluorescerande och helt färgade. FISH-testet (avsnitt 9.4) skall återupprepas om färgningen är avvikande. Scanna fönstren utefter två diametrar i rät vinkel och runt perimetern. På de prover som inte uppvisar några celler eller endast ett litet antal celler, observera minst 40 mikroskopfält.

5.3.2 Sök efter klart fluorescerande celler med karakteristisk morfologi av *C. m.* subsp. *sepedonicus* i fönstren på glasen med prover (se kommissionens webbplats med adress http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main). Intensiteten hos fluorescensen skall vara likvärdig med eller större än fluorescensen hos den positiva kontrollstammen. Celler med ojämn eller ofullständig färgning eller med svag fluorescens beaktas inte.

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

5.3.4 FISH-testets specificitet medför flera problem. Bestånd av fluorescerande celler med atypisk morfologi och korsreagerande saprofytiska bakterier som har en liknande storlek och morfologi som *C. m.* subsp. *sepedonicus* kan förekomma hos potatisar, dels i naveländarna, dels i pelletar av stjälksegmentet, även om de är mycket mer lågfrekventa än i IF-test.

5.3.5 Endast fluorescerande celler med typisk storlek och morfologi tas i beaktande (se 5.3.2).

5.3.6 Tolkning av resultaten från FISH-test:

i) Giltiga resultat från FISH-test erhålls om klart fluorescerande gröna celler med storlek och morfologi som är typiskt för *C. m.* subsp. *sepedonicus* observeras när ett FITC-filter används respektive klart fluorescerande röda celler när ett rodamin-filter används i alla positiva kontroller och inte i någon av de negativa kontrollerna. För varje prov med ljusa fluorescerande celler med karakteristisk morfologi, bestäm medeltalet typiska celler per mikroskopfält och beräkna antal typiska celler per ml återsuspenderad pellet (tillägg 4). Prover som innehåller minst 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet betraktas som potentiellt smittade. Ytterligare provtagning krävs. Prover som innehåller färre än 5×10^3 typiska celler per ml återsuspenderad pellet betraktas som negativa.

ii) FISH-testet är negativt om klart fluorescerande röda celler med storlek och morfologi som är typiskt för *C. m.* subsp. *sepedonicus* inte observeras när rodamin-filtret används, förutsatt att typiska klart fluorescerande röda celler observeras i de positiva kontrollpreparaten när rodamin-filtret används.

6. PCR-TEST

Principer

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

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

▼**M1**

Anmärkning:

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

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

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

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

Följande negativa kontroller bör ingå i PCR-testet:

— Provextrakt som tidigare givit negativt svar när det testats med avseende på *C. m.* subsp. *Sepedonicus*.

— Buffertkontroller som används för extrahering av bakterien och DNA från provet.

— PCR-reaktionsblandningen.

Följande positiva kontroller bör tas med:

— Delprover av återsuspenderad pellet till vilka *C. m.* subsp. *sepedonicus* har tillsatts (information om preparering finns i tillägg 2).

— En suspension av 10^6 celler per ml av *C. m.* subsp. *sepedonicus* i vatten från ett virulent isolat (t.ex. NCPPB 2140 eller NCPPB 4053).

— Om möjligt använd dessutom DNA från positiva kontrollprover i samband med att PCR-test.

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

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

6.1 **Metoder för rening av DNA**

Använd positiva och negativa kontrollprover såsom beskrivs ovan.

Preparera kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

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

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

6.1 a) Metod enligt Pastrik (2000)

1. Pipettera 220 µl av lyseringsbuffert (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) i ett 1,5 ml Eppendorf-rör.
2. Tillsätt 100 µl provextrakt och placera i värmeblock eller vattenbad vid 95 °C under 10 minuter.
3. Ställ röret på kylning under 5 minuter.
4. Tillsätt 80 µl Lysozym utgångslösning (50 mg lysozym per ml i 10 mM Tris HCl, pH 8,0) och inkubera vid 37 °C under 30 minuter.
5. Tillsätt 220 µl Easy DNA® lösning A (Invitrogen), blanda väl genom skakning och inkubera vid 65 °C under 30 minuter.
6. Tillsätt 100 µl Easy DNA® lösning B (Invitrogen), skaka kraftigt tills fällningen svävar fritt i röret och provet är jämnt trögflytande.
7. Tillsätt 500 µl kloroform och skaka tills viskositeten ökar och blandningen är homogen.
8. Centrifugera vid 15 000 g under 20 minuter vid 4 °C för att separera faserna och bilda interfasen.
9. För över den övre fasen till ett rent Eppendorf-rör.

▼M1

10. Tillsätt 1 ml 100-procentig etanol (–20 °C), skaka snabbt och inkubera under nedkylning under 10 minuter.
11. Centrifugera vid 15 000 g under 20 minuter vid 4 °C och avlägsna etanolen från pelleten.
12. Tillsätt 500 µl 80-procentig etanol (–20 °C) och blanda genom att vända upp och ned på röret.
13. Centrifugera vid 15 000 g under 10 minuter vid 4 °C, spara pelleten och avlägsna etanolen.
14. Låt pelleten lufttorka eller torka i en DNA speed vac.
15. Återsuspendera pelleten i 100 µl sterilt ultrarent vatten och låt stå i rumstemperatur under minst 20 minuter.
16. Lagra vid –20 °C fram till användning för PCR.
17. Blanda ned alla eventuella vita fällningar genom centrifugering och använd 5 µl av supernatanten innehållande DNA till PCR.

6.1 b) Andra metoder

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

6.2 **PCR**

6.2.1 Preparera test- och kontrolltemplat för PCR enligt det validerade protokollet (tillägg 6). Preparera en decimal utspädning av DNA-provextrakt (1:10 i ultrarent vatten).

6.2.2 Preparera lämplig PCR-reaktionsblandning i en omgivning fri från smitta enligt det offentliggjorda protokollet (tillägg 6). Det validerade PCR-protokollet är en multiplexreaktion som även omfattar en intern PCR-kontroll.

6.2.3 Tillsätt 5 µl DNA-extrakt per 25 µl PCR-reaktion i sterila PCR-rör.

6.2.4 Blanda i ett negativt kontrollprov innehållande PCR-reaktionsblandning och tillsätt ultrarent vatten av samma ursprung som det som användes i PCR-blandningen i stället för provet.

6.2.5 Placera rören i samma termocykelapparat som användes vid föregående testning och kör lämpligt optimerat PCR-program (tillägg 6).

6.3 **Analys av PCR-produkten**

6.3.1 Lös PCR-produkten med agarosgelelektrofores. Använd minst 12 µl av amplifierad DNA-reaktionsblandning från varje prov blandat med 3 µl laddningsbuffert (tillägg 6) i 2,0 % (w/v) agarosgel i tris-acetat-EDTA (TAE)-buffert (tillägg 6) vid 5–8 V per cm. Använd en lämplig DNA-markör, t.ex. 100 bp storleksmarkör.

6.3.2 Påvisa DNA-band genom att färga i etidiumbromid (0,5 mg per l) under 30-45 minuter, varvid lämpliga försiktighetsåtgärder bör vidtas vid hanteringen av mutagenen etidiumbromid.

6.3.3 Observera det färgade gelet i kortvågs-UV-genomlysning (t.ex. λ = 302 nm) och sök efter amplifierade DNA-produkter av förväntad storlek (tillägg 6) och dokumentera.

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

Tolkning av PCR-resultaten:

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

PCR-testet är positivt om det *C. m.* subsp. *sepedonicus*-specifika PCR-produkten av den förväntade storleken och det förväntade restriktionsmönstret (vid behov) upptäcks, förutsatt att det inte amplifierats

▼M1

från någon av de negativa kontrollproven. Tillförlitlig bekräftelse av ett positivt resultat kan även erhållas genom att testet upprepas med en andra uppsättning PCR-primrar (avsnitt 9.3).

Anmärkning:

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

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

7. BIOTEST

Anmärkning:

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

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

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

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

Detaljerad information om odling finns i tillägg 8.

7.1 Fördela hela det återstående testdelprovet av den återsuspenderade pelleten från avsnitt 3.1.6 eller 3.2.5 mellan äggplantorna genom att tillämpa en av nedan angivna metoder (7.3 eller 7.4). Använd endast plantor på bladstadium 2–3 upp till full utveckling av trebladsstadiet. För att säkerställa fullständig användning av den återsuspenderade pelleten och effektiv inokulation kommer de nedan beskrivna förfarandena att kräva 15–25 äggplantor per prov.

7.2 Undvik att vattna äggplantorna 1–2 dagar före inokulationen för att minska saftspänningen.

7.3 Inokulation genom skåra

7.3.1 Håll plantan mellan två fingrar, droppa med hjälp av en pipett en droppe (ca 5–10 µl) av det uppslammade koncentrerade extraktet på stjälken mellan hjärtbladen och det första bladet.

7.3.2 Med en steril skalpell görs en diagonal skåra ungefär 1,0 cm lång och ungefär lika djup som två tredjedelar av stjälkens diameter med början vid droppen med det koncentrerade extraktet.

7.3.3 Förslut skåran med sterilt vaselin från en spruta.

7.4 Inokulation med en spruta

7.4.1 Inokulera äggplantornas stjälkar precis ovanför hjärtbladen med en spruta som är försedd med injektionsnål (minst 23G). Fördela provet mellan äggplantorna.

7.5 Som positiva kontroller, inokulera 5 plantor med en vattensuspension av 10^5 till 10^6 celler per ml av känd kultur av *C. m.* subsp. *sepedonicus* och, vid behov, med naturligt angripen knölvävnad (se avsnitt 4) genom samma inokuleringsmetod (7.3 eller 7.4).

7.6 Som negativa kontroller, inympa 5 plantor med steril pelletbuffert genom samma inokuleringsmetod (7.3 eller 7.4).

7.7 Inkubera plantorna i karantänsanläggningar upp till 4 veckor vid 18–24 °C. Inkubera plantorna med tillräckligt ljus och fuktighet (70–80 %) och vatten för att förhindra vattenmättnad eller vissnande på grund av vattenbrist. *C. m. sepedonicus* celler dör vid temperaturer över 30 °C, och den optimala temperaturen är 21 °C. För att undvika nedsmittning, inkubera positiva och negativa kontrollplantor på strikt separata bänkar i ett växthus eller odlingsrum eller, vid platsbrist, se till att hanteringen sker strikt separat. Om plantor från olika prover skall inkuberas tätt tillsammans, separera dem med lämpliga skärmar. Vid

▼M1

gödning, bevattning, inspektion och annan behandling, var noga med att undvika korskontaminering. Det är mycket viktigt att hålla växthus och odlingsrum fria från alla skadeinsekter eftersom de kan överföra bakterien från prov till prov.

7.8 Efter en vecka undersöks plantorna på vanligt sätt efter symptom. Räkna antalet plantor som uppvisar symptom. *C. m.* subsp. *sepedonicus* orsakar vissnade blad hos äggplantor, vilket kan börja som slapphet längs kanterna eller mellan nerverna. Vissnad vävnad kan till en början se mörkgrön eller fläckig ut, men bleknar innan den blir nekrotisk. Vissnade områden mellan bladnerverna ser ofta feta och vattenfyllda ut. Nekrotisk vävnad har ofta en klart gul kant. Plantorna dör nödvändigtvis inte; ju längre tid som går innan symptomen visar sig, desto större är chansen för överlevnad. Plantorna kan kväva infektionen. Unga äggplantor är mycket mottagligare för små populationer av *C. m.* subsp. *sepedonicus* än äldre plantor. Därför är det nödvändigt att använda plantor på eller lite före bladstadium 3.

Vissnandet kan också orsakas av andra bakterie- eller svamppopulationer som finns i det koncentrerade extraktet av knölarnas vävnad. Dessa kan utgöras av *Ralstonia solanacearum, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* och *E. carotovora* subsp. *atroseptica, Erwinia chrysanthemi, Phoma exigua* var. *foveata* och stora bestånd av saprofytiska bakterier. Särskilt *Erwinia chrysanthemi* kan orsaka bladsymptom och vissnande som är mycket lika symptomen på *C. m. sepedonicus*. Den enda skillnaden är svartnandet av stjälkarna vid infektion med *Erwinia chrysanthemi*. Andra typer av vissnande kan skiljas från det vissnande som orsakas av *C. m.* subsp. *sepedonicus* eftersom hela blad eller hela plantor vissnar snabbt. Även gramfärgning kan göras: detta test skiljer *C. m.* subsp. *sepedonicus* från *Erwinia* spp.

7.9 Så snart symptom observeras på äggplantorna bör en reisolation göras, varvid segment av vissnad bladvävnad eller stjälkvävnad används (information om finfördelning av vävnad finns i 3.1.3). Desinficera ytan på äggplantornas blad och stjälkar genom att torka av dem med 70-procentig etanol. Gör ett IF-test eller PCR-test på äggplantans växtsaft och isolera på lämpliga (selektiva) substrat (se avsnitt 8). Även gramfärgning (tillägg 9) kan prepareras. Identifiera renkulturer av presumtiv *C. m.* subsp. *sepedonicus* och bekräfta skadegöraren (se avsnitten 9 och 10).

7.10 Under vissa omständigheter, i synnerhet då tillväxtförhållandena inte är optimala, är det möjligt för *C. m.* subsp. *sepedonicus* att existera som en latent infektion i äggplantorna, till och med efter inkubationsperioder på upp till 4 veckor. Om inga symptom observeras efter 4 veckor: utför IF/PCR på ett blandprov av 1 cm stjälksegment från varje testplanta taget ovanför inokuleringsstället. Om testet är positivt bör en omisolering på lämpliga (selektiva) substrat göras enligt förfarandet i avsnitt 8. Identifiera renkulturer av presumtiv *C. m.* subsp. *sepedonicus* och bekräfta patogenitet (avsnitten 9 och 10).

Tolkning av resultatet av biotestet

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

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

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

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

Anmärkning:

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

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

▼M1

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

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

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

Testa kontrollmaterialen exakt som provet (proven).

8.1 **Odling på selektivt substrat**

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

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

Anmärkning:

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

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

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

8.2 **Rening av misstänkta kolonier**

Anmärkning:

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

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

Näringsagar med dextros (endast för renkultur).

Agar med jäst, pepton och glukos.

Agar med jästextrakt och mineralsalter.

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

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

8.2.2 Stryk på nytt för att uppnå renhet.

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

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

▼M1

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

9. IDENTIFIERING

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

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

9.1 **Nutrient- och enzymatiska identifikationstester**

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

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

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

Försök	*Förväntat resultat*
Oxidations-/fermenteringstest (O/F-test)	Inert eller svagt oxidativa
Oxidasaktivitet	–
Tillväxt vid 37 °C	–
Ureasaktivitet	–
Hydrolys av aesculin	+
Hydrolys av stärkelse	– eller svag
Tolerans hos 7-procentig NaCl	–
Produktion av indol	-
Katalasaktivitet	+
Produktion av H_2S	–
Utnyttjande av citrat	–
Smältning av gelatin	–
Syra från glycerol	-
Syra från laktos	– eller svag
Syra från ramnos	–
Syra från salicin	–
Gramfärgning (tillägg 9)	+

9.2 **IF-test**

a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i IF-buffert (tillägg 3).

b) Preparera en serie dubbla utspädningar av ett lämpligt antiserum.

c) Tillämpa IF-förfarandet (avsnitt 4).

d) Ett positivt IF-test erhålls om kulturen har samma IF-titer som den positiva kontrollen.

9.3 **PCR-test**

a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.

b) Upphetta 100 µl av cellsuspensionen i tillslutna rör i värmeblock eller kokande vattenbad i 100 °C under 4 minuter. Vid behov, tillsats av nyligen preparerad NaOH till en slutkoncentration av 0,05 M kan bidra till lysering av cellen. Proverna kan därefter lagras i –16 till –24 °C fram till användning.

c) Tillämpa lämpliga PCR-förfaranden för att amplifiera *C. m.* subsp. *sepedonicus*-specifika PCR-produkter (t.ex. Pastrik, 2000; se tillägg 4; Li och de Boer, 1995; Mills *et al.*, 1997; Pastrik och Rainey, 1999; Schaad *et al.*, 1999).

▼M1

d) En positiv identifiering av *C. m.* subsp. *sepedonicus* erhålls om PCR-produkterna har samma storlek och samma RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) som den positiva kontrollstammen.

9.4 **FISH-test**

a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.

b) Tillämpa FISH-förfarandet (avsnitt 5).

c) Ett positivt FISH-test föreligger om samma reaktioner erhålls från kulturen och den positiva kontrollen.

9.5 **Fettsyraprofilering (FAP)**

a) Odla kulturen på trypticase-soja-agar (Oxoid) under 72 timmar i 21 °C (+/– 1°).

b) Tillämpa ett lämpligt FAP-förfarande (Janse, 1991; Stead, 1992).

c) Ett positivt FAP-test erhålls om den presumtiva kulturen har samma profil som den positiva kontrollen. Förekomsten av karakteristiska fettsyror är 15:1 Anteiso A, 15:0 Iso, 15:0 Anteiso, 16:0 Iso samt 16:0 och 17:0 Anteiso, vilket i hög grad tyder på *C. m. sepedonicus*. Andra sorter, såsom *Curtobacterium, Arthrobacter* and *Micrococcus*, innehåller också vissa av dessa syror, men 15:1 Anteiso A är en ovanligt syra i dessa bakterier. Den uppträder emellertid i alla *Clavibacter* spp. med en andel på 1–5 %. I *C. m. sepedonicus* är andelen vanligtvis omkring 5 %.

9.6 **BOX-PCR**

a) Preparera en suspension av ungefär 10^6 celler per ml i ultrarent vatten.

b) Utför testet enligt förfarandet (Smith *et al.*, 2001).

10. VERIFIERINGSTEST

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

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

10.2 Inokulera 5–10 äggplantsstjälkar av unga småplantor i bladstadium 3 (avsnitt 7.3 eller 7.4).

10.3 Inkubera i 18–24 °C med tillräckligt ljus och hög relativ luftfuktighet med lämplig bevattning för att undvika vattenmättnad eller stress till följd av torka (avsnitt 7.7). Med renkulturer bör typiskt vissnande uppnås inom 2 veckor, men plantor som inte visar symptom (se avsnitt 7.8) efter denna tid bör inkuberas i upp till 3 veckor vid temperaturer som främjar äggplantornas tillväxt men som inte överstiger 25 ° C (tillägg 8). Om inga symptom föreligger efter 3 veckor, kan det inte fastslås att kulturen är en patogen form av *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

10.4 Isolera från plantor med symptom genom att avlägsna ett segment från stjälken på 2 cm ovanför inokuleringspunkten. Finfördela och suspendera i en liten volym sterilt destillerat vatten eller 50 mM fosfatbuffert (tillägg 3). Isolera från suspensionen genom utspädning. Rackla eller stryk därefter på MTNA och YPGA (tillägg 5), inkubera under 3–5 dagar i 21–23 °C och observera bildandet av kolonier typiska för *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

▼**M1**

Tillägg 1

Laboratorier som utför optimering och validering av protokoll

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

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

▼**M1**

Tillägg 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

Tillägg 3

Buffertar för testförfarandena

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

1. **Buffertar för extraktionsförfarande**

1.1 *Extraktionsbuffert (50 mM fosfatbuffert, pH 7,0)*

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

Na_2HPO_4 (vattenfri)	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
Destillerat vatten	1,00 l

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

Ytterligare komponenter kan vara av nytta enligt följande:

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

(*) Används med homogeniseringsextraktionsmetoden.

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

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

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
Destillerat vatten	1,00 l

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

2. **Buffertar för IF-test**

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

Denna buffert används för utspädning av antikroppar.

$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

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

2.2 *IF-buffert – Tween*

Denna buffert används för att tvätta objektglas.

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

2.3 *Fosfatbuffrad glycerol, pH 7,6*

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

$Na_2HPO_4.12H_2O$	3,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destillerat vatten	100 ml

▼**M1**

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

▼M1

Tillägg 4

Bestämning av kontamineringsnivå i IF- och FISH-tester

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

   $C = c \times S/s$

   där S = multispotglasets fönsteryta, och

   s = objektivfältets yta

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

   K = tubkoefficient (1 eller 1,25)

   G = objektivets förstoring (100×, 40× osv.).

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

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

   där y = volym av återsuspenderad pellet på varje fönster, och

   F = den återsuspenderade pelletens utspädningsfaktor.

▼**M1**

Tillägg 5

Substrat för isolering och odling av *C. m.* **subsp.** *sepedonicus*

a) *Allmänna odlingssubstrat*

Näringsagar (NA)

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

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

Näringsagar med dextros (NDA)

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

Agar med jäst, pepton och glukos (YPGA)

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

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

Agar med jästextrakt och mineralsalter (YGM)

Bacto jästextrakt (Difco)	2,0 g
D(+)-glukos (monohydrat)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Bacto agar (Difco)	18 g
Destillerat vatten	1,0 l

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

b) *Validerade selektiva odlingssubstrat*

MTNA-substrat

Om inte annat anges kommer substratens beståndsdelar från BDH

Jästextrakt (Difco)	2,0 g
Mannitol	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NaCl	0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4.H_2O$	0,015 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,005 g
Agar (Oxoid nr 1)	16,0 g
Destillerat vatten	1,0 l

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

▼**M1**

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

Anmärkning:

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

NCP-88-substrat

Näringsagar (Difco)	23 g
Jästextrakt (Difco)	2 g
D-mannitol	5 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,25 g
Destillerat vatten	1,0 l

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

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

Anmärkning:

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

▼M1

Tillägg 6

Validerade PCR-protokoll och PCR-reagens

Anmärkning:

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

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

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

1.1 *Oligonukleotidprimrar*

Forward primer PSA-1 5′- ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa -3′

Reverse primer PSA -R 5′- tac tga gat gtt tca ctt ccc c -3′

Forward primer NS-7-F 5′- gag gca ata aca ggt ctg tga tgc -3′

Reverse Primer NS-8-R 5′- tcc gca ggt tca cct acg ga -3′

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

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

1.2 *PCR-reaktionsblandningen*

Reagens	Kvantitet per reaktion	Slutlig koncentration
Sterilt ultrarent vatten	15,725 µl	
10× PCR-buffert (1) (15 mM $MgCl_2$)	2,5 µl	1× (1,5 mM $MgCl_2$)
BSA (fraktion V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
d-nTP-blandning (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Primer PSA-1 (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer PSA-R (10µM)	0,5 µl	0,2 µM
Primer NS-7-F (10µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Primer NS-8-R (10µM) (2)	0,1 µl	0,04 µM
Taq polymerase (5U/µl) (1)	0,2 µl	1,0 U
Provvolym	5,0 µl	
Total volym	25,0 µl	

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

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

1.3 *PCR-reaktionsbetingelser*

Kör följande program:

1 cykel:	i)	3 minuter vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
10 cykler:	ii)	1 minut vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
	iii)	1 minut vid 64 °C (påkoppling av primers)
	iv)	1 minut vid 72 °C (förlängning av kopia)
25 cykler:	v)	30 sekunder vid 95 °C (denaturering av DNA-templat)
	vi)	30 sekunder vid 62 °C (påkoppling av primers)
	vii)	1 minut vid 72 °C (förlängning av kopia)
1 cykel:	viii)	5 minuter vid 72 °C (slutlig förlängning)

▼M1

ix) håll temperaturen vid 4 °C.

Anmärkning:

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

1.4 *Restriktionsenzymanalys av produkten*

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

2. **Preparering av laddningsbuffert**

2.1 *Bromtymolblått (10-procentig utgångslösning)*

Bromtymolblått	5 g
Destillerat vatten (dubbeldestillerat)	50 ml

2.2 *Laddningsbuffert*

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

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

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

Späd till 1x före användning.

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

▼M1

Tillägg 7

Validerade reagens för FISH-test

1. **Oligo-prober**

Cms-specifik probe CMS-CY3-01: 5'- ttg cgg ggc gca cat ctc tgc acg - 3'

Icke-specifik eubacterial prob EUB-338-FITC: 5'- gct gcc tcc cgt agg agt-3'

2. **Fixeringslösning**

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

i) Upphetta 9 ml vatten av molekylärbiologisk kvalitet (t.ex. ultrarent vatten) till ca 60 °C och tillsätt 0,4 g paraformaldehyd. Paraformaldehyden löses efter tillsats av 5 droppar 1N NaOH och omrörning med magnetomrörare.

ii) Justera pH till 7,0 genom tillsats av 1 ml 0,1 M fosfatbuffert (pH 7,0) och 5 droppar 1N HCl. Kontrollera pH med indikatorpapper och justera vid behov med HCl eller NaOH.

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

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

iv) *Anmärkning:*

Alternativ fixeringslösning: 96-procentig etanol.

3. **3x Hybmix**

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

Späd till 1x i enlighet med kraven.

4. **Hybridiseringslösning**

1× Hybmix

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

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

Tabell: Föreslagna kvantiteter för preparering av hybridiseringslösning.

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

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

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

Na_2HPO_4	8,52 g
KH_2PO_4	5,44 g

▼**M1**

Destillerat vatten	1,00 l

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

▼**M1**

Tillägg 8

Odling av äggplantor

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

Äggplantor bör odlas i växthus under följande miljöförhållanden:

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

Mottagliga äggplantssorter:

- ”Black Beauty”
- ”Long Tom”
- ”Rima”
- ”Balsas”

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

▼M1

Tillägg 9

Förfarande vid gramfärgning (Huckers modifikation) (Doetsch, 1981) ([1])

Lösning med kristallviolett

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

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

Blanda de två lösningarna.

Lugols jod

Jod	1 g
Kalciumjodid	2 g
Destillerat vatten	300 ml

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

Färgande lösning med saffranin

Utgångslösning:

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

Blanda och lagra.

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

Förfarande vid färgning

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

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

REFERENSER

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

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

▼**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 *Clavibactermichiganensis* 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 *Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83; 1095–1100.

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

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

22. Smith, N. C.; Hennesy, J; Stead, D.E., 2001. 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**

BILAGA II

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

   — Alla de knölar, och om möjligt plantor, från vilka prover har tagits.

   — Allt kvarvarande extrakt och ytterligare förberett material för screeningtest (er), t.ex. immunofluorescensglas.

   — All relevant dokumentering.

   Genom bevaring av knölarna kan vid behov sorttester göras.

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

   — Det material som specificeras i punkt 1.

   — Ett prov av det infekterade äggplantematerialet inokulerat med knöl- eller plantextrakt.

   — Den isolerade kulturen av skadegöraren.

▼**M1**

BILAGA III

1. Följande skall beaktas vid bestämningen av hur omfattande den troliga smitta som avses i artikel 5.1 b är:

   — Knölar och plantor som har odlats på en produktionsplats som förklaras smittad enligt artikel 5.1 a.

   — Den eller de produktionsplatser med någon anknytning till produktionen av de knölar eller plantor som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a, inklusive anknytning via produktionsutrustning eller produktionsanordningar som delas direkt eller genom en gemensam entreprenör.

   — Knölar eller plantor som har producerats på en sådan plats (sådana platser) som avses i föregående strecksats, eller som har förvarats på en sådan plats (sådana platser) under den tid då de knölar eller plantor som har förklarats smittade i enlighet med artikel 5.1 a befann sig på den produktionsplats som avses i första strecksatsen.

   — Anläggningar som hanterar potatis från produktionsplatserna i ovannämnda strecksatser.

   — Alla maskiner, fordon, fartyg, lager, eller delar av dessa, och alla andra föremål, inklusive förpackningsmaterial, som kan ha kommit i kontakt med de knölar eller plantor som har förklarats angripna i enlighet med artikel 5.1 a.

   — Alla knölar eller plantor som har lagrats i, eller kommit i kontakt med, någon av de platser eller något av föremål som anges i föregående strecksats innan dessa platser eller föremål hade rengjorts och desinficerats.

   — Till följd av den undersökning som avses i artikel 6, de knölar eller plantor som har ett syster- eller moderförhållande genom kloning till de knölar eller plantor som har förklarats angripna i enlighet med artikel 5.1 a och som, trots att de kan ha givit negativt svar när de testats för skadegöraren, sannolikt är angripna via ett kloningssamband. Sorttester kan göras för att styrka identiteten hos de knölar eller plantor som är smittade och som kommer ur kloner som är närbesläktade.

   — Den eller de produktionsplatser för de knölar eller plantor som avses i föregående strecksats.

2. Följande skall beaktas vid bestämningen av den möjliga spridning som avses i artikel 5.1 c:

   — Närheten till andra produktionsplatser där det odlas potatis eller andra värdväxter.

   — Den gemensamma produktionen och användningen av partierna av utsädespotatis.

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

   — Den skall avges omedelbart efter det att förekomst av skadegöraren har bekräftats av laboratorietester, vilka utförts med tillämpning av de metoder som anges i bilaga I, och omfatta minst

      — potatispartiets sortnamn,

      — potatispartiets typ (matpotatis, utsädespotatis m.m.) och i förekommande fall utsädeskategori.

   — Om det föreligger risk för smitta i potatis från eller i en annan medlemsstat (andra medlemsstater) skall den medlemsstat i vilken förekomst har bekräftats genast ge den berörda medlemsstaten eller de berörda medlemsstaterna de upplysningar som krävs för att iaktta artikel 5.3, såsom

      — potatispartiets sortnamn,

      — exportörens respektive mottagarens namn och adress,

      — potatispartiets leveransdatum,

      — storleken på det potatisparti som levereras,

      — om så är lämpligt kopia av växtpasset eller åtminstone växtpassnumret, och om så är lämpligt odlarens eller handlarens registreringsnummer och en kopia av leveransbeskedet.

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

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

      — det datum då smittan bekräftades,

      — en kort beskrivning av den undersökning som gjorts för att identifiera källa och möjlig spridning av smittan, samt på vilken nivå provtagningen har skett,

▼**M1**

— information om smittans identifierade eller misstänkt källa (misstänkta källor),

— detaljerade uppgifter om den angivna smittans omfattning, inklusive antalet produktionsställen och antalet partier med uppgifter om sort och, i fall av utsädespotatis, kategori,

— detaljerade uppgifter om det område som har avgränsats, inklusive det antal produktionsplatser som inte har förklarats smittade men inkluderats i området.

— annan information som bekräftar förekomsten (förekomsterna) av smitta och som kommissionen kan kräva.

▼**M1**

BILAGA IV

1. De officiellt övervakade åtgärder som avses i artikel 7.1 skall vara någon av följande:

   — Användning som djurfoder efter värmebehandling så att det inte finns någon risk för att skadegöraren har överlevt.

   — Bortskaffande på en officiellt godkänd specialiserad upplagsplats för avfall där det inte finns någon identifierbar risk för att patogenen sprids till omgivningen, t.ex. genom läckage till jordbruksmark.

   — Förbränning.

   — Användning för industriell bearbetning genom direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning med officiellt godkända anordningar för avfallshantering för vilken det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas, och med ett system för rengöring och desinfektion av åtminstone avgående fordon.

   — Andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. Dessa åtgärder skall anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.

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

2. För att under tillsyn av de berörda medlemsstaternas ansvariga officiella organ använda eller bortförskaffa de knölar eller plantor som har förklarats som troligen smittade enligt artikel 5.1 b och som avses i artikel 7.2, med lämplig kommunikation mellan ansvariga officiella organ för att alltid säkerställa sådan tillsyn och godkännande av ansvariga officiella organ i den medlemsstat där potatisen skall förpackas eller bearbetas med hänsyn till de anordningar för avfallshantering som avses i första och andra strecksatsen, är något av följande sätt lämpliga:

   — Användning som matpotatis avsedd för konsumtion och packad på platser med lämpliga anordningar för avfallshantering, klar för direkt leverans och användning utan ompaketering. Potatisar avsedda för sättning får behandlas på samma plats endast om detta sker separat eller efter rengöring och desinfektion.

   — Användning som industripotatis, och avsedd för direkt och omedelbar leverans till en bearbetningsanläggning som har lämpliga anordningar för avfallshantering och ett system för rengöring och desinfektion av åtminstone avgående fordon.

   — Annan användning eller annat bortförskaffande, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren sprids och under förutsättning att nämnda ansvariga officiella organ lämnat sitt tillstånd.

3. Lämpliga metoder för att rengöra och desinficera de föremål som avses i artikel 7.3 skall vara de för vilka det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. De skall användas under övervakning av medlemsstaternas ansvariga officiella organ.

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

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

   a) På ett fält som har förklarats smittat i enlighet med artikel 5.1 a, gäller antingen att

      i) — under åtminstone de tre odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat

         — skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren,

         och

         — får inga knölar, plantor eller frön av potatis, eller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, eller grödor som medför en identifierad risk för att skadegöraren kommer att överleva eller spridas, sättas, planteras eller sås,

▼M1

— under den första växtsäsongen efter den period som specificeras i föregående strecksats, och på villkor att fältet har befunnits vara fritt från plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering skall endast odling av annan potatis än utsädespotatis tillåtas, och de skördade knölarna skall testas enligt det förfarande som anges i bilaga I,

— under den växtsäsong som följer på den som avses i föregående strecksats och efter en lämplig växtföljdscykel, som skall omfatta minst två år om det gäller odling av utsädespotatis, får det sättas potatis avsedd för produktion av utsädespotatis eller annan potatis, och en officiell undersökning skall göras i enlighet med artikel 2.1, eller

ii) — under de fyra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat

— skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren,

och

— skall fältet antingen läggas i och bibehållas som hel träda eller som permanent betesmark som slås ofta eller som betas intensivt,

— under den första växtsäsongen efter den period som specificeras i föregående strecksats, och på villkor att fältet har befunnits vara fritt från plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren vid officiella inspektioner under minst två på varandra följande odlingsår före plantering, skall odling av utsädespotatis eller annan potatis tillåtas, och de skördade knölarna skall testas enligt det förfarande som anges i bilaga I.

b) På alla andra fält tillhörande den smittade produktionsplatsen, och på villkor att de ansvariga officiella organen har förvissat sig om att risken för plantor från övervintrande potatis och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren har undanröjts gäller att

— under det odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat skall antingen inga knölar, plantor eller frön av potatis, och inte heller andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren, sättas, planteras eller sås, eller

— skall endast certifierad utsädespotatis som är avsedd för produktion av annan potatis än utsädespotatis odlas,

— under det andra odlingsår som följer på det år då fältet förklarades för smittat, får endast certifierat utsäde eller utsädespotatis som genomgått officiella tester avseende ljus ringröta och som odlats under officiell kontroll på andra produktionsställen än de som anges i 4.1 planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,

— under åtminstone det tredje odlingsår som följer på det år då fältet förklarades angripet får endast certifierad utsädespotatis eller utsädespotatis som odlats under officiell kontroll och kommer från certifierad utsädespotatis planteras för produktion av utsädespotatis eller annan potatis,

— under vart och ett av de odlingsår som avses i de föregående strecksatserna skall åtgärder vidtas för att utrota plantor från övervintrande knölar och andra naturligt förekommande värdväxter för skadegöraren om en sådana konstaterats, och i varje potatisfält skall officiella tester av den skördade potatisen från varje potatisfält göras i enlighet med förfarandena i bilaga I.

c) Omedelbart efter det att produktionsplatsen har förklarats för smittad enligt artikel 5.1 a och efter det första därpå följande odlingsåret skall alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts vid potatisproduktionen rengöras och desinfekteras på lämpligt sätt med lämpliga metoder enligt punkt 3.

d) I en enhet med skyddad växtproduktion där det är möjligt att fullständigt byta ut odlingssubstratet

— får knölar, plantor eller frön sättas, planteras eller sås endast om produktionsenheten har underkastats officiellt övervakade åtgärder för att utrota skadegöraren och avlägsna allt material från värdväxter, inklusive åtminstone ett totalt byte av odlings-

▼M1

substrat och rengöring och desinfektion av produktionsenheten och all utrustning, och därefter av de ansvariga officiella organen har godkänts för potatisproduktion,

och

— skall potatisproduktionen komma från certifierad utsädespotatis eller från miniknölar eller mikroplantor som härstammar från undersökta källor.

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

a) omedelbart efter det att fältet förklarades smittat se till att alla maskiner och lageranläggningar på produktionsplatsen som har använts vid potatisproduktionen rengörs och desinfekteras på lämpligt sätt och med lämpliga metoder enligt punkt 3,

b) omedelbart, och åtminstone under tre vegetationsperioder efter det att området har förklarats smittat

— säkerställa övervakning genom sina ansvariga officiella organ av platser där potatisknölar odlas, lagras eller hanteras, och av företag som bedriver entreprenadverksamhet inom potatissektorn,

— kräva att endast certifierat utsäde eller utsäde som odlats under officiell kontroll för alla potatisgrödor inom det området planteras, samt att utsädespotatis som har odlats på produktionsplatser som har fastställts som troligen angripna enligt artikel 5.1 b, testas efter skörden,

— kräva att skördade partier av utsädespotatis från alla produktionsplatser inom det avgränsade området hanteras skilt från potatis avsedd för annat ändamål, eller att det införs ett system för rengöring och desinfektion mellan hanteringen av partier av utsädespotatis och partier av potatis avsedd för annat ändamål,

— genomföra en officiell undersökning i enlighet med artikel 2.1,

c) upprätta ett program för att vid behov byta ut alla partier av utsädespotatis under en lämplig period.

▼**M1**

BILAGA V

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

i) Potatisavfall (även kasserad potatis och skal) och allt annat fast avfall som kommit i kontakt med potatisen (även jord, stenar och annat skräp) skall bortskaffas på något av följande sätt:

— Bortskaffande på officiellt godkänd för ändamålet avsedd upplagsplats för avfall där det inte finns någon identifierbar risk för att patogenen sprids till omgivningen, t.ex. genom läckage till jordbruksmark. Avfallet skall föras direkt till platsen under så säkra omständigheter att det inte finns någon risk för att någon del av avfallet förloras.

— Förbränning.

— Andra åtgärder, förutsatt att det har säkerställts att det inte finns någon identifierbar risk för att skadegöraren skall spridas. Dessa åtgärder skall anmälas till kommissionen och till de andra medlemsstaterna.

ii) Flytande avfall: Innan det bortskaffas skall flytande avfall som innehåller uppslammade fasta ämnen genomgå filtrering eller sedimentering så att dessa fasta ämnen tas bort. Dessa ämnen skall bortförskaffas på det sätt som föreskrivs i punkt i.

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

— Upphettning av hela volymen till minst 60 °C under minst 30 minuter. Därefter bortskaffande.

— Bortskaffande på annat sätt, förutsatt att det sker efter officiellt godkännande och under officiell kontroll så att det inte finns någon identifierbar risk för att avfallet kan komma i kontakt med jordbruksmark. Uppgifterna om detta skall meddelas de andra medlemsstaterna och kommissionen.

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