II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

RÅDET

RÅDETS DIREKTIV 93/85/EØF

af 4. oktober 1993

om bekæmpelse af kartoflens ringbakteriose

RÅDET FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab, særlig artikel 43,

under henvisning til forslag fra Kommissionen (1),

under henvisning til udtalelse fra Europa-Parlamentet (2),

under henvisning til udtalelse fra Det Økonomiske og Sociale Udvalg (3), og

ud fra følgende betragtninger:

Kartoffelproduktionen har stor betydning for Fællesskabets landbrug; udbyttet trues bestandig af skadegørere;

beskyttelse af kartoffelafgrøderne mod disse skadegørere skal ikke blot medvirke til at opretholde produktionskapaciteten, men tillige være et middel til at forøge landbrugets produktivitet;

beskyttelsesforanstaltninger mod indslæbning af skadegørere på en medlemsstats område får kun begrænset virkning, hvis ikke skadegørerne samtidig bekæmpes metodisk i hele Fællesskabet, og spredning af dem forhindres;

en af kartoflens skadegørere er Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., som er det patogen, der forårsager kartoflens ringbakteriose; denne sygdom er forekommet nogle steder i Fællesskabet, og der findes stadig nogle begrænsede smittekilder;

der vil være betydelig fare for kartoffelafgrøderne i hele Fællesskabet, hvis ikke der træffes effektive foranstaltninger til at lokalisere denne sygdom og bestemme dens udbredelse, til at forhindre dens forekomst og spredning og, hvis den konstateres, til at forhindre dens spredning og til at bekæmpe den, således at den kan udryddes;

for at dette kan opnås, må der træffes en række foranstaltninger i Fællesskabet; medlemsstaterne må desuden om nødvendigt kunnen træffe supplerende eller strengere foranstaltninger under forudsætning af, at dette ikke skaber andre hindringer for handelen med kartofler inden for Fællesskabet end dem, der er fastsat i Rådets direktiv 77/93/EØF af 21. december 1976 om foranstaltninger mod indslæbning i medlemsstaterne af skadegørere på planter eller planteprodukter (4); disse foranstaltninger skal meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen;

ved Rådets direktiv 80/665/EØF af 24. juni 1980 om bekæmpelse af kartoflens ringbakteriose (5) er der fastsat minimumsforanstaltninger, som skal gennemføres af medlemsstaterne mod denne sygdom;

(1) EFT nr. C 93 af 2. 4. 1993, s. 12.
(2) EFT nr. C 176 af 28. 6. 1993, s. 210.
(3) EFT nr. C 161 af 14. 6. 1993, s. 18.
(4) EFT nr. L 26 af 31. 1. 1977, s. 20. Direktivet er senest ændret ved Kommissionens direktiv 92/103/EØF (EFT nr. L 363 af 11. 12. 1992, s. 1).
(5) EFT nr. L 180 af 14. 7. 1980, s. 30.

siden da er der sket en betydelig udvikling hvad angår forståelsen af kartoflens ringbakteriose og påvisningen af det patogen, der forårsager kartoflens ringbakteriose;

anvendelsen af Fællesskabets plantesundhedsordning i et fællesskab uden indre grænser har gjort en fornyet gennemgang og revision af nogle af bestemmelserne i direktiv 80/665/EØF nødvendig;

en sådan gennemgang har vist, at bestemmelserne i direktiv 80/665/EØF er utilstrækkelige, og der må fastsættes mere detaljerede foranstaltninger;

under disse omstændigheder bør direktiv 80/665/EØF ophæves og de nødvendige foranstaltninger vedtages;

i foranstaltningerne må der for det første tages hensyn til, at sygdommen kan være latent uden synlige symptomer både hos kartofler i vækst og hos kartofler under lagring, og at den således kun kan bekæmpes effektivt ved produktion og anvendelse af sygdomsfrie læggekartofler, og for det andet til, at det er nødvendigt at foretage systematiske officielle undersøgelser for at lokalisere sygdommen; spredningen af patogenet mellem kartofler under væksten er ikke den vigtigste faktor, men patogenet kan overvintre i jorden i spildkartofler (gengroninger), og spildkartofler udgør den væsentligste smittekilde, da de overfører sygdommen fra én vækstsæson til den næste; patogenet spredes hovedsagelig ved, at sunde kartofler smittes ved kontakt med angrebne kartofler og ved kontakt med lægge-, optagnings- og behandlingsmaskiner og -redskaber eller opbevaringsenheder, der anvendes under transport og oplagring, og som er blevet inficeret ved tidligere kontakt med angrebne kartofler; sådanne inficerede genstande kan overføre smitte i nogen tid efter infektionen; patogenets spredning kan mindskes eller forhindres ved desinfektion af disse genstande; disse former for infektion af læggekartofler kan i høj grad medvirke til, at patogenet spredes;

fastlæggelsen af de nærmere enkeltheder i sådanne generelle foranstaltninger og i de strengere eller supplerende foranstaltninger, der træffes af medlemsstaterne for at forhindre indslæbning af patogenet på deres område, bør foregå i snævert samarbejde mellem medlemsstaterne og Kommissionen i Den Stående Komité for Plantesundhed (i det følgende benævnt komitéen) —

UDSTEDT FØLGENDE DIREKTIV:

Artikel 1

Dette direktiv omhandler de foranstaltninger, der skal træffes i medlemsstaterne mod Clavibacter michiganensis (Smith) Davis et al. ssp. sepedonicus (Spieckermann et Kotthoff) Davis et al., som forårsager kartoflens ringbakteriose (i det følgende benævnt »skadegøreren«), for at:

a) lokalisere den og bestemme dens udbredelse

b) forhindre, at den forekommer og spredes, og

c) hvis den konstateres: forhindre, at den breder sig, og bekæmpe den, således at den udryddes.

Artikel 2

1. Medlemsstaterne gennemfører systematiske officielle undersøgelser for skadegøreren på kartoffelknolde og, om nødvendigt, på kartoffelplanter (Solanum tuberosum L.) med oprindelse på deres område for at bekræfte, at skadegøreren ikke findes.

Til brug ved disse undersøgelser udtages der, når det drejer sig om kartoffelknolde, prøver af både læggekartofler og andre kartofler, om muligt fra lagerpartier, og de underkastes officiel laboratorietest eller laboratorietest under officielt tilsyn efter den metode, som er fastsat i bilag I til påvisning og diagnosticering af skadegøreren. Derudover kan der, hvor det er hensigtsmæssigt, foretages officiel visuel inspektion eller visuel inspektion under officielt tilsyn af gennemskårne knolde på andre prøver.

Når det drejer sig om planter, foretages disse undersøgelser efter relevante metoder, og prøverne underkastes en officiel test eller en test under officielt tilsyn.

De officielle ansvarlige organer som omhandlet i direktiv 77/93/EØF træffer afgørelse om antallet af prøver, oprindelse, stratificering og udtagningstidspunkt efter gode videnskabelige og statistiske principper, ud fra skadegørerens biologi og under hensyn til de særlige kartoffelproduktionssystemer i de pågældende medlemsstater. De nærmere enkeltheder herom meddeles årligt de øvrige medlemsstater og Kommissionen for at sikre, at bekræftelsen af, at skadegøreren ikke findes, gives med samme sikkerhed i alle medlemsstater.

2. Resultaterne af de officielle undersøgelser, der er omhandlet i stk. 1, meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen mindst én gang om året. Oplysningerne i denne meddelelse er fortrolige. De kan forelægges komitéen efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF.

3. Følgende bestemmelser kan vedtages efter fremgangsmåden i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— indholdet af de i stk. 1 i nærværende artikel omhandlede undersøgelser, der skal foretages efter gode videnskabelige og statistiske principper

— indholdet af den meddelelse, der er omhandlet i stk. 2 i nærværende artikel.

4. Følgende bestemmelse skal vedtages efter fremgangsmåden i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— de metoder, der er relevante for de undersøgelser og test, der er omhandlet i stk. 1, tredje afsnit, i nærværende artikel.

Artikel 3

Medlemsstaterne drager omsorg for, at en formodet eller bekræftet forekomst på deres område af skadegøreren hos kartoffelplanter og -knolde eller høstede, oplagrede eller omsatte knolde indberettes til deres egne officielle ansvarlige organer.

Artikel 4

1. I tilfælde, hvor der foreligger formodning om forekomst, skal de officielle ansvarlige organer i den medlemsstat, hvor disse tilfælde er blevet indberettet, sørge for, at der gennemføres officiel laboratorietest eller laboratorietest under officielt tilsyn efter den i bilag I omhandlede metode og i henhold til betingelserne i bilag II, nr. 1, for at bekræfte eller afkræfte den formodede forekomst. I førstnævnte tilfælde finder betingelserne i bilag II, nr. 2, anvendelse.

2. Indtil den formodede forekomst som omhandlet i stk. 1 er blevet bekræftet eller afkræftet, skal medlemsstaternes officielle ansvarlige organer i de tilfælde af formodet forekomst, hvor:

i) der enten er konstateret diagnostiske visuelle symptomer, som giver anledning til at formode sygdommen

ii) eller er foretaget en positiv immunofluorescenstest som omhandlet i bilag I eller en anden relevant positiv test:

a) forbyde flytning af alle partier eller sendinger, hvoraf der er taget prøver, medmindre det sker under deres tilsyn og på betingelse af, at det er fastslået, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig

b) tage skridt til at finde frem til den formodede forekomsts oprindelse

c) på grundlag af omfanget af den anslåede risiko træffe yderligere forholdsregler for at forhindre, at skadegøreren breder sig. Disse forholdsregler kan omfatte officielt tilsyn med flytning af alle andre knolde eller planter inden for eller fra ethvert sted, der sættes i forbindelse med den formodede forekomst.

3. Følgende bestemmelse kan vedtages efter fremgangsmåden i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— de foranstaltninger, hvortil der henvises i stk. 2, litra c), i nærværende artikel.

4. Følgende bestemmelse skal vedtages efter fremgangsmåden i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— den anden relevante test, som er omhandlet i stk. 2, nr. ii), i nærværende artikel.

Artikel 5

1. Hvis en officiel laboratorietest eller en laboratorietest under officielt tilsyn efter den i bilag I fastsatte metode bekræfter skadegørerens tilstedeværelse i en prøve af knolde, planter eller plantedele, skal medlemsstatens officielle ansvarlige organer under hensyn til gode videnskabelige principper, skadegørerens biologi og det særlige produktions-, omsætnings- og forarbejdningssystem i den pågældende medlemsstat:

a) erklære følgende for inficeret: knoldene eller planterne, sendingen og/eller partiet samt maskinerne, køretøjet, fartøjet og lageret eller enheder heraf og alle andre genstande, herunder emballage, hvorfra prøven er taget, og eventuelt produktionsstedet og marken, hvor knoldene eller planterne er høstet

b) under hensyntagen til bestemmelserne i bilag III, nr. 1, bestemme omfanget af den sandsynlige infektion ved kontakt før eller efter høst eller gennem produktionsmæssig tilknytning til den erklærede infektion

c) afgrænse et område på grundlag af erklæringen om infektion i henhold til litra a), bestemmelsen af omfanget af den sandsynlige infektion i henhold til litra b) og skadegørerens mulige udbredelse under hensyntagen til bestemmelserne i bilag III, nr. 2.

2. I henhold til bestemmelserne i bilag III, nr. 3, giver medlemsstaterne omgående de øvrige medlemsstater og Kommissionen meddelelse om en erklæret infektion, jf. stk. 1, litra a), og om områdeafgrænsningen, jf. stk. 1, litra c).

Oplysningerne i denne meddelelse er fortrolige. De kan forelægges for komitéen efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF.

3. Som følge af meddelelsen efter stk. 2 og de elementer, som indgår heri, skal eventuelle andre medlemsstater, der er anført i meddelelsen, efter omstændighederne afgive erklæring om infektion, bestemme omfanget af den sandsynlige infektion og afgrænse et område ifølge henholdsvis litra a), b) og c) i stk. 1.

Artikel 6

Hvis knolde eller planter er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), foreskriver medlemsstaterne, at der i overensstemmelse med artikel 4, stk. 1, skal udføres test af alle knolde og planter, der er klonalt beslægtede med dem, der er omfattet af infektionen. Testene udføres på det antal knolde eller planter, der er nødvendige for at bestemme den sandsynlige primære smittekilde og omfanget af den sandsynlige infektion, om muligt efter faldende infektionsrisiko.

Som resultat af testene foretages efter omstændighederne på ny følgende: erklæring om infektion, bestemmelse af omfanget af den sandsynlige infektion og afgrænsning af et område ifølge henholdsvis litra a), b) og c) i artikel 5, stk. 1.

Artikel 7

1. Medlemsstaterne foreskriver, at knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), ikke må udplantes, og at de under tilsyn af medlemsstaternes officielle ansvarlige organer skal:

— destrueres, eller

— bortskaffes på anden måde i henhold til en eller flere foranstaltninger under officielt tilsyn efter bestemmelserne i bilag IV, nr. 1, når det er fastlået, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig.

2. Medlemsstaterne foreskriver, at knolde eller planter, som er erklæret for sandsynligvis inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra b), ikke må udplantes, og at de, uden at det berører resultatet af den i artikel 6 omhandlede test af klonalt beslægtede kartofler, under tilsyn af deres officielle ansvarlige organer skal anvendes eller bortskaffes på passende måde som anført i bilag IV, nr. 2, og således, at det fastslås, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig.

3. Medlemsstaterne foreskriver, at maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder deraf og alle andre genstande, herunder emballage, som er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), eller sandsynligvis inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra b), skal destrueres eller rengøres og desinficeres efter passende metoder som anført i bilag IV, nr. 3. Efter desinfektion anses sådanne genstande ikke længere for at være inficeret.

4. Uden at det berører foranstaltningerne i henhold til stk. 1, 2 og 3, foreskriver medlemsstaterne, at der skal træffes en række foranstaltninger som anført i bilag IV, nr. 4, i det afgrænsede område, jf. artikel 5, stk. 1, litra c).

Artikel 8

1. Medlemsstaterne foreskriver, at læggekartofler skal opfylde kravene i direktiv 77/93/EØF, og at de i direkte linje skal hidrøre fra læggemateriale, som er frembragt under et officielt godkendt program, og som er fundet fri for skadegøreren ved officielle test eller test udført under officielt tilsyn efter den i bilag I nævnte metode.

De ovennævnte test udføres:

— på planter af det oprindelige klonudvalg, såfremt infektionen berører produktionen af læggekartofler

— på planter af det oprindelige klonudvalg eller på repræsentative prøver af basislæggekartofler eller tidligere generationer i andre tilfælde.

2. Følgende bestemmelser kan vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF:

— gennemførelsesbestemmelserne til stk. 1, andet afsnit, første led, i nærværende artikel

— bestemmelserne om de repræsentative prøver som omhandlet i stk. 1, andet afsnit, andet led, i nærværende artikel.

Artikel 9

Medlemsstaterne forbyder besiddelse og håndtering af skadegøreren.

Artikel 10

Medmindre andet er fastsat i direktiv 77/93/EØF kan medlemsstaterne tillade undtagelser fra de i nærværende direktivs artikel 6, 7 og 9 omhandlede foranstaltninger, når formålet er forsøg, forskning eller planteforædling, idet disse undtagelser dog ikke må være til hinder for bekæmpelsen af skadegøreren eller skabe risiko for, at skadegøreren breder sig.

Artikel 11

Medlemsstaterne kan i fornødent omfang træffe supplerende eller strengere foranstaltninger til bekæmpelse af skadegøreren eller til at forhindre, at den breder sig, for så vidt de er i overensstemmelse med bestemmelserne i direktiv 77/93/EØF.

De i første stykke omhandlede supplerende foranstaltninger kan omfatte en bestemmelse om, at der kun må anvendes læggekartofler, som enten er officielt certificerede, eller som ifølge officiel inspektion opfylder de krævede plantesundhedsnormer. Sidstnævnte gælder især, når landbrugere

har tilladelse til på deres egen bedrift at anvende læggekartofler, som stammer fra deres egen avl, og i andre tilfælde, hvor der anvendes selvproducerede læggekartofler.

De nærmere enkeltheder i disse foranstaltninger meddeles de øvrige medlemsstater og Kommissionen.

Artikel 12

Ændringer af bilagene til dette direktiv som følge af udviklingen i den videnskabelige og tekniske viden vedtages efter proceduren i artikel 16a i direktiv 77/93/EØF.

Artikel 13

1. Medlemsstaterne vedtager og offentliggør inden den 15. november 1993 de bestemmelser, der er nødvendige for at efterkomme dette direktiv. De underretter straks Kommissionen herom.

Når medlemsstaterne vedtager disse bestemmelser, skal de indeholde en henvisning til dette direktiv, eller de skal ved offentliggørelsen ledsages af en sådan henvisning. De nærmere regler for denne henvisning fastsættes af medlemsstaterne.

De anvender disse bestemmelser fra den 16. november 1993.

2. Medlemsstaterne meddeler straks Kommissionen teksten til de nationale retsforskrifter, som de udsteder på det område, der er omfattet af dette direktiv. Kommissionen underretter de øvrige medlemsstater herom.

Artikel 14

Direktiv 89/665/EØF ophæves med virkning fra den 16. november 1993.

Artikel 15

Dette direktiv er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Luxembourg, den 4. oktober 1993.

På Rådets vegne

W. CLAES

Formand

BILAG I

METODE TIL SPORING OG DIAGNOSTICERING AF RINGBAKTERIOSE, CLAVIBACTER MICHIGANENSIS (SMITH) DAVIS ET AL. SSP. SEPEDONICUS (SPIECKERMANN ET KOTTHOFF) DAVIS ET AL., I PARTIER AF KARTOFFELKNOLDE)

1. **Fjernelse af kartoflens indre ved endeskorper**

1.1. Vask 200 knolde i rindende postevand og fjern epidermis rundt om endeskorpen på hver knold, idet der anvendes en normalt desinficeret skalpel eller kartoffelskræller; desinficering kan foretages ved dypning af skrælleren i 70 % ethanol og ved flambering.

1.2. Fjern forsigtigt de inderste koniske væv fra endeskorperne med en kniv eller kartoffelskræller. Sørg for, at der er mindst muligt overskydende ikke-vaskulært væv. Når endeskorperne er fjernet, bør de behandles inden 24 timer (nr. 3) eller konserveres ved – 20°C i højst to uger.

2. **Visuel undersøgelse med henblik på ringbakteriosesymptomer**

Efter af endeskorperne er fjernet, skæres hver knold igennem på tværs og iagttages med henblik på ringbakteriosesymptomer.

Pres knoldene og se efter udtrædning af opblødt væv fra karvævet.

De tidligste symptomer er en svag glasagtighed eller gennemsigtighed i vævet uden opblødning rundt om karsystemet, især tæt ved endeskorpen. Karvævsringen ved endeskorpen kan være lidt mørkere i farven end normalt. Det første letgenkendelige symptom viser sig ved, at karvævsringen har en gullig farve, og at der, når knolden presses svagt, kommer strenge af ostelignende materiale ud fra karrene. Denne udsondring indeholder millioner af bakterier. Der kan i denne fase udvikle sig brunfarvning af karvævet. I begyndelsen kan disse symptomer være begrænset til en del af ringen, der ikke nødvendigvis er tæt ved endeskorpen, og kan gradvis brede sig til hele ringen. Efterhånden som infektionen skrider frem, ødelægges karvævet; den ydre cortex kan blive adskilt fra den indre cortex. På fremskredne stadier af infektionen opstår revner på knoldens overflade, som ofte er rødligt-brune ved randene. Sekundære svampe- eller bakterieangreb kan sløre symptomerne, og det kan være vanskeligt, ja umuligt, at skelne fremskredne ringbakteriosesymptomer fra andre bakterioser i knoldene.

3. **Forberedelse af prøver med henblik på Gram-farvning, immunofluorescens-farvning (IF) og ægplantetesten**

3.1. Homogeniser endeskorperne, indtil der lige netop opnås fuldstændig opblødning i en fortynder, der vides at være ugiftig for Corynebacterium sepedonicum (f.eks, 0,05 M fosfat-buffer saltopløsning (PBS) pH 7,0), med en temperatur på under 30°C; det må tilrådes at tilsætte et ugiftigt deflokkuleringsmiddel, og ugiftigt antiskummiddel kan være nødvendigt (tillæg 1 og 2). Overdreven opblødning bør undgås.

3.2 Udtræk bakterier fra homogenatet ved en af de følgende metoder (1):

A. a) Centrifuger med højst 180 g i ti minutter.

b) Centrifuger flydelaget med mindst 4 000 g i ti minutter. Hæld om og frasorter flydelaget.

B. a) Lad det opblødte materiale stå i 30 minutter, således at det nedbrudte vævsmateriale kan bundfælde sig. Hæld flydelaget fra uden at forstyrre bundfaldet.

b) Filtrer flydelaget gennem papirfilter (Whatman nr. 1) anbragt i et sintret glasfilter (nr. 2 = 40-100 µm), idet der anvendes en vandvakuumpumpe. Saml filtratet i et centrifugerør. Vask filtret med steril PBS til en filtratvolumen på 35 ml.

c) Centrifuger filtratet med mindst 4 000 g i 20 minutter.

3.3 Opslæm tørstof i steril 0,01 M fosfat-buffer pH 7,2 (tillæg 2) for at opnå et samlet volumen på ca. 1 ml. Del i to lige store dele og opbevar én del til referenceformål ved nedfrysning ved – 20°C (2) eller ved lyofilisering. Del den anden del i to halvdele, idet én halvdel anvendes til IF-testen og Gram-farvningen, medens den anden anvendes til ægplantetesten.

(1) En alternativ ekstraktionsmetode anføres af Dinesen, 1984.

(2) Der er tegn på (Janse og Van Vaerenberg, 1987), at nedfrysning kan nedsætte levedygtigheden hos Corynebacterium sepedonicum. Opslæmning af tørstoffet i 10 % glycerol kan løse problemet.

3.4. Det er bydende nødvendigt, at alle positive C. sepedonicum kontrolforsøg og prøver behandles for sig for at undgå kontaminering. Dette gælder IF-glas og ægplantetest.

4. **Gram-farvning**

4.1. Forbered Gram-farvning for alle tørstoffortyndinger (5.2.1) og for alle overskårne knolde (2), der opviser glasagtighed, forrådnelse eller andre mistænkelige symptomer. Prøverne bør udtages fra kanten af det syge væv.

4.2. Forbered Gram-farvning for kendte C. sepedonicum kulturer og, om muligt, for naturligt inficeret væv (5.1).

4.3. Fastslå, hvilke prøver der indeholder typiske Gram-positive coryneforme celler. Generelt er C. sepedonicum celler 0,8-1,2 µm lange og 0,4-0,6 µm brede.

En passende farvningsprocedure er angivet i tillæg 3.

Præparater fra naturlige infektioner eller fra nyligt isolerede kulturer har ofte overvægt af coccoide stavbakterier, der normalt er lidt mindre end celler fra andre agarkulturer. På de fleste næringssubstrater er C. sepedonicum celler polymorfe coryneforme stave og kan give en variabel Gram-reaktion. Cellerne optræder enkeltvis, i par med karakteristiske »albuer« typisk for bøjedeling, og undertiden i uregelmæssige grupper, der ofte omtales som palisader og kinesiske bogstaver.

5. **Metode til IF-test**

5.1. Anvend antiserum på en kendt stamme af C. sepedonicum ATCC 33113 (NCPPB 2137), eller NCPPB 2140. Dette bør have en IF-titer på mere end 1:600. Medtag en PBS-kontrol på prøveglasset for at fastslå, om fluorescein isothiocyanat anti-kanin immunoglobulin konjugatet (FITC) forbinder sig ikke-specifikt med bakterieceller. Corynebacterium sepedonicum (ATCC 33113 (NCPPB 2137), NCPPB 2140) bør anvendes som homolog antigenkontrol på et glas for sig. Naturligt inficeret væv (bevaret ved lyofilisering eller nedfrysning ved −20°C) bør anvendes, når det er muligt, som en lignende kontrol på samme glas (figur 2).

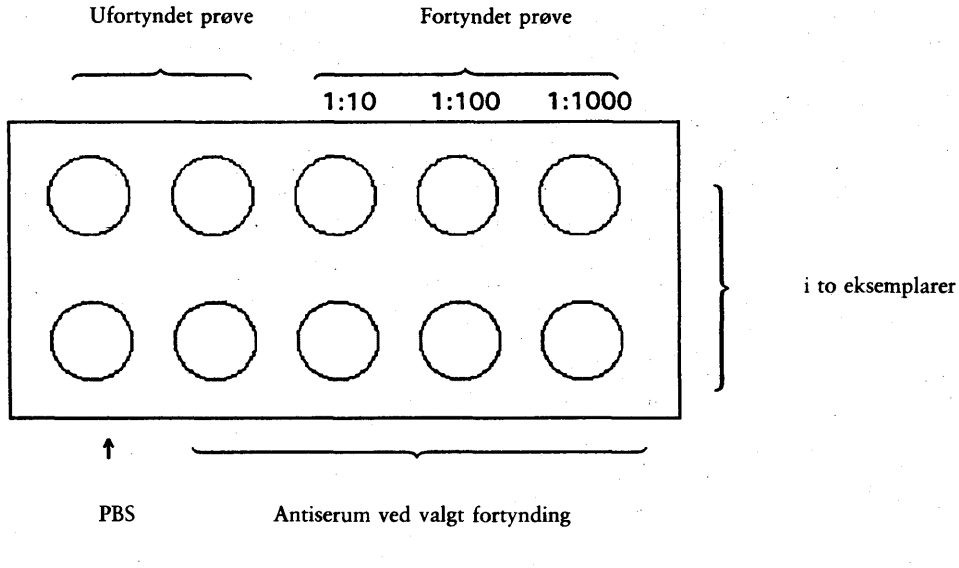
5.2. *Fremgangsmåde*

5.2.1. Forbered tre fortyndinger, hvor forholdet er en eksponentiel række af 10 (10^1, 10^2, 10^3), af det endelige tørstof i destilleret vand (figur 1).

5.2.2. Anbring med pipette en afmålt standardmasse, der er tilstrækkelig til at dække vinduet (ca. 25 µl), af hver tørstoffortynding eller C. sepedonicum-opslæmning (ca. 10^6 celler/ml) i vinduerne på et multispot-glas som vist i figur 1.

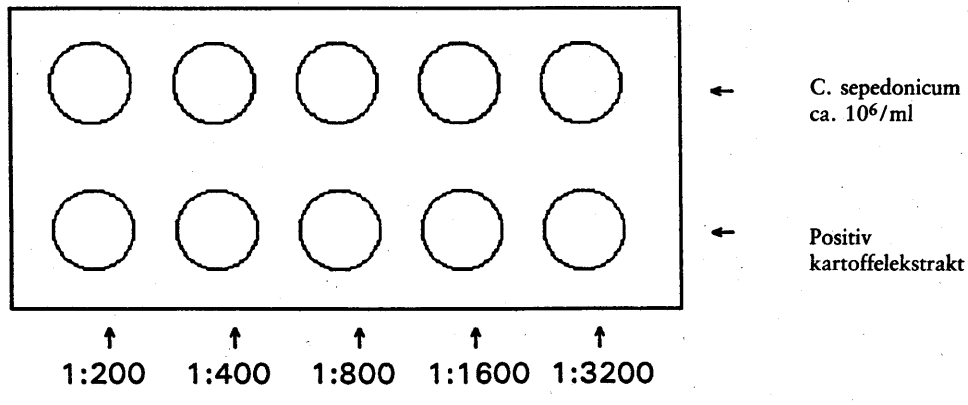
Figur 1

Glas med prøve og PBS-kontrol



Figur 2

Glas med henblik på positiv kontrol



5.2.3. Lad lufttørre ved ca. 37°C og bind med 95 % ethanol eller ved flambering.

5.2.4. Dæk de relevante vinduer med C. sepedonicum-antiserum i de anbefalede fortyndinger, 0,01 M PBS pH 7,2 (tillæg 2) som vist i figur 1. (Anvend PBS til FITC-kontrol). Arbejdsfortyndingen af antiserummet bør være ca. det halve af IF-titeret. Hvis der skal medtages andre antiserum-fortyndinger, bør der forberedes særskilte glas for hver fortynding, der skal anvendes.

5.2.5. Inkuber i et fugtkammer ved omgivende lufttemperatur i 30 minutter.

5.2.6. Skyl omhyggeligt med 0,01 M PBS pH 7,2. Vask i fem minutter i tre hold af 0,01 M PBS pH 7,2.

5.2.7. Fjern omhyggeligt overskydende fugt.

5.2.8. Dæk hvert vindue med FITC-konjugat med den samme fortynding, der blev anvendt til at bestemme titer, og inkuber i et mørkt fugtkammer ved omgivende lufttemperatur i 30 minutter.

5.2.9. Skyl og vask som før.

5.2.10. Anbring ca. 5-10 µl af 0,1 M fosfat-buffer glycerin pH 7,6 (eller et lignende præparat med en pH på ikke under 7,6) i hvert vindue og luk med et dækglas (tillæg 2).

5.2.11. Undersøg med et mikroskop udstyret med en epifluorescerende lyskilde og filtre, der er egnede til arbejdet med FITC. En forstørrelse på 400-1 000 er passende. Gennemsøg de fordoblede vinduer langs to diametre vinkelret og rundt om vinduesperimetrene.

Se efter fluorescerende celler i de positive kontrolprøver og bestem titeret. Se efter fluorescerende celler i FITC/PBS kontrolvinduet og, hvis der intet foreligger, gå videre til prøve-vinduerne. Bestem i mindst ti mikroskopfelter det gennemsnitlige antal af morfologisk typiske fluorescerende celler pr. felt og beregn antallet pr. ml af ufortyndet tørstof (bilag 4).

Der er flere problemer forbundet med immunofluorescens-testen.

— Baggrundsbestande af fluorescerende celler med atypisk morfologi og krydsreagerende rådbakterier med en størrelse og morfologi, der ligner Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus, vil sandsynligvis forekomme i kartoffeltørstof. Kun fluorescerende celler med typisk størrelse og morfologi tages i betragtning.

  Da der er mulighed for krydsreaktioner, bør prøver med en positiv immunofluorescenstest prøves på ny med forskelligt antiserum.

— Den tekniske grænse for påvisning ved denne metode ligger mellem 10^3 og 10^4 celler pr. ml ufortyndet tørstof. Prøver med IF-typiske celler i et antal nær påvisningsgrænsen er sædvanligvis negative for C. m. ssp. sepedonicus, men kan underkastes ægplantetest.

En immunofluorescenstest fastslås som negativ i forbindelse med enhver prøve, hvor der ikke findes morfologisk typiske fluorescerende celler. Prøverne betragtes som »ikke-kontamineret« med Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus.

Ægplantetesten er ikke påkrævet.

En immunofluorescenstest fastslås som positiv i forbindelse med enhver prøve, hvor der findes morfologisk typiske fluorescerende celler. Prøver, i forbindelse med hvilke en immunofluorescenstest er blevet fastslået som positiv med begge antisera, betragtes som »eventuelt kontamineret« med Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus. Ægplantetest er påkrævet for alle prøver, der betragtes som eventuelt kontaminerede.

6. **Ægplantetest**

For detaljer vedrørende dyrkning, se tillæg 5.

6.1. Fordel tørstoffet fra 3.3 mellem mindst 25 ægplanter på løvstadium 3 (tillæg 5) efter en af nedenstående metoder (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.2. *Spalteindpodning I*

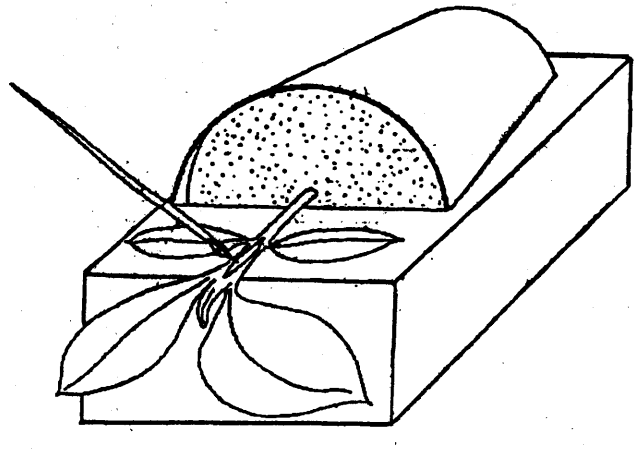
6.2.1. Støt hver potte horisontalt (en blok af ekspanderet polystyren, hvor man fra en overflade har fjernet et stykke 5 cm dybt × 10 cm bredt × 15 cm langt (figur 3), er tilstrækkelig for en 10 cm-potte). En strimmel af steril aluminiumfolie bør anbringes mellem stilken og blokken for hver prøve, der undersøges. Planten kan holdes på plads med et gummibånd rundt om blokken.

6.2.2. Med en skalpel udføres et snit på langs eller et svagt diagonalt snit, der er 0,5-1,0 cm langt og ca. så dybt som 3/4 af stilkens diameter, mellem kimbladene og det første blad.

6.2.3. Hold spalten åben med skalpelbladets spids og pensl podestoffet ind i den, idet der anvendes en eyeliner eller en fin kunstnerpensel, der er påsmurt tørstoffet. Fordel resten af tørstoffet mellem ægplanterne.

6.2.4. Luk snittet med steril vaseline fra en sprøjte med 2 ml-cylinder.

Figur 3



6.3. *Spaltepodning II*

6.3.1. Hold planten mellem to fingre, anbring med pipette en dråbe (ca. 5-10 µl) af det opslæmmede tørstof på stilken mellem kimbladene og det første blad.

6.3.2. Skær med en steril skalpel en diagonal spalte (med en vinkel på ca. 5°), der er 1,0 cm lang og så dyb som ca. 2/3 af stilkens tykkelse, idet snittet begyndes fra tørstofdråben.

6.3.3. Luk snittet med steril vaseline fra en sprøjtecylinder.

6.4. *Sprøjteindpodning*

6.4.1. Undgå at vande ægplanterne én dag forud for indpodningen for således at mindske saftspændingen.

6.4.2. Pod på ægplantestilkene lige over kimbladene med en sprøjte, der er forsynet med en subkutan nål (ikke mindre end 23G). Fordel tørstoffet mellem ægplanterne.

6.5. Pod på 25 planter med en kendt C. sepedonicum-kultur og, hvor det er muligt, med naturligt inficeret væv fra knoldene (5.1) efter samme indpodningsmetode (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.6. Pod på 25 planter med steril 0,05 M PBS efter samme indpodningsmetode (6.2, 6.3 eller 6.4).

6.7. Inkuber planterne under passende forhold (tillæg 5) i 40 dage. Undersøg regelmæssigt med henblik på symptomer efter otte dage. Tæl antallet af planter, der opviser symptomer. C. sepedonicum forårsager visnen af blade på ægplanter, der kan begynde som en slaphed i randene eller mellem bladstrengene. Vissent væv kan i begyndelsen forekomme mørkegrønt eller spættet, men bliver blegere, før det nekrotiserer. Visnede steder mellem bladstrengene har ofte et fedtet, gennemblødt udseende. Nekrotisk væv har ofte en lysegul rand. Planterne dør ikke nødvendigvis; jo længere perioden før symptomernes udvikling er, desto større er chancerne for overlevelse. Planterne kan vokse fra infektionen. Modtagelige unge ægplanter er langt mere følsomme for ringe bestande af C. sepedonicum end ældre planter, derfor er det nødvendigt at anvende planter på eller lige før bladstadium 3.

Visnen kan også skyldes bestande af andre bakterier eller svampe, der findes i tørstoffet fra knoldenes væv. De omfatter Erwinia carotovora subsp. carotovora og E. carotovora subsp. atroseptica, Phoma exiqua var. foveata, samt store bestande af rådbakterier. En sådan visnen kan skelnes fra den visning, der skyldes C. sepedonicum, eftersom hele blade eller hele planter hurtigt visner.

6.8. Forbered en Gram-farvning (4) for alle partier af ægplanter, der opviser symptomer, idet der anvendes udsnit af visnet bladvæv og stilkvæv fra planter, og isoler prøverne på egnede næringssubstrater (7). Desinficer overfladen af ægplanternes blade og stilke ved aftørring med 70 % ethanol.

6.9. Under visse omstændigheder, især hvor vækstbetingelserne ikke er optimale, kan C. sepedonicum eventuelt eksistere som en latent infektion i ægplanter selv efter en inkubationstid på 40 dage. Sådanne infektioner kan muligvis bevirke forkrøbling og kraftesløshed hos de podede planter. Hvis IF-testen anses for positiv, kan det være nødvendigt at foretage yderligere test. Det er derfor afgørende vigtigt at sammenligne vækstraterne for alle de ægplanter, der indgår i testen, med de sterile 0,05 M PBS podede kontrolprøver, og at kontrollere miljøforholdene i drivhuset.

Der kan gives følgende anbefalinger med henblik på yderligere test:

6.9.1. Udskær stilkene over podningsstedet og fjern bladene.

6.9.2. Opblød stilkene i 0,05 M PBS pH 7,0 som i 3.1 og 3.2.

6.9.3. Brug halvdelen af tørstoffet til at foretage en Gram-farvning (4) og en IF-test (5).

6.9.4. Brug den anden halvdel til at foretage endnu en ægplantetest (6), hvis Gram-farvningen og/eller IF-testene er positive. Anvend en kendt C. sepedonicum-kultur og sterile 0,05 M PBS kontrolprøver. Hvis symptomerne ikke observeres i den påfølgende test, skal testen anses for negativ.

7. **Isolering af C. sepedonicum**

Diagnosen kan kun bekræftes, hvis C. sepedonicum isoleres og identificeres som sådan (8). Skønt C. sepedonicum er en organisme, det er vanskeligt at have med at gøre, kan den isoleres fra væv, der opviser symptomer. Den kan imidlertid blive overskygget af hurtigtvoksende rådbakterier, og isolering direkte fra tørstoffet fra knoldvævet (3.3) kan ikke anbefales. Ægplanter udgør et udmærket selektivt berigelsessubstrat for vækst af C. sepedonicum og giver også en udmærket bekræftende værtstest.

Isolering bør foretages fra alle kartoffelknolde og ægplanter, der opviser symptomer (4 og 6). Opblødning af ægplantestilke bør, hvis den er påkrævet, udføres som i 3 og 6.9.

7.1. Opløsningen udstryges på et af følgende substrater (tillæg 6 angiver formler):

— næringsagar med dextrose (kun for subkulturer)

— gæragar med peptonglukose

— gærnæringsagar med dextrose

— gærekstraktagar med mineralsalte.

Der inkuberes ved 21 °C i op til 20 dage.

C. sepedonicum er langsomtvoksende og giver sædvanligvis punktformede, cremefarvede og kuppelformede kolonidannelser i løbet af højst ti dage.

Der udstryges på ny for at sikre renheden.

Væksthastigheden kan øges ved hjælp af subkulturer. Kolonidannelser er typisk cremehvide eller elfenbensfarvede, afrundede, glatte, ophøjede, kuppelkonvekse, slimagtige til flydende, har ubrudte kanter og er sædvanligvis 1 til 3 mm i diameter.

Identifikation

Mange Gram-positive coryneform-bakterier, som danner kolonier, der ligner C. sepedonicum-kolonier, kan isoleres fra sunde eller syge kartofler eller ægplanter. Over for sådanne må C. sepedonicum identificeres ved hjælp af følgende test:

IF-test (punkt 5.1)

Ægplantetest

Næringstest og fysiologisk test (tillæg 7)

— Oxidations/fermenteringstest (O/F)

— Oxidasetest

— Vækst ved 37 °C

— Produktion af urease

— Hydrolyse af aesculin

— Hydrolyse af stivelse

— Tolerance over for 7 % natriumchloridopløsning

— Indoltest

— Katalasetest

— Produktion af H_2S

— Udnyttelse af citrat

— Hydrolyse af gelatine

— Syre og glycerol, lactose, rhamnose og salicin

— Gram-farvning

Alle test bør omfatte en kendt C. sepedonicum-kontrol. Næringstest og fysiologiske test bør udføres ved podning med næringsagarsubkulturer. Der bør foretages morfologiske sammenligninger af næringsagarkulturer med dextrose.

Til IF-testen bør cellepopulationerne bringes på 10^6 celler pr. ml. IF-titeren bør svare til titeren for den kendte C. sepedonicum-kultur.

Til ægplantetesten bør cellepopulationerne bringes på ca. 10^7 celler pr. ml. Ægplantetesten bør udføres på ti planter for hver af testorganismerne, idet der også hér bruges den kendte C. sepedonicum-kultur og kontrol med sterilt vand; i rene kulturer bør der indtræde karakteristisk visnen efter højst 20 dages forløb, men planter uden symptomer efter dette tidsrum bør inkuberes i et samlet tidssrum af 30 dage ved temperaturer, der fremmer ægplanters vækst, men ikke overstiger 30 °C (jf. tillæg 5). Er der ingen symptomer efter 30 dage, kan det ikke fastslås, at kulturen er en patogen form for Corynebacterium sepedonicum.

Test	*C. sepedonicum*
O/F	Inert eller svagt oxiderende
Oxidase	–
Katalase	+
Nitratreduktion	–
Ureaseaktivitet	–
H_2S-produktion	–
Indolproduktion	–
Citratudnyttelse	–
Hydrolyse af stivelse	– eller svag
Vækst ved 37°C	–
Vækst i 7 % NaCl	–
Hydrolyse af gelatine	–
Hydrolyse af aesculin	+
Syre af:	
— glycerol	–
— lactose	– eller svag
— rhamnose	–
— salicin	–

Tillæg 1

FORMEL FOR UDBLØDNINGSVÆSKE ANBEFALET AF LELLIOTT OG SELLAR 1976

D C silicone Antifoam MS A compund (Hopkins & Williams Ltd, Cat. No. 9964 – 25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml
Lubrol W i flager (ICI Ltd)	0,5 g
Tetrasodium pyrophosphat	1 g
0,05 M phophatbufferet saltopløsning, pH 7,0 (tillæg 2)	1 liter

Tillæg 2

BUFFERE

0,05 M phosphatbufferet saltopløsning med pH 7,0

Denne buffer kan anvendes til udblødning af væv af rodknolde (2.1)

Na_2HPO_4	4,26 g
KH_2PO_4	2,72 g
NaCl	8,0 g
Destilleret vand op til	1 liter

0,01 M phosphatbufferet saltopløsning med pH 7,2

Denne buffer anvendes til fortynding af antisera og til afvaskning af IF-objektglas

$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 . 2H_2O$	0,4 g
NaCl	8,0 g
Destilleret vand op til	1 liter

0,1 M phosphatbufferet glycerin pH 7,6

Denne buffer kan anvendes med katalytisk effekt til forøgelse af fluorescensen i IF-prøven

$Na_2HPO_4 . 12H_2O$	3,2 g
$Na_2PO_4 . 2H_2O$	0,15 g
Glycerol	50 ml
Destilleret vand	100 ml

Tillæg 3

GRAMS AFSMITNINGSPROCEDURE (HUCKERS MODIFIKATION) (DOETSCH 1981)

Krystalviolet-opløsning

2 g krystalviolet opløses i 20 ml 95 % ethanol.

0,8 g ammoniumoxalat opløses i 80 ml destilleret vand.

De to opløsninger blandes.

Lugols jodopløsning

Jod	1 g
Kaliumiodid	2 g
Destilleret vand	300 ml

De to masser røres sammen i en morter. Vandet hældes i, og der omrøres i en lukket beholder, indtil opløsning har fundet sted.

Safranin-opløsning til fjernelse af afsmitningen

Stamopløsning:

Safranin O	2,5 g, og
95 % ethanol	100 ml

Der blandes og henstilles.

Der opløses i forholdet 1:10 for at få en praktisk anvendelig opløsning.

Afsmitningsprocedure

1. Udstrygningspræparater, lufttørring og varmegrad forberedes.
2. Objektglas overhældes med krystalviolet-opløsningen i et minut.
3. Der skylles kort med hanevand.
4. Der overhældes med Lugols jodopløsning i et minut.
5. Der skylles med hanevand og duppes tørt.
6. Farve fjernes med 95 % ethanol, tilført dråbevis, indtil farve ikke længere forsvinder, eller der foretages nedsænkning og let omrysten i 30 sekunder.
7. Der skylles med hanevand og duppes efter.
8. Der overhældes med safranin-opløsning i ti sekunder.
9. Der skylles med hanevand og duppes efter.

Gram-positive bakterier giver blå/violet afsmitning; Gram-negative bakterier giver lyserød/rød afsmitning.

Tillæg 4

BESTEMMELSE AF POPULATIONEN AF IF-POSITIVE CELLER

Overflademål (S) af vindue eller multispot-objektglas

$$= \frac{\pi D^2}{4} \qquad (1)$$

hvor D = vinduets diameter.

Synsfeltets overflademål

$$= \frac{\pi d^2}{4} \qquad (2)$$

hvor d = synsfeltets diameter.

d bestemmes enten ved direkte måling eller på grundlag af følgende formel:

$$s = \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4} \qquad (3)$$

hvor i = synsfeltkoefficienten (afhænger af okulartype og varierer fra 8 til 24)
K = rørkoefficienten (1 eller 1,25)
G = objektivets forstørrelse (100 ×, 40 ×, etc.)

$$\text{Af (2) } d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

$$\text{fås (3) } d = \sqrt{\frac{4 \times \frac{\pi i^2}{G^2K^2 \times 4}}{\pi}} = \frac{i}{GK} \qquad (4)$$

Optælling: antal typisk fluorescerende celler pr. synsfelt (c)

Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. vindue (C)

$$C = \frac{c \times S}{s}$$

Beregning: antal typisk fluorescerende celler pr. ml tørstofenhed (N)

$$N = C \times \frac{1000}{y} \times F$$

hvor y = tørstofenhedens volumen på vinduet, og
F = tørstofenhedens opløsningsfaktor.

Tillæg 5

ÆGPLANTEKULTUR

Frø af ægplante (Solanum melongena cv. Black Beauty) sås i pasteuriseret dyrkningskompost. Stiklingerne udplantes, når kimbladene er helt udfoldet (10 til 14 dage), i pasteuriseret vækstkompost.

Der skal anvendes ægplanter i bladstadium 3, hvor to og højst tre blade er foldet helt ud.

Ægplanterne skal dyrkes i drivhus under følgende vækstbetingelser:

daglængde:	14 timer eller den naturlige daglængde, hvis denne er på mere end 14 timer
temperatur:	21-24°C om dagen
	15°C om natten.

NB: C. sepedonicum kan ikke dyrkes ved en temperatur på mere end 30°C. Falder nattemperaturen ikke til 15°C, kan der forekomme kromoforbeskadigelse (sølvnekrose).

Beskadigelse af rødder ved angreb af sciarid-larver kan afbødes ved anvendelse af et passende insektmiddel.

Ægplanter cv. Black Beauty sælges af:

1. AB Hammenhögs Frø
   270 50 Hammenhög
   Sverige
2. Hurst Seeds Ltd
   Avenue Road
   Witham
   Essex CM8 2DX
   England
3. ASGRO Italia SpA
   Corso Lodi, 23
   Milano
4. Küpper
   Mitteldeutsche Samen GmbH
   Hessenring 22,
   D-37269 Eschwege

Tillæg 6

VÆKST- OG ISOLATIONSSUBSTRATER FOR C. SEPEDONICUM

Næringsagar (NA)

Difco Bacto Nutrient Agar i destilleret vand i det af fabrikanten anførte forhold. Der steriliseres i autoklave ved 121°C i 15 minutter.

Næringsagar med dextrose (NDA)

Difco Bacto Nutrient Agar indeholdende 1 % D(+)-glucose (monohydrat). Der steriliseres i autoklave ved 115°C i 20 minutter.

Gæragar med peptonglukose (YPGA)

Difco Bacto Yeast Extract (nr. 0127)	5 g
Difco Bacto Peptone (nr. 0118)	5 g
D(+)-glucose (monohydrate)	10 g
Difco Bacto Purified Agar (nr. 0560)	15 g
Destilleret vand	1 liter

Der steriliseres 1/2 l af substratet i autoklave ved 115°C i 20 minutter.

Gærekstraktagar med mineralsalte (YGM)

Difco Bacto Yeast Extract	2,0 g
D(+)-glukose (monohydrate)	2,5 g
K_2HPO_4	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,015 g
NaCl	0,05 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
Difco Bacto Purified Agar	18 g
Destilleret vand	1 liter

Der steriliseres 1/2 l af substratet i autoklave ved 115°C i 20 minutter.

Tillæg 7

NÆRINGSTEST OG FYSIOLOGISKE TEST TIL IDENTIFIKATION AF C. SEPEDONICUM

Alle substrater skal inkuberes ved 21 °C og undersøges efter seks dages forløb. Konstateres ingen vækst at have fundet sted, inkuberes der i op til 20 dage.

— **Oxideringstest og fermentationstest** (Hugh & Leifson, 1953) – O/F-test

Basissubstrat:

KCl	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1,0 g
Difco Bacto Peptone	1,0 g
Difco Bacto Purified Agar	3,0 g
D(+)-glucose (monohydrate)	10,0 g
Bromothymolblåt	0,03 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes og justeres til pH 7,0-7,2 med 1 N KOH.

Blandingen påfyldes Pyrex-kulturglas på 16 × 100 mm (indhold 12 ml) i mængder på 5 og 10 ml.

Der steriliseres i autoklave ved 115 °C i ti minutter.

5 ml- og 10 ml-glassene stavpodes med hver enkelt kultur. Der tilføres aseptisk 1-2 ml sterilt flydende paraffin til 10 ml-glassene. Der inkuberes.

Positiv reaktion:

Glas	Farve	Indikation
åbent lukket	gul gul	fermenterende
åbent lukket	gul blågrøn	oxiderende
åbent lukket	grønlig blågrøn	oxiderende eller inert

— **Oxidasetest** (Kovacs, 1956)

Kovacs oxidasereagens:

1 % vandig opløsning af tetramethylparaphenylendiamiddihydrochlorid (BDH nr. 30386) i destilleret vand.

Reagensen bør være frisklavet i mængder på 1 ml; den kan dog opbevares i en til fire uger i en brun glasflaske ved 5 °C.

En dråbe reagens dryppes på filterpapir i en ren petriskål. Med et platinøje påføres straks lidt testkultur fra næringsagaren.

Positiv reaktion: der udvikles purpurfarvning i løbet af ti sekunder. Varer det 10 til 30 sekunder, før farvevirkningen kan konstateres, er kulturen svagt positiv.

NB: Det er vigtigt, at der anvendes et platinøje og NA-kulturer, da spor af jern eller af et højt sukkerindhold i vækstsubstrat kan give falske positive resultater.

— **Syreproduktion fra lactose, rhamnose, salicin og glycerol**

Hugh & Leifson's O/F-substrat uden glukose tilberedes. Der fordeles med 5 ml i glas. Der steriliseres i autoklave ved 115 °C i ti minutter. Til den smeltede masse tilsættes aseptisk ved 45 °C 0,5 ml af en filtersteriliseret 10 % vandig opløsning af enten glycerol, lactose, rhamnose eller salicin. Der blandes omhyggeligt.

Positiv reaktion: ændringg af farven fra blågrøn til gul indikerer, at syredannelse finder sted.

— **Katalasetest**

En dråbe hydrogenperoxid (volumen 30) dryppes på et rent objektglas, og der emulgeres ved hjælp af et platinøje med en øjefuld kultur.

Positiv reaktion: produceres der iltbobler i dråben, kan katalase konstateres at forekomme.

— **Nitratreductaseaktivitet og denitrifikation** (Bradbury, 1970)

Kultursubstrat:

KNO_3 (nitratfri)	1 g
Difco Bacto Yeast Extract	1 g
K_2HPO_4	5 g
Destilleret vand	1 liter

Mængder på 10 ml hældes i 20 ml-flasker. De steriliseres i autoklave ved 121 °C i 15 minutter.

Reagens A:

H_2SO_4	8g
5N eddikesyre	1 liter

Reagens B:

naphtylamin	5 g
5N eddikesyre	1 liter

Nitratsubstratet podes på to gange. Der testes efter 10 og 20 dage ved tilsætning af 1 dråbe Lugols jodopløsning, 0,5 ml reagens A og 0,5 ml reagens B. Bliver substratet ikke rødt, tilføjes 50 mg zinkpulver. Farvereaktionen observeres.

Positiv reaktion:	*Farvereaktion*	
	Fase 1	*Fase 2*
Ingen nitratreduktion	farveløs	rød
Nitratreduktion excl. nitrit (kun nitratreductase)	rød	—
Nitratreduktion incl. nitrit (denitrifikation — nitrat- og nitritreductase)	farveløs	farveløs

— **Ureaseproduktion** (Lelliott, 1966)

Basissubstrat:

Oxoid Urea Agar Base (CM53)	2,4 g
Destilleret vand	95 ml

Der steriliseres i autoklave ved 155 °C i 20 minutter. Den smeltede masse nedkøles til 50 °C, og der tilsættes aseptisk 5 ml filtersteriliseret 40 % vandig ureaopløsning (Oxoid SR20). Der blandes grundigt.

Mængder på 6 ml fordeles i sterile rør (16 × 100 mm), som anbringes skråt og fast.

Positiv reaktion: det gul-orange substrat antager en kirsebærrød eller mørkrødlig farvning, hvis ureaseaktivitet er forekommet.

— **Citratudnyttelse** (Christensen) (Skerman, 1967)

Citratagarbasis (Merck 2503)	23 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes og opløses ved opvarmning. Mængder på 6 ml fordeles som for ureasubstratet. Der steriliseres i autoklave ved 121 °C i 15 minutter; glassene skråtstilles.

Positiv reaktion: citratudnyttelse indikeres ved ændring af substrates farve fra orange til rød.

— **Hydrogensulphidproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto Trypton (nr. 0123)	10 g
K_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Destilleret vand	1 liter

Der destilleres og fordeles med mængder på 6 ml i rør på 16 × 100 mm. Der steriliseres i autoklave ved 115°C i ti minutter.

Et blyacetatpapir (Merck 9511) podes og holdes aseptisk op for rørets munding. Det fastgøres med låget. Der inkuberes i op til 20 dage.

Positiv reaktion: produktion af H_2S fra trypton indikeres ved, at testpapiret udvikler en sort-brun farvning.

— **Indolproduktion** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

som for H_2S-testen.

Blyacetatpapiret fjernes, og der tilsættes 1-2 ml diethylæter, hvorefter der rystes varsomt. Lagene skal have tid til at skille sig (fem minutter). Der tilsættes 0,5 ml Kovacs reagens (Merck 9293) forsigtigt ned langs rørets indvendige side.

Positiv reaktion: forekomst af indol indikeres ved, at der udvikles en rød farvning i det gule lag mellem æterelementet og det vandige element.

— **Vækst ved 37°C** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto Nutrient Broth (nr. 0003)	8 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes, opløses, og mængder på 6 ml fordeles i rør.

Der steriliseres i autoklave ved 121°C i 15 minutter.

Der podes og inkuberes ved 37°C.

Positiv reaktion: se efter vækst.

— **Vækst i 7 % natriumchloridopløsning** (Ramamurthi, 1959)

Substrat:

Difco Bacto Nutrient Broth	8g
NaCl	70 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes, opløses, og mængder på 6 ml fordeles i rør.

Der steriliseres i autoklave ved 121°C i 15 minutter.

Positiv reaktion: se efter vækst.

— **Hydrolyse af gelatine** (Lelliott, Billing & Hayward, 1966)

Substrat:

Difco Bacto Gelatin (nr. 0143)	120 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes, opløses ved opvarmning, og mængder på 6 ml fordeles i rør.

Der steriliseres i autoklave ved 121°C i 15 minutter.

Positiv reaktion: smeltning af gelatine, selv når den opbevares ved 5°C i 30 minutter.

— **Hydrolyse af stivelse**

Substrat:

Difco Bacto Nutrient Agar (smeltet)	1 liter
Difco Bacto Soluble Starch (nr. 0178)	2 g

Der blandes og steriliseres i autoklave ved 115°C i ti minutter.

Pladerne bestryges. Der podes punktuelt på pladerne.

Efter at der kan konstateres en god vækst (10 til 20 dage), fjernes en del af væksten, og der skylles med Lugol-jod.

Positiv reaktion: hydrolyse af stivelse markeres ved klare områder under eller rundt om bakterievæksten; resten af substratet farves purpur.

— **Aesculinhydrolase-aktivitet** (Sneath & Collins, 1974)

Substrat:

Difco Bacto Peptone	10 g
Aesculin	1 g
Jerncitrat (Merck 3862)	0,05 g
Natriumcitrat	1 g
Destilleret vand	1 liter

Der blandes for at opløse, og mængder på 6 ml fordeles i rør. Der steriliseres i autoklave ved 115°C i ti minutter.

Substratet er klart, men har en blålig fluorescens.

Positiv reaktion: hydrolyse af aesculin markeres ved udvikling af brun farve sammen med bortfald af flourescens. Dette kan konrtolleres ved anvendelse af en ultravioletlampe.

LITTERATURHENVISNINGER

Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213-218.

Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of Corynebacterium sepedonicum from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147-152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21-23.

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.

Janse, J. D. and Van Vaerenbergh, J. 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.

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

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

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.

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.

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.

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

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

BILAG II

1. Ved formodet forekomst, som er konstateret ved en immunofluorescens test efter metoden i bilag I, og som vil blive bekræftet eller afkræftet, når alle test efter den nævnte metode er afsluttet, foretages der tilbageholdelse og opbevaring af:

   — så vidt muligt alle udtagne knolde eller planter

   — eventuelt resterende ekstrakt og yderligere tilberedte immunofluorescensglas

   indtil alle test efter den nævnte metode er afsluttet.

2. Hvis skadegørerens tilstedeværelse bekræftes, foretages der tilbageholdelse og opbevaring af:

   — det i nr. 1 nævnte materiale, og

   — en konserveret prøve af det inficerede ægplantemateriale, der er podet med knolden eller planteekstrakten, og

   — den isolerede kultur af skadegøreren

   i mindst en måned efter meddelelsesproceduren som omhandlet i artikel 5, stk.2.

BILAG III

1. Følgende elementer tages i betragtning ved bestemmelsen af omfanget af en sandsynlig infektion som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra b):

   — knolde eller planter, der er dyrket på et produktionssted, som er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a)

   — et eller flere produktionssteder eller steder med en vis produktionsmæssig tilknytning til de knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), herunder dem, der deler produktionsudstyr og -faciliteter direkte eller ved en maskinstation

   — knolde eller planter, der er produceret på produktionssteder som omhandlet i foregående led, eller som befandt sig på sådanne produktionssteder i den periode, hvor de knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), befandt sig på sådanne steder eller produktionssteder, som omhandlet i første led

   — kartoffeloplagringssteder, der håndterer kartofler fra ovennævnte produktionssteder

   — maskiner, køretøjer, fartøjer, lagre eller enheder deraf og alle andre genstande, herunder emballage, der kan have været i kontakt med knolde eller planter, som er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), i løbet af de forudgående tolv måneder, eller når det er hensigtsmæssigt

   — knolde eller planter, der har været opbevaret i eller været i kontakt med nogen af de anlæg eller genstande, som er anført i foregående led, inden disse anlæg og genstande blev rengjort og desinficeret; og

   — som resultat af undersøgelserne i henhold til artikel 6, knolde eller planter med samme klonale oprindelse som knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), og med hensyn til hvilke undersøgelser viser, at de sandsynligvis er inficeret.

2. Følgende elementer tages i betragtning ved bestemmelsen af den mulige udbredelse som omhandlet i artikel 5, stk. 1, litra c):

   — nærheden af andre produktionssteder, hvor der dyrkes kartofler eller andre værtsplanter

   — de fælles træk ved de pågældende læggekartofler.

3. Oplysningerne i den meddelelse, der er omhandlet i artikel 5, stk. 2, første afsnit, omfatter:

   — for kartoffelsendinger eller -partier, der er erklæret for inficeret: de certifikater, som er omhandlet i artikel 7 eller 8 i direktiv 77/93/EØF, og henholdsvis pas- eller registreringsnummer

   — sortsnavn for læggekartoflers vedkommende og så vidt muligt i alle andre tilfælde

   — en detaljeret beskrivelse af den erklærede infektion og det afgrænsede område

   — forhåndenværende ekstrakt, tilberedte immunofluorescensglas, inficeret ægplantemateriale og isoleret kultur af skadegøreren fra den test, hvorved skadegørerens tilstedeværelse blev bekræftet.

BILAG IV

1. Foranstaltningerne under officielt tilsyn som omhandlet i artikel 7, stk. 1, til bortskaffelse af knolde eller planter, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), omfatter:

   — anvendelse til industriel forarbejdning ved direkte og øjeblikkelig levering til en forarbejdningsvirksomhed med hensigtsmæssige faciliteter til bortskaffelse af affald, for hvilke det er fastslået, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig, og mindst med faciliteter til desinfektion af lagerområder og afgående køretøjer, eller

   — andre foranstaltninger under forudsætning af, at det er fastslået, at der ikke er nogen åbenbar risikó for, at skadegøreren breder sig; disse foranstaltninger skal meddeles Kommissionen og de øvrige medlemsstater.

2. Passende anvendelse eller bortskaffelse under tilsyn af medlemsstaternes officielle ansvarlige organer af knolde eller planter, som er erklæret for sandsynligvis inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra b), og som omhandlet i artikel 7, stk. 2, er:

   — anvendelse som spisekartofler, færdigpakket til direkte levering og anvendelse uden ompakning, og bestemt til direkte levering og anvendelse, eller

   — anvendelse som industrikartofler og bestemt til direkte og øjeblikkelig levering til en forarbejdningsvirksomhed med hensigtsmæssige faciliteter til bortskaffelse af affald og desinfektion, eller

   — anden anvendelse eller bortskaffelse under forudsætning af, at det fastslås, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig.

3. De passende metoder til rengøring og desinfektion af de genstande, der omhandles i artikel 7, stk. 3, er dem, for hvilke det er fastslået, at der ikke er nogen åbenbar risiko for, at skadegøreren breder sig, og at de anvendes under tilsyn af medlemsstaternes myndigheder.

4. Den række foranstaltninger, der skal træffes af medlemsstaterne i det afgrænsede område, jf. artikel 5, stk. 1, litra c), og artikel 7, stk. 4, omfatter følgende:

4.1. For produktionssteder, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), gælder følgende:

a) på marker, der er erklæret for inficeret, jf. artikel 5, stk. 1, litra a):

   i) — i mindst de første tre vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om angreb
      — træffes der foranstaltninger til at udrydde gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren
      — må der ikke plantes/anvendes kartoffelknolde, -planter eller egentlige læggekartofler eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren eller planter, for hvilke det er fastslået, at der er en åbenbar risiko for, at skadegøreren overlever eller breder sig, før marken er fundet fri for gengroninger i mindst to på hinanden følgende vækstår

   — i den første vækstsæson efter den periode, der er omhandlet i det foregående led, må der kun anvendes officielt certificerede læggekartofler, som er bestemt til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler, og der skal foretages en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1

   — i vækstsæsonen efter den i det foregående led omhandlede sæson skal der efter en passende rotationscyklus anvendes officielt certificerede læggekartofler til produktion af læggekartofler eller andre kartofler, og der skal foretages en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1, eller

   ii) — i de første fire vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion
      — træffes der foranstaltninger til at udrydde gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, og
      — braklægges marken og bevares som brakmark eller omdannes til og bevares som permanent græsareal med hyppig tæt klipning eller intensiv græsning

   — i den første vækstsæson efter den periode, der er omhandlet i det foregående led, skal der anvendes officielt certificerede læggekartofler til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler, og der skal foretages en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1

b) andre marker:

— i det første vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion

— må der enten ikke plantes/anvendes kartoffelknolde, -planter eller egentlige læggekartofler eller andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, og der skal træffes foranstaltninger til at udrydde gengroninger, eller

— må der kun anvendes officielt certificerede læggekartofler, der er bestemt til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler, hvis de officielle ansvarlige organer har forvisset sig om, at risikoen for gengroninger og andre naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren er fjernet

— i mindst de første to vækstår efter det vækstår, der er omhandlet i det foregående led, må der kun anvendes officielt certificerede læggekartofler, der er bestemt til produktion af enten læggekartofler eller andre kartofler

— i hvert af de vækstår, der er omhandlet i de foregående led, skal der træffes foranstaltninger til at udrydde gengroninger og naturligt forekommende værtsplanter for skadegøreren, og der skal foretages en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1

— hvis der anvendes officielt certificerede læggekartofler, der er bestemt til produktion af spise-, foder- eller industrikartofler, i det første vækstår efter det vækstår, hvori der blev afgivet erklæring om infektion, skal kartofler i vækst kontrolleres på passende tidspunkter, og gengroninger skal undersøges for skadegøreren

c) umiddelbart efter erklæringen om infektion, jf. artikel 5, stk. 1, litra a), og i hver af de følgende vækstår til og med den første tilladte vækstsæson på den eller de marker, der er erklæret for inficeret, som omhandlet i litra a), skal alle maskiner og lagerfaciliteter på produktionsstedet, der benyttes i kartoffelproduktionen, efter omstændighederne rengøres eller desinficeres ved hjælp af passende metoder, jf. nr. 3

d) i de produktionssystemer, hvor det er muligt helt at udskifte vækstmediet:

— må der ikke plantes/anvendes knolde, planter eller egentlige læggekartofler, medmindre produktionsenheden er underkastet foranstaltninger under officielt tilsyn til at udrydde skadegøreren og fjerne alt kartoffelmateriale eller andet Solanacea-materiale, herunder mindst en fuldstændig udskiftning af vækstmedium og rengøring og desinfektion af produktionsenheden og alt udstyr, og de officielle ansvarlige organer derefter har godkendt, at der produceres kartofler, og

— skal kartoffelproduktionen foregå med officielt certificerede læggekartofler eller miniknolde eller mikroplanter, der hidrører fra testet materiale.

4.2. Inden for det afgrænsede område skal medlemsstaterne, uden at det berører foranstaltningerne i nr. 4.1:

a) omgående efter den erklærede infektion og i mindst tre vækstsæsoner herefter:

— sørge for, at deres officielle ansvarlige organer fører tilsyn med steder, hvor der dyrkes, opbevares og håndteres kartofler, samt med steder, hvor der i øvrigt anvendes kartoffelmaskineri

— om fornødent kræve rengøring og desinfektion af maskiner og lagre på sådanne steder ved hjælp af passende metoder som anført i nr. 3

— kræve, at der kun anvendes certificerede læggekartofler inden for området

— kræve, at alle høstede læggekartofler håndteres særskilt fra spise-, foder- eller industrikartofler overalt i området

— foretage en officiel undersøgelse som omhandlet i artikel 2, stk. 1

b) om fornødent opstille et program for udskiftning af alle læggekartofler i løbet af en passende periode.

De foranstaltninger, der iværksættes i henhold til nr. 4.2, og registreringsnumrene på producenter, fælleslagre og ekspeditionscentre i det afgrænsede område meddeles hvert år de øvrige medlemsstater og Kommissionen.