

**KOMISSION DIREKTIIVI 2006/63/EY,****annettu 14 päivänä heinäkuuta 2006,*****Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. -kasvintuhoojan torjunnasta annetun neuvoston direktiivin 98/57/EY liitteiden II–VII muuttamisesta**

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. -kasvintuhoojan torjunnasta 20 päivänä heinäkuuta 1998 annetun neuvoston direktiivin 98/57/EY<sup>(1)</sup> ja erityisesti sen 11 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Yksi merkittävistä perunalle ja tomaatille haitallisista organismeista on *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., perunan tumman rengasmädän sekä perunan ja tomaatin bakteerilakastumistaudin aiheuttaja (jäljempänä ”organismi”).
- (2) Tätä organismia esiintyy edelleen joissakin yhteisön osissa.
- (3) Direktiivissä 98/57/EY vahvistetaan yksityiskohtaiset toimenpiteet, joita jäsenvaltioissa on toteutettava tämän kasvintuhoojan osalta sen paikallistamiseksi ja sen leviämisen määrittämiseksi, sen esiintymisen ja leviämisen estämiseksi, ja jos tuhojaa löydetään, sen leviämisen estämiseksi ja torjumiseksi tarkoituksena hävittää se.
- (4) Tämän kasvintuhoojan biologian ja toteamis- ja tunnistamismenettelyjen tuntemus on huomattavasti lisääntynyt direktiivin antamisen jälkeen. Lisäksi kasvintuhoojan torjunnasta saatu käytännön kokemus vaatii useiden torjuntatoimenpiteisiin liittyvien teknisten säännösten tarkistamista.
- (5) Tällaisen kehityksen seurauksena näyttäisi olevan välttämätöntä tarkistaa ja päivittää direktiivin 98/57/EY tiettyihin liitteisiin sisältyvät toimenpiteet.
- (6) Havaitsemis- ja tunnistamismenettelyjen osalta mukaan otetaan FISH-menetelmä (fluoresoiva in situ -hybridisaatio), joka on vastikään kehitetty toteamismenetelmä. Mukaan on otettu myös PCR-menetelmään

(polymeraasiketjureaktio) sekä nykyisten toteamis- ja tunnistamismenettelyiden lukuisiin eri teknisiin elementteihin tehdyt parannukset samoin kuin menetelmät organismin havaitsemiseksi ja tunnistamiseksi muissa isäntäkasveissa kuin perunassa sekä vedessä ja maaperässä.

- (7) Torjuntatoimenpiteiden teknisiä elementtejä on parannettu seuraavilta osin: testinäytteiden säilyttämistapa kasvintuhoojan jäljittämisen varmistamiseksi, todennäköisen saastumisen laajuuden määrittämiseksi tarvittavat elementit, kasvintuhoojan varmistetun esiintymisen ja saastuneiden alueiden ilmoittamista koskevat tiedot sekä saastuneiksi ilmoitetuilla tuotantopaikoilla ja rajoitetuilla alueilla toteutettavat toimenpiteet. Lisäksi mukaan on otettu joitakin tomaattia koskevia säännöksiä, jotta voitaisiin paremmin ottaa huomioon tämän kasvin merkitys kasvintuhoojan isäntänä.
- (8) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat pysyvän kasvinsuojelukomitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

**1 artikla**

Korvataan direktiivin 98/57/EY liitteet II–VII tämän direktiivin liitteessä olevilla vastaavilla teksteillä.

**2 artikla**

1. Jäsenvaltioiden on annettava ja julkaistava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset viimeistään 31 päivänä maaliskuuta 2007. Niiden on toimitettava komissiolle kirjallisina nämä säännökset sekä kyseisiä säännöksiä ja tätä direktiiviä koskeva vastaavuustaulukko viipymättä.

Jäsenvaltioiden on sovellettava näitä säädöksiä 1 päivästä huhtikuuta 2007.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säännöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

<sup>(1)</sup> EYVL L 235, 21.8.1998, s. 1.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava tässä direktiivissä tarkoitettuihin kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset viipymättä kirjallisina komissiolle.

*3 artikla*

Tämä direktiivi tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

*4 artikla*

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 14 päivänä heinäkuuta 2006.

*Komission puolesta*  
Markos KYPRIANOU  
*Komission jäsen*

## LIITE

## "LIITE II

**TUTKIMUSMENETELMÄ *RALSTONIA SOLANACEARUM* (SMITH) YABUUCHI ET AL. -KASVINTUHOOJAN  
MÄÄRITTÄMISEKSI, TOTEAMISEKSI JA TUNNISTAMISEKSI**

TUTKIMUSMENETELMÄN SOVELTAMISALA

Esitetty menetelmä kuvaa eri menettelyjä, jotka koskevat:

- i) tumman rengasmädän määritystä perunan mukuloista ja bakteerilakastumistaudin määritystä perunasta ja tomaatista ja eräistä muista isäntäkasveista;
- ii) *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoojan toteamista perunan mukuloista, perunoista, tomaateista ja muista isäntäkasveista, vedestä ja maaperästä otetuista näytteistä;
- iii) *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) -kasvintuhoojan tunnistamista.

SISÄLTÖ

	Sivu
	Yleiset periaatteet .....
	40
I JAKSO:	Tutkimusmenetelmän soveltaminen .....
	40
	1. Toteamismenetelmä tumman rengasmädän ja bakteerilakastumistaudin ( <i>R. solanacearum</i> ) määrittämiseksi perunan mukuloista ja perunasta, tomaatista tai muusta isäntäkasvista, jossa on tumman rengasmädän tai bakteerilakastumistaudin oireita .....
	40
	2. Menetelmä <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista mukulanäytteistä .....
	43
	3. Menetelmä <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista perunoista, tomaateista tai muista isäntäkasveista. ....
	46
II JAKSO:	Yksityiskohtaiset menetelmät <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi perunan mukuloista ja perunasta, tomaatista tai muusta isäntäkasvista, jossa on tumman rengasmädän tai bakteerilakastumistaudin oireita .....
	48
	1. Oireet .....
	48
	2. Pikaseulontatestit .....
	48
	3. Eristämismenettely .....
	49
	4. <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan tunnistustestit .....
	49
III JAKSO:	1. Yksityiskohtaiset menetelmät <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista mukulanäytteistä .....
	49
	1.1 Näytteiden valmistelu .....
	49
	1.2 Testaus .....
	51
	2. Yksityiskohtaiset menetelmät <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista perunoista, tomaateista tai muista kasveista. ....
	51
	2.1 Näytteiden valmistelu .....
	51
	2.2 Testaus .....
	52
IV JAKSO:	1. Menetelmä <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi vedestä .....
	53
	2. Menetelmät <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi vedestä .....
	55
	2.1 Näytteiden valmistelu .....
	55
	2.2 Testaus .....
	55
V JAKSO:	1. Menetelmä <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi maaperästä
	56
	2. Menetelmät <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi maaperästä
	58
	2.1 Näytteen valmistus .....
	58
	2.2 Testaus .....
	58

	Sivu
VI JAKSO: Optimoidut protokollat <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi .....	58
A) Määrittämis- ja toteamistestit .....	58
1. Valutuskoe .....	58
2. Poly- $\beta$ -hydroksibutyraattirakeiden (PHB) toteaminen .....	58
3. Serologiset agglutinaatiokokeet .....	59
4. Eristäminen selektiivisellä alustalla .....	60
4.1 Valikoiva maljaus .....	60
4.2 Rikastusmenettely .....	60
5. Immunofluoresenssitesti (IF-testi) .....	61
6. Polymeerasiketjureaktiotesti (PCR-testi) .....	64
6.1 DNA:n puhdistusmenetelmät .....	65
a) Pstrikin menetelmä (2000) .....	65
b) Muut menetelmät .....	65
6.2 PCR-testi .....	66
6.3 PCR-tuotteen määrittäminen .....	66
7. Fluoresoiva in situ -hybridisaatio (FISH-testi) .....	67
8. Entsyymi-immunologinen määrittäminen (ELISA-testi) .....	69
a) Epäsuora ELISA-testi .....	69
b) DASI (Double-Antibody Sandwich Indirect) ELISA .....	70
9. Biologinen määrittäminen .....	71
B) Tunnistustestit .....	72
1. Ravintokokeet ja entsyymaattiset tunnistustestit .....	72
2. IF-testi .....	72
3. ELISA-testi .....	73
4. PCR-testi .....	73
5. FISH-testi .....	73
6. Rasvahappoprofilointi (FAP) .....	73
7. Kantojen määrittämismenetelmät .....	73
7.1 Biovarin määrittäminen .....	73
7.2 Genomien sormenjäljet .....	74
7.3 PCR-menetelmät .....	74
C) Varmistustesti .....	74
Lisäys 1 Optimointi- ja validointimenettelyissä mukana olevat laboratoriot .....	76
Lisäys 2 Ravintoalusta <i>R. solanacearum</i> -kasvintuhoojan eristämistä ja viljelyä varten .....	77
Lisäys 3 A) Kaupallisesti saatavilla olevat standardoidut kontrollimateriaalit .....	79
B) Kontrollien valmistaminen .....	80
Lisäys 4 Puskuriliuokset testimenettelyihin .....	82
Lisäys 5 Kontaminaatioasteen määrittäminen IF- ja FISH-testeillä .....	85
Lisäys 6 Validoidut PCR-menetelyt ja reagenssit .....	86
Lisäys 7 Validoidut reagenssit FISH-testiä varten .....	91
Lisäys 8 Tomaatin ja munakoison viljelyolosuhteet .....	93
Viitteet .....	94

## YLEISET PERIAATTEET

Lisäyksissä esitetään optimaaliset testausprotokollat eri menetelmien ja validoitujen reagenssien osalta sekä testi- ja kontrollimateriaalien valmistusta koskevat tiedot. Lisäyksessä 1 on luettelo niistä laboratorioista, jotka olivat mukana testausprotokollien optimoinnissa ja validoinnissa.

Koska menettelyt liittyvät karanteenin alaisten organismien toteamiseen ja niissä käytetään *R. solanacearum* -kasvintuhoajan elinkykyisiä viljelmiä kontrollimateriaaleina, menettelyt on ehdottomasti toteutettava sopivissa karanteenioloissa siten, että käytössä on riittävät jätteenhävitysmahdollisuudet ja toiminta tapahtuu kasvkaranteenista vastaavien viranomaisten myöntämän luvan mukaisissa olosuhteissa.

Testausparametreilla on varmistettava *R. solanacearum* -kasvintuhoajan määrien johdonmukainen ja toistettavissa oleva toteaminen valituilla menetelmillä asetetuilla kynnysarvoilla.

Positiivisten kontrollinäytteiden huolellinen valmistaminen on ehdottoman tärkeää.

Vaadittujen kynnysarvojen mukainen testaus edellyttää myös laitteiden asianmukaisia asetuksia sekä niiden asianmukaista huoltoa ja vakaamista, reagenssien huolellista käsittelyä ja säilyttämistä sekä kaikkien sellaisten toimenpiteiden toteuttamista, joilla ehkäistään näytteiden välinen kontaminaatio, esim. positiivisten kontrollinäytteiden pitämistä erillään testinäytteistä. Laadunvalvontastandardeja on sovellettava hallinnollisten ja muiden virheiden välttämiseksi, erityisesti pakkausmerkintöjen ja dokumentaation osalta.

Direktiivin 98/57/EY 4 artiklan 2 kohdassa tarkoitettu epäilty esiintyminen tarkoittaa positiivista tulosta näytteelle jäljempänä olevissa vuokaavioissa esitetyissä määritys- tai seulontatesteissä. Jos ensimmäisen seulontatestin (IF- tai PCR/FISH-testi, selektiivinen eristäminen) tulos on positiivinen, se on vahvistettava toisella seulontatestillä, joka perustuu muihin biologisiin periaatteisiin.

Jos ensimmäisestä seulontatestistä saadaan positiivinen tulos, näytteen epäillään olevan bakteerin saastuttama ja sille on tehtävä toinen seulontatesti. Jos toisesta seulontatestistä saadaan positiivinen tulos, epäily varmistuu (epäilty esiintyminen) ja tutkimusmenetelmän mukaista testausta on jatkettava. Jos toisesta seulontatestistä saadaan negatiivinen tulos, näytteen katsotaan olevan puhdas *R. solanacearum* -bakteerista.

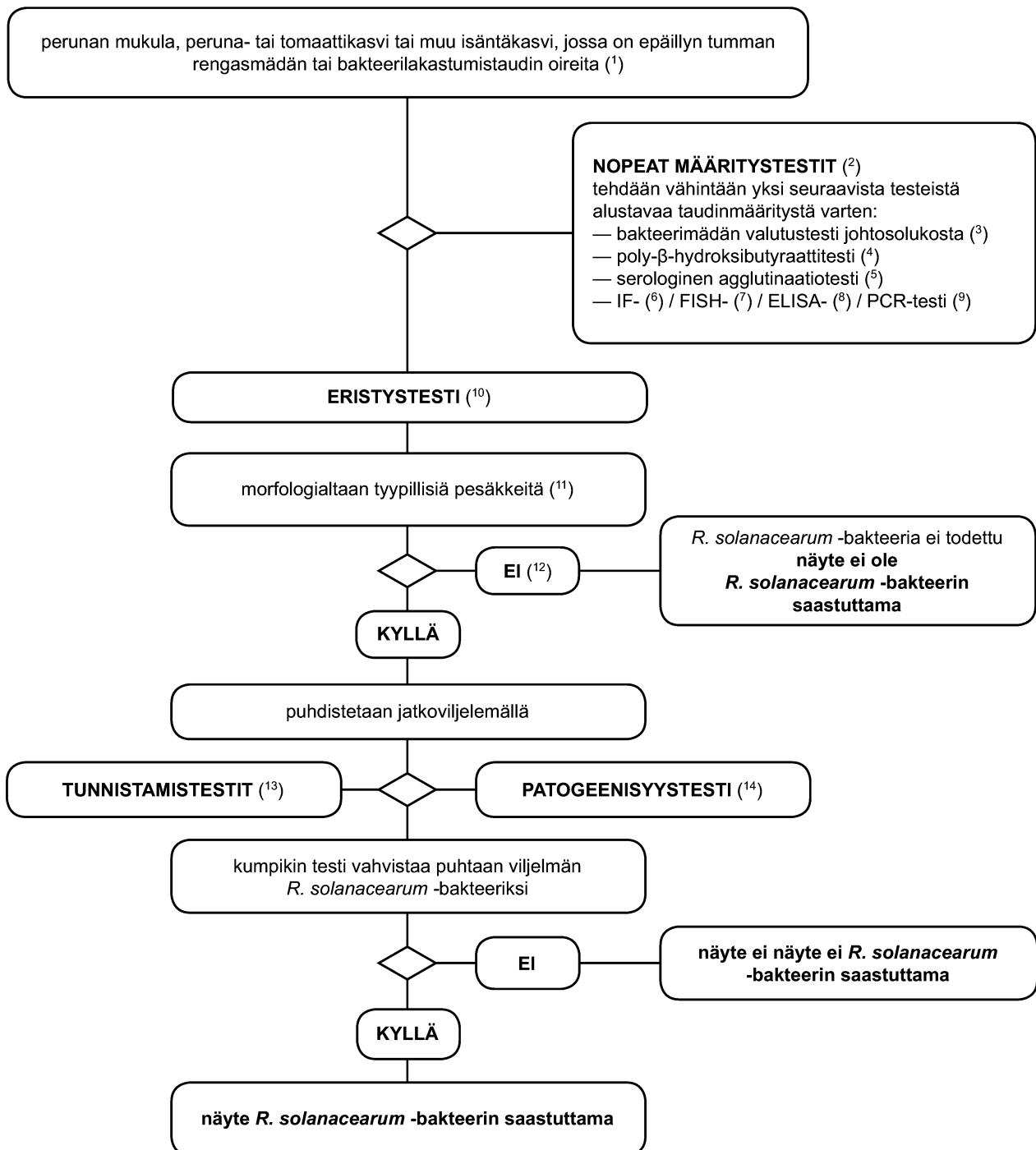
Direktiivin 98/57/EY 5 artiklan 1 kohdassa tarkoitettu varmistettu esiintyminen tarkoittaa puhtaan *R. solanacearum* -viljelmän eristämistä ja tunnistamista siten, että sen patogeenisuus on varmistettu.

## I JAKSO

## TUTKIMUSMENETELMÄN SOVELTAMINEN

1. **Toteamismenetelmä tumman rengasmädän ja bakteerilakastumistaudin (*Ralstonia solanacearum*) määrittämiseksi perunan mukuloista ja perunasta, tomaatista tai muusta isäntäkasvista, jossa on tumman rengasmädän tai bakteerilakastumistaudin oireita**

Testimenetelmä on tarkoitettu perunan mukuloille, joiden oireet ovat tyypillisiä tummalle rengasmädälle tai johtosolukon lakastumistaudille taikka antavat aiheita epäillä näitä tauteja. Siihen kuuluu pikaseulontatesti, taudinaiheuttajan eristäminen infektoituneesta johtosolukosta (selektiiviselle) alustalle ja, jos tulos on positiivinen, viljelmän tunnistaminen *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajaksi.



- (<sup>1</sup>) Oireiden kuvaukset, ks. II jakson 1 kohta.
- (<sup>2</sup>) Nopeat määrittystestit helpottavat alustavaa taudinmäärittystä, mutta ne eivät ole välttämättömiä. Negatiivinen tulos ei aina takaa sitä, että patogeeniä ei esiinny.
- (<sup>3</sup>) Johtosolukon valutustesti bakteerimätää varten kuvataan VI jakson A kohdan 1 alakohdassa.
- (<sup>4</sup>) Testi poly- $\beta$ -hydroksibutyraattirakeille (<sup>PHB</sup>) bakteerisoluiissa kuvataan VI jakson A kohdan 2 alakohdassa.
- (<sup>5</sup>) Bakteerimädän tai oireilevasta kudoksesta saatujen uutteen serologiset agglutinaatiotestit kuvataan VI jakson A kohdan 3 alakohdassa.
- (<sup>6</sup>) Veteen suspendoidun bakteerimädän tai oireilevasta kudoksesta saatujen uutteen IF-testit kuvataan VI jakson A kohdan 5 alakohdassa.
- (<sup>7</sup>) Veteen suspendoidun bakteerimädän tai oireilevasta kudoksesta saatujen uutteen FISH-testit kuvataan VI jakson A kohdan 7 alakohdassa.
- (<sup>8</sup>) Veteen suspendoidun bakteerimädän tai oireilevasta kudoksesta saatujen uutteen ELISA-testit kuvataan VI jakson A kohdan 8 alakohdassa.
- (<sup>9</sup>) Veteen suspendoidun bakteerimädän tai oireilevasta kudoksesta saatujen uutteen PCR-testit kuvataan VI jakson A kohdan 6 alakohdassa.
- (<sup>10</sup>) Patogeeni voidaan yleensä eristää helposti oireilevasta kasviaineistosta laimennussarjatekniikalla (II jakson 3 kohta).
- (<sup>11</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu II jakson 3 kohdan d alakohdassa.
- (<sup>12</sup>) Viljely voi epäonnistua, jos tartunta on edennyt pitkälle, sillä saprofyttiset bakteerit voivat kilpailla taudinaiheuttajan kanssa tai ohittaa sen kasvussa. Jos eristyskokeen tulos on negatiivinen mutta taudin oireet tyypilliset, eristäminen on toistettava mieluiten selektiivisellä alustalla.
- (<sup>13</sup>) Oletetun *R. solanacearum* -kasvintuhoojan isolaattien puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu VI jakson B kohdassa kuvattujen testien avulla. Eristetyn kannan määrittäminen on vapaaehtoista, mutta sitä suositellaan kaikissa uusissa tapauksissa.
- (<sup>14</sup>) Patogeenisyystesti kuvataan VI jakson C kohdassa.

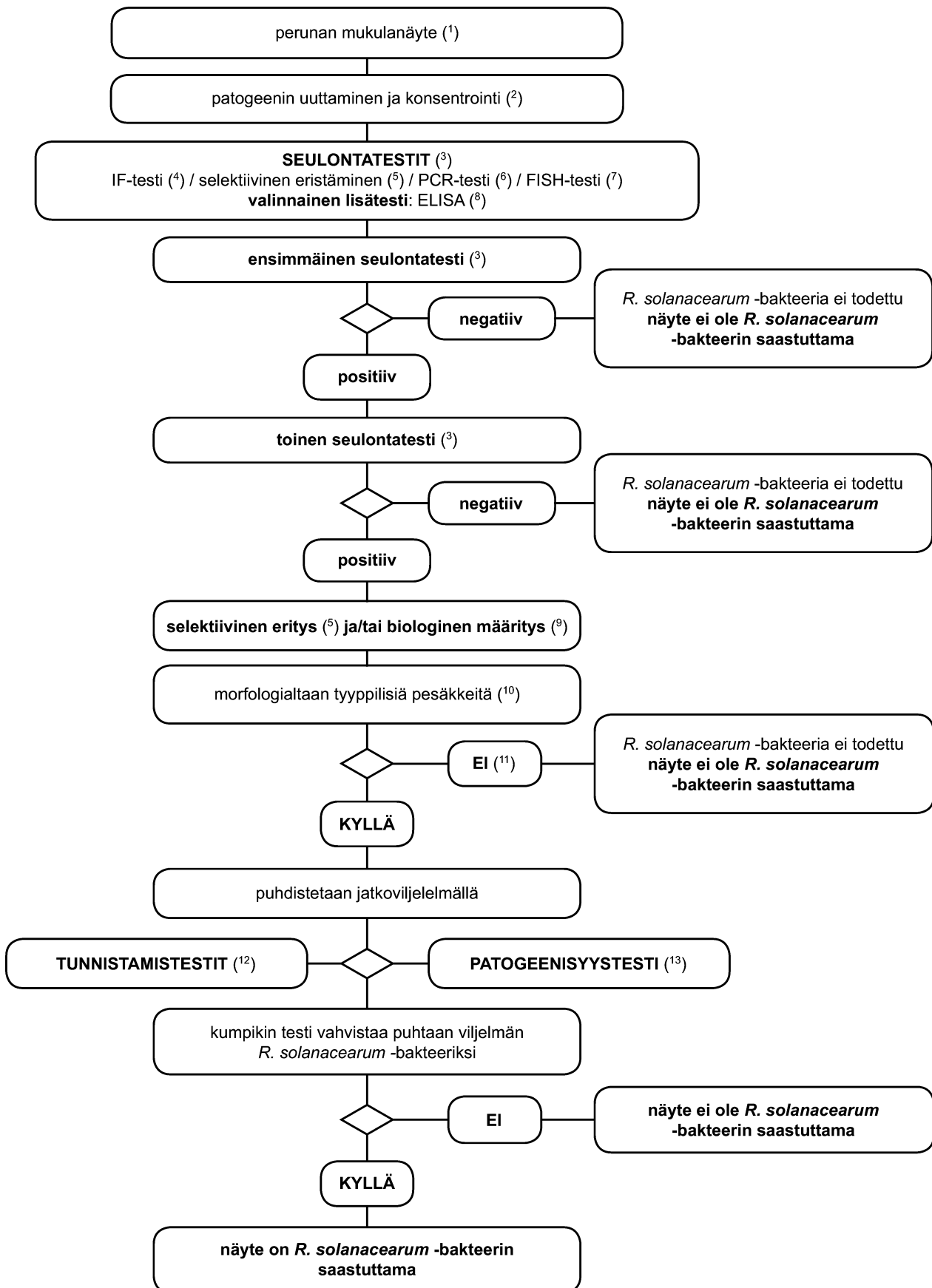
2. **Menetelmä *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista mukulanäytteistä**

*Periaate*

Menettely on tarkoitettu piilevien tartuntojen toteamiseen perunan mukuloissa. Jos erilaisiin biologisiin periaatteisiin perustuvista vähintään kahdesta seulontakokeesta saadaan positiivinen tutkimustulos, <sup>3</sup> sitä täydennetään eristämällä taudinaiheuttaja. Jos eristyskokeen tuloksena saadaan tyypillisiä pesäkkeitä, vuorossa on puhtaan viljelmän varmistaminen *R. solanacearum* -kasvintuhoojaksi. Positiivinen tulos ainoastaan yhdestä seulontatestistä ei riitä pitämään näyttöä epäilyttävänä.

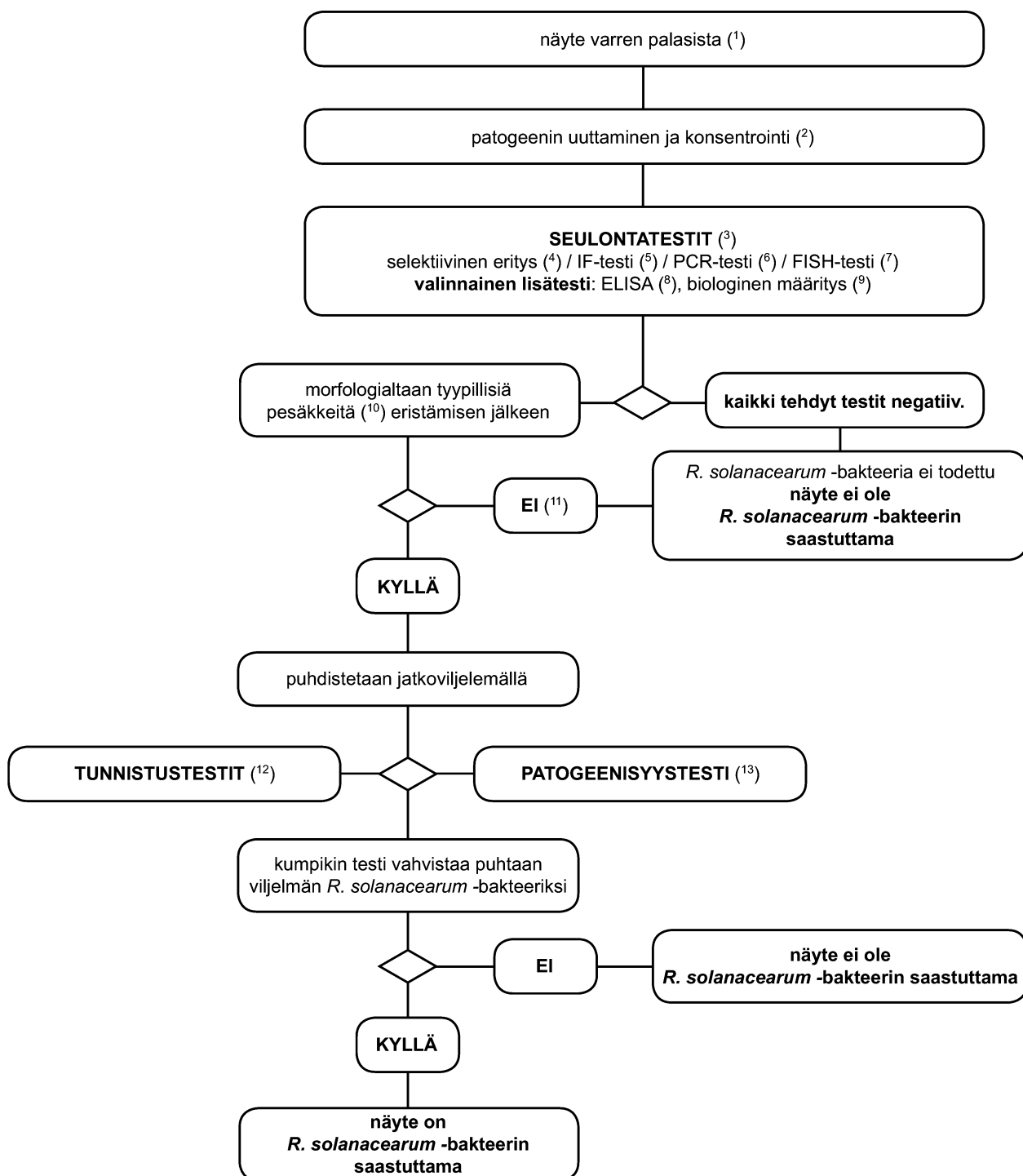
Seulonta- ja eristystesteillä on saatava toteamisrajaksi  $10^3$ – $10^4$  solua perunauutteen yhtä millilitraa kohden; ne sisältävät positiivisina kontrollivälineinä kuhunkin testisarjaan.





- (<sup>1</sup>) Standardi näytekoko on 200 mukulaa. Menetelmä soveltuu käytettäväksi myös alle 200 mukulan näytteille, jos 200:aa mukulaa ei ole käytettävissä.
- (<sup>2</sup>) Taudinaiheuttajan uuttamis- ja konsentrointimenetelmät kuvataan III jakson 1.1 kohdassa.
- (<sup>3</sup>) Jos vähintään kahdesta erilaisiin biologisiin periaatteisiin pohjautuvasta testistä saadaan positiivinen tulos, eristäminen ja varmistaminen on tehtävä. Tehdään vähintään yksi seulontatesti. Jos tästä testistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Jos testitulokset on positiivinen, on tehtävä toinen tai useampia seulontatestejä eri biologisten periaatteiden pohjalta, jotta ensimmäinen positiivinen tulos voidaan vahvistaa. Jos toisesta testistä tai muista testeistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Tällöin ei tarvita lisätestejä.
- (<sup>4</sup>) IF-testi kuvataan VI jakson A kohdan 5 alakohdassa.
- (<sup>5</sup>) Eristäminen selektiivisellä alustalla kuvataan VI jakson A kohdan 4 alakohdassa.
- (<sup>6</sup>) PCR-testit kuvataan VI jakson A kohdan 6 alakohdassa.
- (<sup>7</sup>) FISH-testi kuvataan VI jakson A kohdan 7 alakohdassa.
- (<sup>8</sup>) ELISA-testit kuvataan VI jakson A kohdan 8 alakohdassa.
- (<sup>9</sup>) Biologinen määrittely kuvataan VI jakson A kohdan 9 alakohdassa.
- (<sup>10</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu II jakson 3 kohdan d alakohdassa.
- (<sup>11</sup>) Viljelystestit tai biologiset määrittelyt saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos seulontatesteistä saadaan selkeästi positiiviset mutta eristystesteistä negatiiviset tulokset, toistetaan eristystestit samasta sakasta tai otetaan lisää johtosolukkoa samaan näytteeseen kuuluvien halkaistujen mukuloiden napapään läheltä ja testataan tarvittaessa lisänäytteitä.
- (<sup>12</sup>) Oletetun *R. solanacearum* -kasvintuhoojan isolaattien puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu VI jakson B kohdassa kuvattujen testien avulla.
- (<sup>13</sup>) Patogeenisyydesti kuvataan VI jakson C kohdassa.

3. Menetelmä *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoajan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista perunoista, tomaateista tai muista isäntäkasveista



- (<sup>1</sup>) Ks. III jakson 2.1 kohdasta suositellut näytekoot.
- (<sup>2</sup>) Taudinaiheuttajan uuttamis- ja konsentrointimenetelmät kuvataan III jakson 2.1 kohdassa.
- (<sup>3</sup>) Jos vähintään kahdesta erilaisiin biologisiin periaatteisiin pohjautuvasta testistä saadaan positiivinen tulos, eristäminen ja varmistaminen on tehtävä. Tehdään vähintään yksi seulontatesti. Jos tästä testistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Jos testitulokset on positiivinen, on tehtävä toinen tai useampia seulontatestejä eri biologisten periaatteiden pohjalta, jotta ensimmäinen positiivinen tulos voidaan vahvistaa. Jos toisesta testistä tai muista testeistä saadaan negatiivinen tulos, näytettä pidetään negatiivisena. Tällöin ei tarvita lisätestejä.
- (<sup>4</sup>) Eristäminen selektiivisellä alustalla kuvataan VI jakson A kohdan 4 alakohdassa.
- (<sup>5</sup>) IF-testi kuvataan VI jakson A kohdan 5 alakohdassa.
- (<sup>6</sup>) PCR-testit kuvataan VI jakson A kohdan 6 alakohdassa.
- (<sup>7</sup>) FISH-testi kuvataan VI jakson A kohdan 7 alakohdassa.
- (<sup>8</sup>) ELISA-testit kuvataan VI jakson A kohdan 8 alakohdassa.
- (<sup>9</sup>) Biologinen määrittäminen kuvataan VI jakson A kohdan 9 alakohdassa.
- (<sup>10</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu II jakson 3 kohdan d alakohdassa.
- (<sup>11</sup>) Viljelytestit tai biologiset määritykset saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos seulontatesteissa saadaan positiiviset mutta eristystesteistä negatiiviset tulokset, eristystestit toistetaan.
- (<sup>12</sup>) Oletetun *R. solanacearum* -kasvintuhoojan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu VI jakson B kohdassa kuvattujen testien avulla.
- (<sup>13</sup>) Patogeenisyystesti kuvataan VI jakson C kohdassa.

## II JAKSO

**YKSITYISKOHTAISET MENETELMÄT RALSTONIA SOLANACEARUM -KASVINTUHOON TOTEAMISEKSI PERUNAN MUKULOISTA JA PERUNASTA, TOMAATISTA TAI MUUSTA ISÄNTÄKASVISTA, JOSSA ON TUMMAN RENGASMÄDÄN TAI BAKTEERILAKASTUMISTAUDIN OIREITA**

1. **Oireet** (ks. [www-sivusto osoitteessa: http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main))

1.1 Oireet perunassa

*Perunakasvi.* Tartunnan varhaisvaihe pellolla voidaan tunnistaa lehdistä, jotka nuutuvat kasvin tyvestä alkaen päivällä lämpimällä säällä ja toipuvat yöllä. Nuutumisen alkuvaiheessa lehdet pysyvät vihreinä, mutta myöhemmin ne kellastuvat ja niihin kehittyy ruskea nekroosi. Myös epinastiaa esiintyy. Yhden verson tai koko kasvin nuutuminen jää nopeasti pysyväksi ja johtaa kasvin kollapsiin ja kuolemaan. Nuutuneiden kasvien varsien johtosolukko muuttuu poikkileikkauksesta tarkasteltuna tavallisesti ruskeaksi, ja maitomaista bakteerimätää valuu leikatulta pinnalta tai sitä voidaan pusertaa ulos. Kun leikattu varsi asetetaan veteen, johtosolukkimpuista valuu limaa.

*Perunan mukula.* Perunan mukulat leikataan halki maavarren kiinnityskohdan läheltä tai poikkisuuntaan kiinnityskohdan yli. Tartunnan varhaisvaihe ilmenee lasimaisena, keltaisesta vaaleanruskeaan vaihtelevana värityksenä johtosolukorenkaassa, josta muutaman minuutin kuluttua pursuaa itsestään vaaleankeltaista bakteerimätää. Myöhemmin johtojänteiden väritys muuttuu selvemmin ruskeaksi ja nekroosi voi laajeta tylppysolukkoon. Myöhemmässä vaiheessa tartunta leviää maavarren kiinnityskohdasta ja mukulan silmistä, ja näistä vuotaa bakteerimätää, johon kiinnittyy maahiukkasia. Kuoreen voi tulla punaruskeita hieman painuneita vioittumia, kun sisäiset johtosolukot painuvat kasaan. Taudin myöhemmissä vaiheissa esiintyy yleisesti sekundaarista sieni- ja bakteerimätää.

1.2 Oireet tomaatissa

*Tomaattikasvi.* Ensimmäinen näkyvä oire on nuorimpien lehtien velttous. Taudinaiheuttajalle suotuisissa ympäristöolosuhteissa (maaperän lämpötila noin 25 °C, kyllästyskosteus) on seurauksena muutaman päivän kuluessa epinastia ja kasvin yhden puolen tai koko kasvin nuutuminen, mikä johtaa koko kasvin kollapsiin. Vähemmän suotuisissa olosuhteissa (maaperän lämpötila alle 21 °C) nuutumista esiintyy vähemmän, mutta varteen saattaa kehittyä suuri määrä versojuuria. Varressa voidaan havaita varren alaosaan lähteviä vettyneitä juovia, jotka ovat osoitus johtojärjestelmän nekroosista. Jos varsi leikataan poikkitaissuunnassa, varren värityneistä ruskeista johtosolukoista tihkuu valkoista tai kellertävää bakteerimätää.

1.3 Oireet muissa isäntäkasveissa

*Solanum dulcamara- ja S. nigrum -kasvit.* Luonnonoloissa nuutumista esiintyy äärimmäisen harvoin näissä isäntinä toimivissa rikkakasveissa, ellei maaperän lämpötila ylitä 25 °C tai elleivät inokulaattitasot ole äärimmäisen korkeita (esim. *S. nigrum*, joka kasvaa saastuneiden peruna- tai tomaattikasvien vierellä). Jos nuutumista esiintyy, oireet vastaavat tomaatin yhteydessä kuvattuja oireita. Nuutumattomissa *S. dulcamara* -kasveissa, joiden varret ja juuret kasvavat vedessä, voi ilmetä johtosolukon sisäistä vaaleanruskeaa värinmuutosta varren alaosaan tai varren vedenalaisen osan poikkileikkauksessa. Vaikka nuutumisoireita ei olisikaan, bakteereja voi tihkua johtosolukosta tai ne voivat muodostaa limanauhoja, jos leikattu varsi asetetaan pystysuoraan veteen.

2. **Pikaseulontatestit**

Pikaseulontatestit helpottavat alustavaa taudinmääritystä, mutta ne eivät ole välttämättömiä. Käytetään yhtä tai useampaa seuraavista validoiduista testeistä:

2.1 Valutuskoet

(Ks. VI jakson A kohdan 1 alakohta)

2.2 Poly- $\beta$ -hydroksibutyraattirakeiden (PHB) toteaminen

Tyypilliset PHB-rakeet *R. solanacearum* -bakteerin soluissa saadaan näkyviin värjäämällä saastuneesta solukosta otetusta bakteerimädästä lämpökäsittelyllä kiinnitetty preparaatit niilinsinisellä A tai sudaninmustalla (ks. VI jakson A kohdan 2 alakohta).

### 2.3 Serologiset agglutinaatiokokeet

(Ks. VI jakson A kohdan 3 alakohta)

### 2.4 Muut testit

Muita soveltuvia pikaseulontatestejä ovat IF-testi (ks. VI jakson A kohdan 5 alakohta), FISH-testi (ks. VI jakson A kohdan 7 alakohta), ELISA-testit (ks. VI jakson A kohdan 8 alakohta) ja PCR-testit (ks. VI jakson A kohdan 6 alakohta).

## 3. Eristämismenettely

- a) Otetaan bakteerilimaa tai värittyneen solukon pala mukulan johtosolukkorenkaasta tai perunan tai tomaatin tai muun nuutuvan isäntäkasvin varren johtojänteistä. Suspendoidaan pieneen määrään steriiliä tislattua vettä tai 50 mM fosfaattipuskuriin (lisäys 4). Jätetään liuos 5–10 minuutiksi.
- b) Valmistetaan suspensiosta kymmenkertaisten laimennosten sarja.
- c) Siirretään 50–100 µl suspensiota ja laimennoksia tavalliselle ravintoalustalle (NA, YPGA tai SPA; ks. lisäys 2) ja/tai Kelmanin tetratsoliumalustalle (lisäys 2) ja/tai validoidulle selektiiviselle alustalle (esim. SMSA; ks. lisäys 2). Levitetään tai sivellään maljalle tarkoituksenmukaista laimennussarjatekniikkaa käyttäen. Tarvittaessa valmistetaan erillisiä maljoja, joissa on laimennettua *R. solanacearum* biovaria 2 -solususpensioviljelelmä positiivisena kontrollina.
- d) Inkuboidaan maljoja 2–6 päivän ajan 28 °C:ssa.
  - Tavallisella ravintoalustalla elinvoimaiset *R. solanacearum* -bakteerin isolaatit kehittyvät kermanvalkoisiksi, litteiksi, epäsäännöllisen muotoisiksi ja juokseviksi pesäkkeiksi, jotka ovat usein keskeltä tyypillisesti kierteisiä. Tautia aiheuttamattomat *R. solanacearum* -bakteerin muodot kehittävät pieniä, pyöreitä, voimaisia ja kokonaisuudessaan kermanvalkoisia pesäkkeitä, jotka eivät ole juoksevia.
  - Kelmanin tetratsolium- ja SMSA-alustalla kierteet ovat väriltään verenpunaisia. Tautia aiheuttamattomat *Ralstonia solanacearum* -bakteerin muodot kehittävät pieniä, pyöreitä, voimaisia ja kokonaisuudessaan syvänpunaisia pesäkkeitä, jotka eivät juoksevia.

## 4. *R. solanacearum* -kasvintuhoojan tunnistustestit

Testit, joilla vahvistetaan oletettujen *R. solanacearum* -isolaattien tunnistus, esitetään VI jakson B kohdassa.

### III JAKSO

## 1. Yksityiskohtaiset menetelmät *Ralstonia solanacearum* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista mukulanäytteistä

### 1.1 Näytteiden valmistelu

#### Huomautus:

- Standardinäytekoko on 200 mukulaa testiä kohden. Laajempi näytteenotto edellyttää useampia testejä tämänkokoisille näytteille. Jos näytteessä on enemmän kuin 200 mukulaa, tulokset saattavat jäädä saamatta tai niitä on vaikea tulkita. Menettelyä voidaan kuitenkin hyvin käyttää alle 200 mukulan näytteisiin, jos 200:aa mukulaa ei ole käytettävissä.
- Kaikkien jäljempänä kuvattujen toteamismenetelmien validointi perustuu 200 mukulan suuruisen näytteen testaamiseen.
- Jäljempänä kuvattua perunauutetta voidaan käyttää myös perunan vaaleaa rengasmätää aiheuttavan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* -bakteerin toteamiseen.

Näytteiden valmistamista edeltävät vapaavalintaiset esikäsittelyt:

- a) Inkuboidaan näytteitä 25–30 °C:ssa enintään 2 viikon ajan ennen testausta mahdollisten *R. solanacearum* -populaatioiden lisääntymisen helpottamiseksi.
- b) Pestään mukulat. Kunkin näytteen jälkeen käytetään tarkoituksenmukaisia desinfiointiaineita (tehtaässä PCR-testi on käytettävä klooriyhdisteitä patogeenisen DNA:n poistamiseksi) ja puhdistusaineita. Ilmakuivataan mukulat. Pesumenettelystä on erityistä hyötyä (vaikkakaan sitä ei vaadita), jos näytteissä on paljon ylimääräistä multaa ja jos PCR-testi tai suora eristysmenettely toteutetaan.

- 1.1.1 Poistetaan puhtaalla ja desinfioidulla leikkausveitsellä tai vihannesveitsellä kuori mukulan napapäästä siten, että johtosolukot tulevat näkyviin. Leikataan varovasti pieni kartionmuotoinen kappale johtosolukosta kunkin mukulan napapäästä ja yritetään pitää muun solukon kuin johtosolukon osuus mahdollisimman pienenä (ks. www-sivusto osoitteessa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>).

**Huomautus:** Laitetaan sivuun jokainen (pilaantunut) mukula, jossa on tummaksi rengasmädäksi epäiltyjä oireita, ja testataan yksittäin.

Jos napapään irrottamisen aikana havaitaan tummaksi rengasmädäksi epäiltyjä oireita, mukula olisi tutkittava silmämääräisesti ja lohkaistava läheltä napapäästä. Lohkaistuja mukuloita, joissa on epäilyttäviä oireita, olisi säilytettävä vähintään 2 vuorokautta huoneenlämmössä korkkiutumisen mahdollistamiseksi, minkä jälkeen mukula säilytetään jäädytettynä (4–10 °C:ssa) asianmukaisissa karanteenioloissa. Kaikki mukulat (myös ne, joissa on epäilyttäviä oireita) olisi säilytettävä liitteen III mukaisesti.

- 1.1.2 Kerätään napapääkappaleet käyttämättömiin kertakäyttöisiin säilytysastioihin, jotka voidaan sulkea ja/tai sinetöidä (jos astioita käytetään uudelleen, ne olisi puhdistettava perusteellisesti ja desinfioitava klooriyhdisteillä). Kappaleet olisi mieluiten käsiteltävä viipymättä. Jos tämä ei ole mahdollista, niitä voidaan säilyttää astiassa – lisäämättä puskuriliuosta – jäädytettynä enintään 72 tunnin ajan tai huoneenlämmössä enintään 24 tunnin ajan.

Käsitellään napapääkappaleet yhtä seuraavista menettelyistä noudattaen: joko

- a) peitetään kappaleet riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuria (lisäys 4) ja sekoitetaan tasoravistimella (50–100 rpm:n kierrosnopeudella) neljän tunnin ajan alle 24 °C:ssa tai 16–24 tunnin ajan jäädytettynä;

tai

- b) homogenoidaan kappaleet riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuria (lisäys 4) joko sekoittimella (esim. Waring tai Ultra Turrax) tai murskaamalla suljetussa kertakäyttöisessä liotepussissa (esim. luja Stomacher- tai Bioreba-polyeteenipussi, jonka mitat ovat 150 mm × 250 mm, säteilysteriili) käyttäen kumivasaraa tai sopivaa jauhamisvälinettä (esim. Homex).

**Huomautus:** Näytteiden ristikontaminaation riski on suuri silloin, kun näytteet homogenoidaan sekoittimella. On ryhdyttävä varotoimiin roiskumisen tai läikkymisen välttämiseksi uuttamisprosessin aikana. On varmistettava, että jokaista näytettä varten käytetään vasta steriloituja sekoittimen lapoja ja astioita. Jos aiotaan tehdä PCR-testi, on vältettävä DNA:n siirtyminen astioihin tai jauhamislaitteisiin. Tehtäessä PCR-testi on suositeltavaa suorittaa murskaaminen kertakäyttöisissä pusseissa ja käyttää kertakäyttöisiä putkia.

- 1.1.3 Dekantoidaan supernatantti. Jos liuos on liian sameaa, sitä kirkastetaan joko hitaasti sentrifugoiden (enintään 180 g kymmenen minuutin ajan 4–10 °C:n lämpötilassa) tai suodatetaan liuos (40–100 µm:n huokoskoon vakuumisuo-  
datusjärjestelmällä) ja pestään suodatin vielä uuttopuskurilla (10 ml).

- 1.1.4 Konsentroidaan bakteerifraktio sentrifugoimalla 7 000 g 15 minuutin ajan (tai 10 000 g 10 minuutin ajan) 4–10 °C:n lämpötilassa ja poistetaan supernatantti sakkaa sekoittamatta.

- 1.1.5 Suspendoidaan sakka uudelleen 1,5 ml:aan sakkapuskuria (lisäys 4). Käytetään 500 µl:aa *R. solanacearum* -bakteerin testaamiseksi, 500 µl:aa *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* -bakteerin testaamiseksi ja 500 µl:aa vertailutar-  
koituksiin. Lisätään 10–25 % (v/v) steriiliä glyserolia 500 µl:aan vertailuarvona olevaan määräraosaan ja jäljellä ole-  
vaan testimääräraosaan, sekoitetaan ja varastoidaan – 16–24 °C:n lämpötilaan (viikoksi) tai – 68–86 °C:n  
lämpötilaan (kuukausiksi). Säilytetään testimääräosat 4–10 °C:ssa testauksen ajan.

Toistuva jäädytys ja sulatus ei ole suositeltavaa.

Jos uutetta joudutaan kuljettamaan, toimitus on tehtävä kylmälaukussa 24–48 tunnin kuluessa.

- 1.1.6 Saastunnan välttämiseksi on ehdottoman tärkeää käsitellä näytteet ja *R. solanacearum* -positiiviset vertailu-, kontrolli- ja valvontanäytteet toisistaan erillään. Tämä koskee sekä immunofluoresenssitestiä että kaikkia muitakin testejä.

## 1.2 Testaus

Ks. vuokaavio ja testien kuvaus sekä optimoidut protokollat niitä käsittelevissä lisäyksissä:

*Eristäminen selektiivisellä alustalla* (ks. VI jakson A kohdan 4 alakohta)

*IF-testi* (VI jakson A kohdan 5 alakohta)

*PCR-testi* (VI jakson A kohdan 6 alakohta)

*FISH-testi* (VI jakson A kohdan 7 alakohta)

*ELISA-testi* (VI jakson A kohdan 8 alakohta)

*Biologinen määrittäminen* (VI jakson A kohdan 9 alakohta).

2. Yksityiskohtaiset menetelmät *R. solanacearum* -kasvintuhoajan toteamiseksi ja tunnistamiseksi oireettomista perunoista, tomaateista tai muista isäntäkasveista

## 2.1 Näytteiden valmistelu

*Huomautus:* Piilevien *R. solanacearum* -kantojen toteamiseksi on suositeltavaa käyttää kokoomanäytteitä. Menettelyä voidaan vaihtaa käyttämään jopa 200:n varresta otetun osan muodostamiin kokoomanäytteisiin. Jos tehdään tutkimuksia, niiden olisi perustuttava tilastollisesti edustavaan otokseen tutkittavana olevasta kasvipopulaatiosta.

## 2.1.1 Kerätään 1–2 cm:n kokoiset varren palaset suljettavaan steriiliin astiaan seuraavien näytteenottomenetelmien mukaisesti:

*Tomaatin taimet taimitarhalla:* Poistetaan desinfioiduilla leikkausveitsellä 1 cm:n palanen kunkin varren alaosasta juuri maanpinnan yläpuolelta.

*Pellolla tai kasvihuoneessa kasvatetut tomaattikasvit:* Puhtaalla ja desinfioidulla veitsellä poistetaan kustakin kasvista alin sivuverso leikkaamalla juuri verson ja kasvin päävarren liitoskohdan yläpuolelta. Poistetaan alin 1 cm:n osa kustakin sivuversosta.

*Muut isäntäkasvit:* Poistetaan desinfioiduilla leikkausveitsellä tai oksasaksilla 1 cm:n palanen kunkin varren alaosasta juuri maanpinnan yläpuolelta. Jos kyseessä on *S. dulcamara* tai muu vedessä kasvava isäntäkasvi, poistetaan 1–2 cm:n osia vedenalaisesta varresta tai rönsystä, jossa on vesijuuria.

Kun näytteitä otetaan jostakin tietyistä paikasta, on suositeltavaa testata tilastollisesti edustava näyte, jossa on vähintään 10 potentiaalista isäntärikkakasvia kustakin näytteenottoaika-alueelta. Taudinaiheuttaja voidaan luotettavimmin havaita loppukeväästä, kesällä ja syksyllä, vaikka luonnossa voidaankin havaita tartuntoja läpi vuoden vesistöissä kasvavissa monivuotuisissa *Solanum dulcamara* -kasveissa. Tunnettuja isäntäkasveja ovat ylivuotiset perunakasvit, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *Datura stramonium* ja muut Solanaceae-heimon jäsenet. Muita isäntäkasveja ovat *Pelargonium* spp. ja *Portulaca oleracea*. Muita eurooppalaisia rikkakasvilajikkeita, joiden juurissa ja/tai ritsosfäärissä (juurten ympäristössä) voidaan tietyissä ympäristöoloissa tavata *R. solanacearum* biovarin 2 rodun 3 populaatioita, ovat *Atriplex hastata*, *Bidens pilosa*, *Cerastium glomeratum*, *Chenopodium album*, *Eupatorium cannabinum*, *Galinsoga parviflora*, *Ranunculus scleratus*, *Rorippa* spp., *Rumex* spp., *Silene alba*, *S. nutans.*, *Tussilago farfara* ja *Urtica dioica*.

*Huomautus:* Kasveja voidaan tässä vaiheessa tarkastella silmämääräisesti sisäisten oireiden varalta (johtosolukon värjäytyminen tai bakteerimätä. Laitetaan sivuun kaikki varren osat, joissa on oireita, ja testataan erikseen (ks. II jakso).

## 2.1.2 Desinfioidaan varren osat pikaisesti 70-prosenttisellä etanolilla ja kuivataan välittömästi paperipyyhkeeseen taputtamalla. Käsitellään tämän jälkeen varren palaset yhtä seuraavista menetelyistä noudattaen: joko

- peitetään kappaleet riittävällä määrällä (noin 40 ml) uuttopuskuriä (lisäys 4) ja sekoitetaan tasoravistimella (50–100 rpm:n kierrosnopeudella) neljän tunnin ajan alle 24 °C:ssa tai 16–24 tunnin ajan jäädytettynä; tai
- käsitellään välittömästi jauhamalla palaset lujassa pussissa (esim. Stomacher tai Bioreba) siten, että siinä on sopiva määrä uuttopuskuriä (lisäys 4), käyttäen kumivasaraa tai sopivaa jauhamisvälinettä (esim. Homex). Jos tämä ei ole mahdollista, varastoidaan varren palaset jäädytettynä enintään 72 tunnin ajan tai huoneenlämmössä enintään 24 tunnin ajan.

## 2.1.3 Dekantoidaan supernatantti, kun seos on saanut seistä 15 minuuttia.

## 2.1.4 Uutteen kirkastaminen lisää tai bakteerifraktion konsentrointi ei yleensä ole tarpeen mutta voidaan tehdä suodattamalla ja/tai sentrifugoimalla, kuten III jakson 1.1.3–1.1.5 kohdassa kuvataan.



- 2.1.5 Jaetaan laimentamaton tai konsentroidu näyteute kahteen yhtä suureen osaan. Pidetään toista osaa 4–10 °C:n lämpötilassa testauksen ajan ja varastoidaan toinen puolisko 10–25 %:ssa (v/v) steriilissä glyserolissa – 16— 24 °C:n lämpötilaan (viikoiksi) tai – 68— 86 °C:n lämpötilaan (kuukaudeksi), mikäli lisättestaus on tarpeen.

## 2.2 Testaus

Ks. vuokaavio ja testien kuvaus sekä optimoidut protokollat niitä käsittelevissä lisäyksissä:

*Eristäminen selektiivisellä alustalla* (ks. VI jakson A kohdan 4 alakohta)

*IF-testi* (VI jakson A kohdan 5 alakohta)

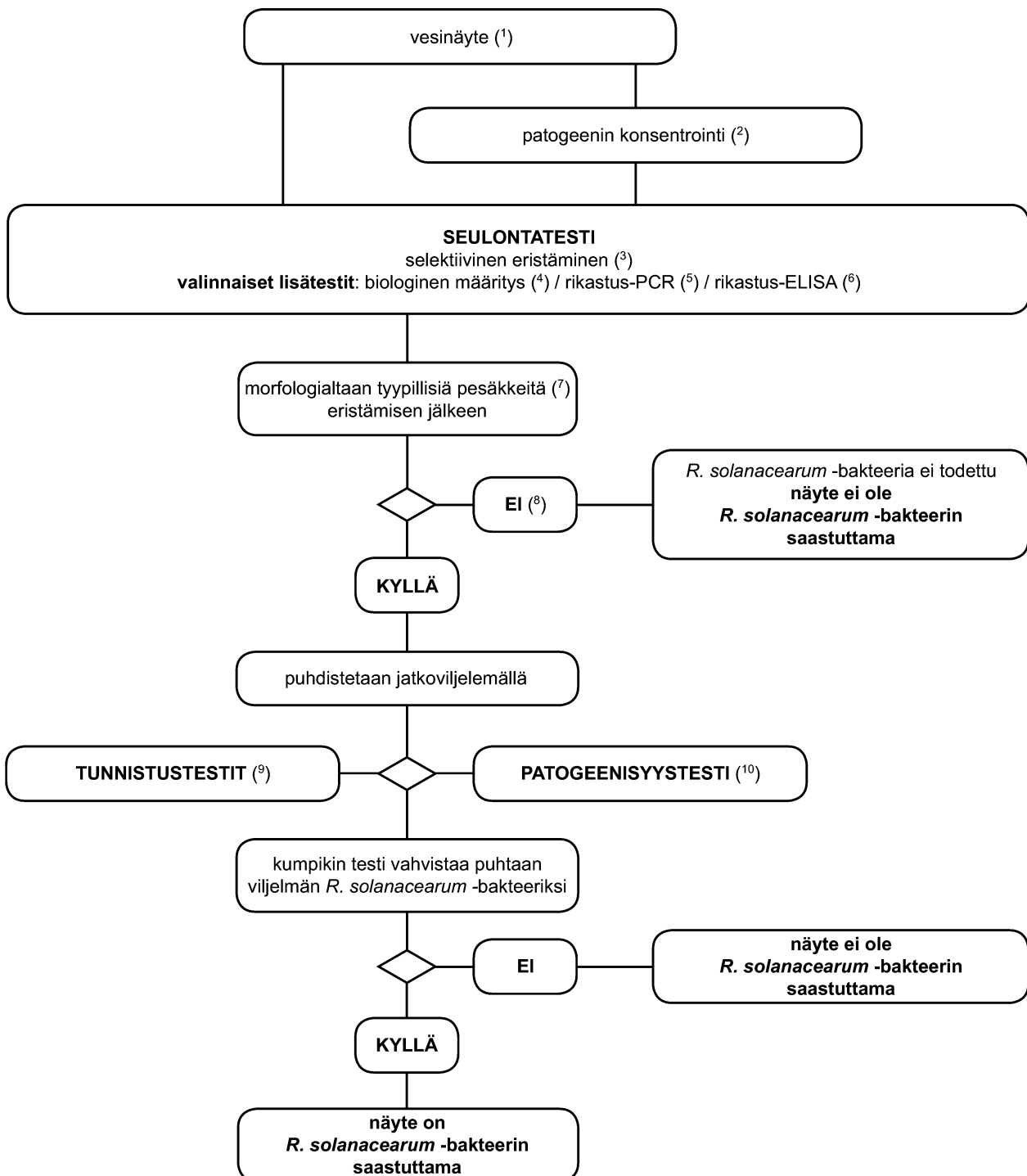
*PCR-testi* (VI jakson A kohdan 6 alakohta)

*FISH-testi* (VI jakson A kohdan 7 alakohta)

*ELISA-testi* (VI jakson A kohdan 8 alakohta)

*Biologinen määrittäminen* (VI jakson A kohdan 9 alakohta).

## IV JAKSO

1. Menetelmä *R. solanacearum* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi vedestä

- (<sup>1</sup>) Ks. suositellut näyttekoot IV jakson 2.1 kohta.
- (<sup>2</sup>) Taudinaiheuttajan konsentroitimenetelmät kuvataan IV jakson 2.1 kohdassa. Konsentroinnissa sekä taudinaiheuttajan että sen kanssa kilpailevien saprofyttisten bakteerien populaatiot kasvavat, ja sitä suositellaankin ainoastaan, jos sen seurauksena eristystesti ei tule mahdolltomaksi.
- (<sup>3</sup>) Eristäminen selektiivisellä alustalla kuvataan VI jakson A kohdan 4 alakohdassa.
- (<sup>4</sup>) Biologinen määrittäminen kuvataan VI jakson A kohdan 9 alakohdassa.
- (<sup>5</sup>) Rikastuksen PCR-menetelmät kuvataan VI jakson A kohdan 4.2 alakohdassa sekä VI jakson A kohdan 6 alakohdassa.
- (<sup>6</sup>) Rikastuksen ELISA-menetelmät kuvataan VI jakson A kohdan 4.2 alakohdassa sekä VI jakson A kohdan 8 alakohdassa.
- (<sup>7</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu II jakson 3 kohdan d alakohdassa.
- (<sup>8</sup>) Viljelytestit saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos epäillään, että saprofyttiset populaatiot vaikuttavat erityksen luotettavuuteen, eristystesti toistetaan sen jälkeen, kun näyte on laimennettu steriilillä vedellä.
- (<sup>9</sup>) Oletetun *R. solanacearum* -kasvintuhoajan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu VI jakson B kohdassa kuvattujen testien avulla.
- (<sup>10</sup>) Patogeenisyydesti kuvataan VI jakson C kohdassa.

## 2. Menetelmät *R. solanacearum* -kasvintuhoajan toteamiseksi ja tunnistamiseksi vedestä

### Periaate

Tässä jaksossa kuvattavaa validoitua toteamismenettelyä sovelletaan taudinaiheuttajan havaitsemiseksi pintavesinäytteistä, ja sitä voidaan soveltaa myös perunanjalostuksessa syntyvien tai muiden jätevesien näytteiden testaamiseen. On kuitenkin huomattava, että odotettu havaitsemisherkkyys vaihtelee substraatin mukaisesti. Eristystestin herkkyyteen vaikuttavat kilpailevien saprofyttisten bakteerien populaatiot, jotka ovat yleensä huomattavasti suurempia perunanjalostuksen jätevesissä ja muissa jätevesissä kuin pintavedessä. Vaikka jäljempänä kuvattavalla menettelyllä odotetaan havaittavan niinkin pieniä pitoisuuksia kuin  $10^3$  solua litraa kohden, havaitsemisherkkyys on todennäköisesti merkittävästi pienempi, kun kyseessä ovat perunanjalostuksen jätevedet tai muut jätevedet. Tämän vuoksi suositellaan, että jätevedet testataan mahdollisten puhdistuskäsittelyiden (esim. sedimentointi tai suodatus) jälkeen, jolloin saprofyttisten bakteereiden populaatiot ovat pienempiä. Testimenettelyn herkkyyteen liittyvät rajoitukset on pidettävä mielessä, kun arvioidaan mahdollisesti saatujen negatiivisten tulosten luotettavuutta. Vaikka tätä menettelyä on onnistuneesti käytetty tutkimustyössä, jolla on pyritty määrittämään taudinaiheuttajan esiintyminen pintavedessä, menettelyn rajoitukset on tunnettava, jos sitä käytetään vastaaviin tutkimuksiin, jotka koskevat perunanjalostuksessa syntyviä jätevesiä tai muita jätevesiä.

### 2.1 Näytteiden valmistelu

#### Huomautus:

- *R. solanacearum* havaitaan pintavedestä luotettavimmin loppukeväästä, kesällä tai syksyllä, kun veden lämpötila on yli 15 °C.
- Toistamalla näytteenotto määritetyistä näytteenottopaikoista eri aikoina edellä kuvatun kauden aikana voidaan vähentää ilmastollisten vaihteluiden vaikutuksia ja näin parantaa havaitsemisluotettavuutta.
- Runsaiden sateiden ja vesistön maantieteellisen muodon vaikutus on otettava huomioon, jotta voidaan välttää laajan laimentumisen vaikutukset, jotka voisivat kätkeä taudinaiheuttajan esiintymisen.
- Pintavesinäytteitä otetaan isäntäkasvien läheisyydestä, jos näitä kasveja esiintyy.

2.1.1 Vesinäytteet kerätään valikoiduista näytteenottopaikoista täyttämällä kertakäyttöiset steriilit putket tai pullo yli 30 cm syvyydessä ja enintään 2 m etäisyydellä rannasta, jos mahdollista. Jalostus- ja jätevesinäytteet kerätään jäteveden laskupaikalta. Suositeltava näytekoko on enintään 500 ml näytteenottopaikkaa kohden. Jos halutaan käyttää pienempiä näytteitä, on suositeltavaa ottaa näytteitä vähintään kolmesti kustakin näytteenottopaikasta ja siten, että kukin näyte koostuu kahdesta samanlaisesta vähintään 30 ml:n osanäytteestä. Intensiivistä tutkimustyötä varten valitaan vähintään 3 näytteenottopaikkaa 3 vesistökilometriä kohden ja varmistetaan, että myös vesistöön laskevista sivujoista ja -puroista otetaan näytteet.

2.1.2 Näytteet kuljetetaan pimeässä ja viileässä (4–10 °C) ja testataan 24 tunnin kuluessa.

2.1.3 Bakteerifraktio voidaan tarvittaessa konsentroida jollakin seuraavista menetelmistä:

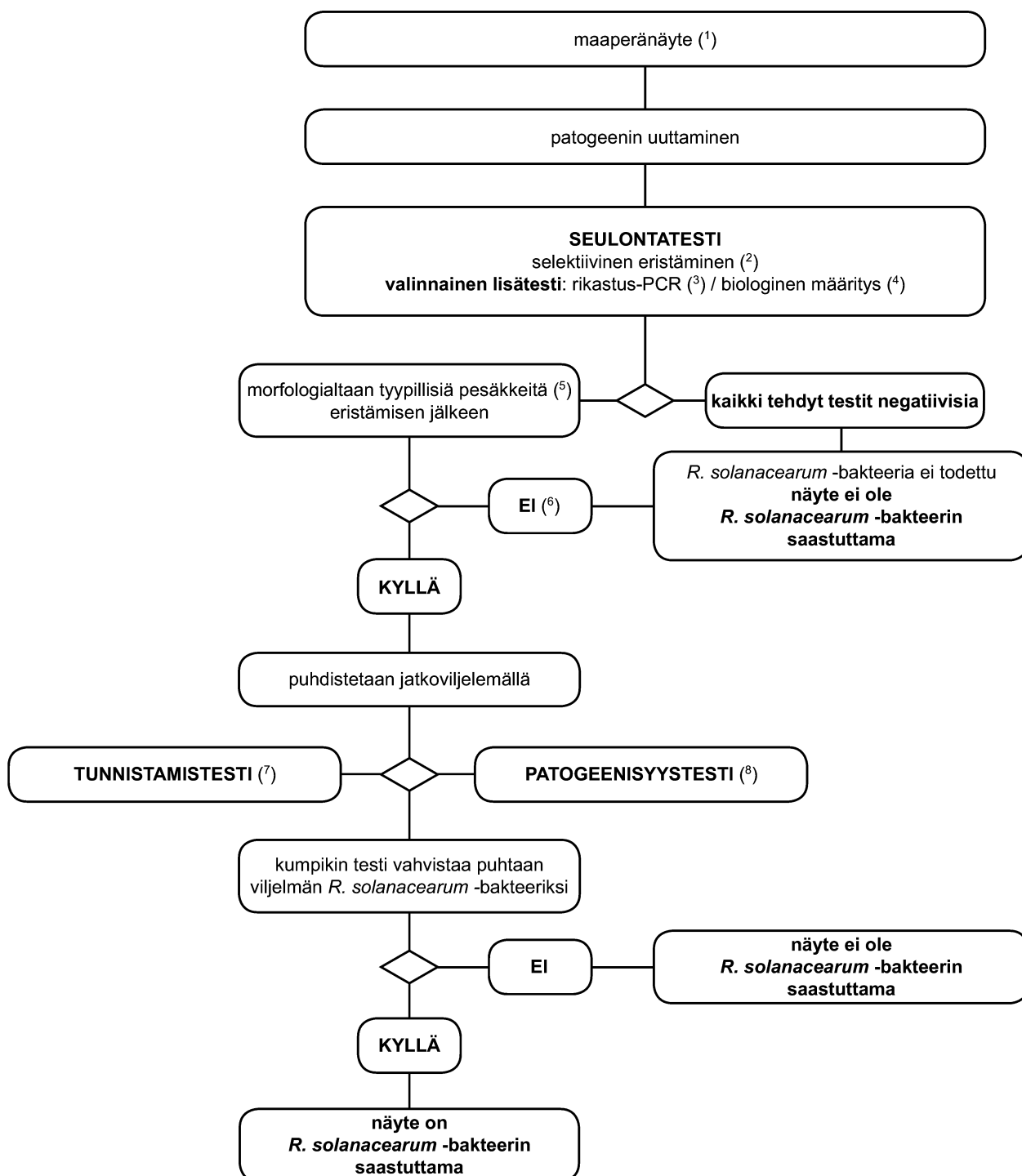
- a) Sentrifugoidaan 30–50 ml:n osanäytteitä 10 000 g:ssa 10 minuutin ajan (tai 7 000 g:ssa 15 minuutin ajan) mieluiten 4–10 °C:ssa, poistetaan supernatantti ja suspendoidaan pelletti uudelleen 1 ml:aan pellettipuskuria (lisäys 4).
- b) Kalvosuodatus (vähimmäishuokoskoko 0,45 µm), minkä jälkeen pestään suodatin 5–10 ml:ssa pellettipuskuria ja säilytetään pesuliuos. Tämä menetelmä soveltuu suurille vesimäärille, jotka sisältävät vähäisiä määriä saprofyyttejä.

Konsentroitua ei yleensä suositella perunan jalostuksessa syntyvän jäteveden tai muun jäteveden näytteille, koska kilpailevien saprofyttisten bakteereiden populaatioiden kasvu estää *Ralstonia solanacearum* -bakteerien havaitsemisen.

### 2.2 Testaus

Ks. vuokaavio ja testien kuvaus niitä käsittelevissä lisäyksissä.

## V JAKSO

1. Menetelmä *R. solanacearum* -kasvintuhoajan toteamiseksi ja tunnistamiseksi maaperästä

- (<sup>1</sup>) Ks. suositellut näytteenottomenettelyt V jakson 2.1 kohta.
- (<sup>2</sup>) Eristäminen selektiivisellä alustalla kuvataan VI jakson A kohdan 4 alakohdassa.
- (<sup>3</sup>) Rikastuksen PCR-menetelmät kuvataan VI jakson A kohdan 4.2 alakohdassa sekä VI jakson A kohdan 6 alakohdassa.
- (<sup>4</sup>) Biologinen määrittäminen kuvataan VI jakson A kohdan 9 alakohdassa.
- (<sup>5</sup>) Tyypillinen pesäkemorfologia on kuvattu II jakson 3 kohdan d alakohdassa.
- (<sup>6</sup>) Viljelytestit saattavat epäonnistua, jos saprofyttiset bakteerit kilpailevat taudinaiheuttajan kanssa tai estävät sen kasvun. Jos epäillään, että saprofyttiset populaatiot vaikuttavat erityksen luotettavuuteen, eristystestit toistetaan sen jälkeen, kun näytettä on uudelleen laimennettu.
- (<sup>7</sup>) Oletetun *R. solanacearum* -kasvintuhoajan puhtaan viljelmän tunnistaminen luotettavasti onnistuu VI jakson B kohdassa kuvattujen testien avulla.
- (<sup>8</sup>) Patogeenisyydestä kuvataan VI jakson C kohdassa.

## 2. Menetelmät *R. solanacearum* -kasvintuhoojan toteamiseksi ja tunnistamiseksi maaperästä

### Periaatteet

Tässä jaksossa kuvattavaa validoitua toteamisenettelyä sovelletaan taudinaiheuttajan havaitsemiseksi maaperänäytteissä, mutta sitä voidaan soveltaa myös perunan jalostuksessa syntyvän kiinteän jätteen tai viemärietteen näytteiden testaamiseen. On kuitenkin huomattava, että nämä menetelmät eivät ole riittävän herkkiä sen takaamiseksi, että sillä havaittaisiin pienet ja/tai epätasaisesti jakautuneet *Ralstonia solanacearum* -populaatiot, joita voi esiintyä näistä substraateista saaduissa luonnollisesti saastuneissa näytteissä.

Tämän testimenettelyn herkkyyden asettamat rajoitukset olisi otettava huomioon, kun arvioidaan mahdollisesti saatujen negatiivisten tulosten luotettavuutta sekä silloin kun menettelyä käytetään tutkimuksissa, joilla pyritään määrittämään taudinaiheuttajan esiintyminen maaperässä tai lietteessä. Luotettavin testi taudinaiheuttajan toteamiseksi maaperästä on se, että istutetaan taudille altis kasvi ja seurataan, saako se tartunnan. Tälläkään menetelmällä ei tosin havaita alhaisia saastumistasoja.

### 2.1 Näytteiden valmistelu

2.1.1 Näytteenotto peltomaasta tehdään sukkulamatojen varalta tehtävässä näytteenotossa käytettävien yleisten periaatteiden mukaisesti. Kerätään 0,5–1 kg maata näytettä kohden 10–20 cm syvyydeltä siten, että näytteenottoaikoja on 60 jokaista 0,3 ha kohden (tai ruudukosta, joka on 7 × 7 m). Jos taudinaiheuttajaa epäillään esiintyvän, keruupisteiden määrä nostetaan 120:een 0,3 ha kohden. Näytteet säilytetään 12–15 °C:ssa ennen testausta. Näytteet perunoiden jalostuksen jäteliettestä ja viemärietteestä otetaan keräämällä yhteensä 1 kg paikoista, jotka edustavat tutkittavan lietteen kokonaismäärää. Näytteet sekoitetaan hyvin ennen testaamista.

2.1.2 Hajotetaan maaperästä tai lietteestä otetut 10–25 g:n osanäytteet tasoravistimella (250 rpm) 60–150 ml:aan uuttopuskuria (lisäys 4) enintään 2 tunnin ajan. Dispersiota voidaan tarvittaessa auttaa lisäämällä 0,02 % steriiliä Tween-20:tä ja 10–20 g steriiliä soraa.

2.1.3 Suspensio pidetään 4 °C:ssa testauksen aikana.

### 2.2 Testaus

Ks. vuokaavio ja testien kuvaus niitä käsittelevissä lisäyksissä.

## VI JAKSO

### OPTIMOIDUT PROTOKOLLAT *R. SOLANACEARUM* -KASVINTUHOOJAN TOTEAMISEKSI JA TUNNISTAMISEKSI

#### A) Määrittämis- ja toteamistestit

##### 1. Valutuskoe

*R. solanacearum* -bakteerin esiintyminen nuutuviissa perunan, tomaatin tai muun isäntäkasvin varsissa voidaan osoittaa seuraavan yksinkertaisen ennakoivan testin avulla: Leikataan varsi aivan maanpinnan yläpuolelta. Suspendoidaan leikkuupinta putkelliseen puhdasta vettä. Seurataan, alkaako leikatuista johtosolukimpuista muutaman minuutin kuluttua spontaanisti valua bakteerilimarihjoja.

##### 2. Poly-β-hydroksibutyraattirakeiden (PHB) toteaminen

1. Valmistetaan mikroskooppilevyille preparaatti saastuneesta solukosta saadusta bakteerimädästä tai 48 tunnin viljelmästä YPGA- tai SPA-alustalla (lisäys 2).

2. Valmistetaan positiiviset kontrollipreparaatit *R. solanacearum* -bakteerin biovarin 2 kannasta ja negatiivinen kontrollipreparaatti tunnetusti PHB-negatiivisesta lajista, jos tämä katsotaan hyödylliseksi.

3. Annetaan kuivua ja kuljetetaan kunkin levyn pohjaa nopeasti liekin yllä preparaattien kiinnittämiseksi.

4. Värjätään preparaatti joko niilinsinisellä tai sudaninmustalla ja tutkitaan sitä mikroskoopilla seuraavasti:

*Niilinsinisellä tehtävä testi*

- a) Peitetään kukin preparaatti niilinsinisen A 1-prosenttisellä vesiliuoksella. Inkuboidaan 10 minuuttia 55 °C:ssa.
- b) Valutetaan värjäävä liuos pois. Pestään nopeasti vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Poistetaan ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä.
- c) Peitetään preparaatti 8-prosenttisellä etikkahapon vesiliuoksella ja annetaan inkuboitua 1 minuutin ajan laboratoriolämpötilassa.
- d) Pestään nopeasti vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Poistetaan ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä.
- e) Kostutetaan uudelleen pisaralla vettä. Asetetaan peitelasi.
- f) Tutkitaan värjäytynyttä preparaattia mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä, aallonpituudella 450 nm öljy- tai vesi-immersio-objektiivin 600–1 000-kertaisella suurennoksella.
- g) Seurataan esiintykö PHB-rakeiden kirkkaan oranssia fluoresenssia. Tarkastellaan myös tavanomaisessa valaistuksessa sen varmistamiseksi, että rakeet ovat solunsisäisiä ja että solujen morfologia on tyypillinen *R. solanacearum* -bakteerille.

*Sudaninmustalla tehtävä testi*

- a) Peitetään kukin preparaatti sudaninmustan B 0,3-prosenttisellä 70-prosenttisessä etanolissa olevalla liuoksella. Inkuboidaan 10 minuutin ajan laboratoriolämpötilassa.
- b) Valutetaan värjäävä liuos pois. Pestään nopeasti vedellä hanan alla. Poistetaan ylimääräinen vesi paperipyyhkeellä.
- c) Kastetaan levyt pikaisesti ksyloliin. Taputellaan kuivaksi paperipyyhkeellä. *Varoitus: Ksyloli on haitallinen aine. Tarvittaviin varotoimiin on ryhdyttävä. Työskennellään vetokaapissa.*
- d) Peitetään levyt 0,5-prosenttisellä (w/v) safraniinin vesiliuoksella ja jätetään 10 sekunniksi laboratoriolämpötilaan. *Varoitus: Safraniini on haitallinen tuote. Tarvittaviin varotoimiin on ryhdyttävä. Työskennellään vetokaapissa.*
- e) Pestään vedellä hiljaa valuvan hanan alla. Kuivataan paperipyyhkeellä ja asetetaan peitelasi.
- f) Tutkitaan värjäytynyttä preparaattia valomikroskoopilla öljyimmersion-objektiivin 1 000-kertaisella suurennoksella.
- g) *R. solanacearum* -bakteerin solujen PHB-rakeet värjäytyvät sinimustiksi ja soluseinät vaaleanpunaisiksi.

**3. Serologiset agglutinaatiokokeet**

Bakteerimädässä tai oireilevassa kudoksessa olevien *R. solanacearum* -solujen agglutinaatio voidaan havaita parhaiten käyttämällä validoituja vasta-aineita (ks. lisäys 3), jotka on leimattu soveltuvilla värimarkkereilla, kuten punaisilla *Staphylococcus aureus* -soluilla tai värillisillä lateksihiukkasilla. Jos käytetään kaupallista testisarjaa (ks. lisäys 3), on noudatettava valmistajan ohjeita. Muussa tapauksessa toimitaan seuraavan menettelyn mukaisesti:

- a) Sekoitetaan leimatun vasta-aineen suspensiota ja bakteerimätää pisaroina (noin 5 µl kumpaakin) monisyvennyslevyjen syvennyksissä.
- b) Valmistetaan positiivinen ja negatiivinen kontrolli käyttämällä *R. solanacearum* biovarin 2 suspensiota ja heterologista kantaa.
- c) Positiivissa näytteissä voidaan havaita agglutinaatio, kun niitä on kevyesti sekoitettu 15 sekunnin ajan.



#### 4. Eristäminen selektiivisellä alustalla

##### 4.1 Valikoiva maljaus

**Huomautus:** Ennen kuin tätä menetelmää käytetään ensimmäisen kerran, on suoritettava alustavia testejä, jolla varmistetaan, että aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteuutteisiin lisätyt *R. solanacearum* -bakteerin pesäkkeitä muodostavat yksiköt ( $10^3$ – $10^4$ /ml) voidaan todeta. Testi on voitava toistaa.

Käytetään asianmukaisesti validoitua selektiivistä alustaa, esim. SMSA:ta (sellaisena kuin se muutettuna Elphinstone *et al.*, 1996; ks. lisäys 2).

*R. solanacearum* -bakteerin erottaminen muista alustalla mahdollisesti kehittyvistä bakteereista edellyttää huolellisuutta. *R. solanacearum* -pesäkkeet voivat lisäksi olla morfologialtaan epätyypillisiä, jos alustalla on liian suuri populaatio tai jos myös antagonistisia bakteereita esiintyy. Jos epäillään kilpailua tai antagonismia, näyte olisi testattava uudestaan eri testiä käyttäen.

Tämän menetelmän tunnistamisherkkyys on suurin, kun käytetään vasta valmistettuja näyteuutteita. Menetelmää voidaan kuitenkin käyttää myös silloin, kun uutteita on säilytetty glyserolissa – 68— 86 °C:ssa.

Positiivisiksi kontrolleiksi valmistetaan kymmenkertaiset laimennokset suspensiosta, jossa on  $10^6$  PMY/ml *R. solanacearum* -bakteerin virulenttia biovari 2 -kantaa (esim. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857). Mahdollisen kontaminaation välttämiseksi positiiviset kontrollit on valmistettava täysin erillään testinäytteistä.

Ennen kuin vasta valmistettua selektiivisen alustan erää käytetään rutiininäytteiden testaamiseen, olisi testattava sen soveltuvuus taudinaiheuttajan kasvattamiseen.

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

4.1.1 Käytetään tarkoituksenmukaista laimennussarjatekniikkaa, jolla pyritään varmistamaan, että mahdolliset taustalla olevat saprofyttiset pesäkkeitä muodostavat populaatiot laimentuvat pois. Levitetään levyä kohden 50–100 µl näyteuutetta ja kutakin laimennosta.

4.1.2 Inkuboidaan levyjä 28 °C:n lämpötilassa. Tarkastellaan levyjä 48 tunnin kuluttua ja tämän jälkeen päivittäin kuuden päivän ajan. Tyypilliset *R. solanacearum* -pesäkkeet SMSA-alustalla ovat maidonvalkoisia, litteitä, epäsäännöllisiä ja juoksevia, ja kolmen päivän inkubaation jälkeen niiden keskusta kehitty vaaleanpunaisesta verenpunaiseen vaihtelevaa väritystä, johon liittyy sisäinen raidoitus tai kierteet. (ks. [www.sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)).

**Huomautus:** Tällä alustalla muodostuu joskus epätyypillisiä *R. solanacearum* -pesäkkeitä. Nämä voivat olla pieniä, pyöreitä, täysin punaisia ja ei-juoksevia tai ainoastaan osittain juoksevia. Tämän vuoksi niitä on vaikeaa erottaa saprofyttisistä pesäkkeistä muodostavista bakteereista.

4.1.3 Puhdistetaan oletetut *R. solanacearum* -pesäkkeet sen jälkeen, kun ne on sivelty tai laimennettu tavanomaiselle ravintoalustalle eristettyjen pesäkkeiden saamiseksi (ks. lisäys 2).

4.1.4 Viljelmiä säilytetään lyhyen aikaa steriilissä vedessä (pH 6–8, klooriton) huoneenlämmössä ja pimeässä tai pidemmän aikaa soveltuvassa kylmäsuojaavassa alustassa – 68— 86 °C:ssa tai ne lyofilisoidaan.

4.1.5 Tunnistetaan oletetut viljelmät (ks. VI jakson B kohta) ja tehdään patogeenisyydesti (ks. VI jakson C kohta).

##### Laimennussarjatestin tulosten tulkinta

Laimennussarjatesti on negatiivinen, jos yhtään pesäkettä ei ole havaittu kuuden päivän jälkeen tai jos yhtään *R. solanacearum* -bakteerille tyypillistä pesäkettä ei löydetä edellyttäen, että ei epäillä muiden bakteerien kilpailevaa tai estävää vaikutusta ja että *R. solanacearum* -bakteerin tyypillisiä pesäkkeitä löytyy positiivisesta kontrollista.

Laimennussarjatesti on positiivinen, jos oletettuja *R. solanacearum* -bakteerin pesäkkeitä eristetään.

##### 4.2 Rikastusmenettely

Käytetään validoitua rikastusalustaa kuten muutettua Wilbrinkin lientä (ks. lisäys 2).

Tällä menettelyllä voidaan valikoivasti kasvattaa *R. solanacearum* -populaatioita näyteuutteissa ja lisätä toteamisherkkyyttä. Menettely laimentaa myös tehokkaasti PCR-reaktion inhibiittoreita (1:100). On kuitenkin huomattava, että *R. solanacearum* -bakteerin rikastaminen voi epäonnistua saprofyttisten organismien kilpailun tai estovaikutuksen vuoksi, sillä nämä rikastuvat usein samanaikaisesti. *R. solanacearum* -bakteerin eristäminen rikastetuista liemiviljelmistä voi tämän vuoksi olla vaikeaa. Koska serologisesti samankaltaisten saprofyttien populaatiot voivat kasvaa, suositellaan spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden käyttämistä polyklonaalisten vasta-aineiden sijaan, kun käytetään ELISA-testiä.

- 4.2.1 Rikastus-PCR:ää varten siirretään 100 µl näyteutetta 10 ml:aan rikastuslientä (lisäys 2), joka on aiemmin jaettu DNA-vapaisiin putkiin tai pulloihin. Rikastus-ELISAA varten näyteutteen suhde liemeen voi olla suurempi (esim. 100 µl 1,0 ml:ssa rikastuslientä).
- 4.2.2 Inkuboidaan 72 tuntia 27–30 °C:ssa ravisteltavassa viljelmässä tai staattisessa viljelmässä siten, että korkit ovat löysällä ilmanvaihdon turvaamiseksi.
- 4.2.3 Sekoitetaan hyvin ennen ELISA- tai PCR-testeihin käyttämistä.
- 4.2.4 Rikastuslientä käytetään edellä mainituissa testeissä samoin kuin näytteitäkin.

*Huomautus:* Jos epäillään, että *R. solanacearum* -bakteerin rikastaminen voi estyä tiettyjen kilpailevien saprofyttisten bakteerien suurten populaatioiden vuoksi, parempia tuloksia voidaan saada rikastamalla näyteutteen sientä ennen sentrifugointia tai muuta konsentroituvaihetta.

## 5. Immunofluoresenssitesti (IF)

### Periaate

IF-testin käyttö pääasiallisena seulontatestinä on suositeltavaa, koska se on todistetusti riittävän herkkä vaadittavien kynnysarvojen saavuttamiseksi.

Kun IF-testiä käytetään pääasiallisena seulontatestinä ja IF-testin tulos on positiivinen, toisena seulontatestinä on tehtävä eristämistesti, PCR- tai FISH-testi. Jos IF-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja IF-testin tulos on positiivinen, vuokaavion mukainen lisättestaus on tarpeen analyysin suorittamiseksi.

*Huomautus:* Käytetään valdoidua *R. solanacearum* -vasta-aineiden lähdettä (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)). On suositeltavaa määrittää titteri kullekin uudelle vasta-aine-erälle. Titteri määritellään korkeimmaksi laimennokseksi, jolla optimaalinen reaktio tapahtuu, kun testataan suspensiota, joka sisältää *R. solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta saatuja soluja,  $10^5$ – $10^6$ /ml, sopivalla fluoreseiini-isotiosyanaattikonjugaatilla (FITC) valmistajan suositusten mukaisesti. Validoidun polyklonaalisen antiseerumin IF-titterin olisi oltava vähintään 1:2 000. Testauksen aikana vasta-aineita olisi käytettävä lähellä titteriä olevassa tai titterin suuruudessa työskentelylaimennoksessa (tai -laimennoksissa).

Testi olisi tehtävä vasta valmistetuista näyteutteista. Testi voidaan tarvittaessa tehdä utteista, joita on säilytetty – 68–86 °C:ssa glyserolissa. Glyceroli voidaan poistaa näytteestä lisäämällä 1 ml sakkapuskuria (lisäys 4), sentrifugoimalla uudelleen 15 minuutin ajan 7 000 g:ssä ja suspendoimalla uudelleen yhtä suureen määrään puskuriliuosta. Tämä ei ole useinkaan välttämätöntä erityisesti, jos näytteet kiinnitetään levyihin liekittämällä.

Valmistetaan erilliset positiiviset kontrollilevyt *R. solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta tai mistä tahansa muusta vertailukannasta, jotka on suspendoitu perunauutteeseen, kuten lisäyksen 3 B kohdassa täsmennetään, ja vaihtoehtoisesti puskuriliuokseen.

*Luonnollisesti saastunutta solukkoa (joka on säilytetty lyofilisoimalla tai pakastamalla – 16–24 °C:ssa) olisi mahdollisuus mukana käytettävä vertailua varten samalla levyllä.*

Negatiivisina kontrolleina käytetään sellaisia näyteutteen määrosia, jotka on aiemmin testattu *R. solanacearum* -bakteerin osalta negatiivisiksi.

Tämän testin yhteydessä käytettäviksi on saatavilla standardoituja positiivisia ja negatiivisia kontrollimateriaaleja, jotka luetellaan lisäyksessä 3.

Käytetään mikroskoopin monisyvennyslevyjä, joissa on mieluiten 10 halkaisijaltaan vähintään 6 mm:n syvennystä.

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

### 5.1 Käsitellään testilevyt yhdellä seuraavista menettelyistä:

- i) Pelletit, joissa on suhteellisen vähän tärkkelystä:

Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen – lisätään määrää samassa suhteessa suuremmille syvennyksille) suhteessa 1:100 laimennettua, uudelleen suspendoitua sakkua ensimmäiseen syvennykseen. Pipetoidaan samanlainen määrä laimentamatonta sakkua (1:1) rivin muihin syvennyksiin. Jäljellä olevaa riviä voidaan käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuviossa 1 on esitetty.

## ii) Muut pelletit:

Valmistetaan kymmenkertaisia laimennoksia (1:10, 1:100) uudelleen suspendoidusta sakasta sakkapuskuriin. Pipetoidaan mitattu vakiomäärä (15 µl on sopiva halkaisijaltaan 6 mm:n syvennykseen – lisätään määrää samassa suhteessa suuremmille syvennyksille) uudelleen suspendoitua sakkaa ja kutakin laimennosta riville syvennyksiä. Jäljellä olevaa riviä voidaan käyttää toisintona tai toiselle näytteelle kuten kuviossa 2 on esitetty.

- 5.2 Annetaan pisaroiden kuivua huoneenlämmössä tai lämmittämällä 40–45 °C:n lämpötilaan. Kiinnitetään bakteerisolut levyille joko kuumentamalla (15 minuuttia 60 °C:n lämpötilassa), liekittämällä tai 95 % etanolilla tai vasta-aineiden toimittajien nimenomaisten ohjeiden mukaisesti.

Kiinnitettyjä levyjä voidaan tarvittaessa säilyttää jäädytettynä kuivatusainetta sisältävässä laatikossa mahdollisimman lyhyen aikaa (enintään 3 kuukautta) ennen lisätestejä.

## 5.3 IF-menettely

## i) Testilevyn valmistaminen 5.1 alakohdan i alakohdan mukaisesti:

Valmistetaan kaksinkertaisten laimennosten sarja. Ensimmäisen syvennyksen olisi oltava 1/2 titteriä (T/2), ja muiden 1/4 titteriä (T/4), 1/2 titteriä (T/2), titteri (T) ja titteri kaksinkertaisena (2T).

## ii) Testilevyn valmistaminen 5.1 alakohdan ii alakohdan mukaisesti:

Valmistetaan työskentelylaimennos vasta-aineesta IF-puskuriin. Työskentelylaimennos vaikuttaa spesifisyyteen.

Kaavio 1. Testilevyn valmistaminen 5.1 alakohdan i alakohdan ja 5.3 alakohdan i alakohdan mukaisesti

		Laimennokset uudelleen suspendoidusta sakasta						
		1/100	1/1	1/1	1/1	1/1	<input type="checkbox"/>	Uudelleen suspendoidun sakan laimennos
(T = titteri)		T/2	T/4	T/2	T	2T	<input type="checkbox"/>	Antiseerumin/vasta-aineen kaksinkertaiset laimennokset
Näyte 1		● <sub>1</sub>	● <sub>2</sub>	● <sub>3</sub>	● <sub>4</sub>	● <sub>5</sub>		
Näytteen 1 toisinto tai näyte 2		● <sub>6</sub>	● <sub>7</sub>	● <sub>8</sub>	● <sub>9</sub>	● <sub>10</sub>		

Kaavio 2. Testilevyn valmistaminen 5.1 alakohdan ii alakohdan ja 5.3 alakohdan ii alakohdan mukaisesti

		Työskentelylaimennos antiseerumista/vasta-aineesta						
		1/1	1/10	1/100	Tyhjä	Tyhjä	<input type="checkbox"/>	Uudelleen suspendoidun sakan kymmenkertainen laimennos
Näyte 1		● <sub>1</sub>	● <sub>2</sub>	● <sub>3</sub>	● <sub>4</sub>	● <sub>5</sub>		
Näytteen 1 toisinto tai näyte 2		● <sub>6</sub>	● <sub>7</sub>	● <sub>8</sub>	● <sub>9</sub>	● <sub>10</sub>		

- 5.3.1 Järjestetään levyt kostean paperipyyhkeen päälle. Täytetään testisyvennykset kokonaisuudessaan vasta-aineen laimennoksella tai laimennoksilla. Syvennyksiin lisättävän vasta-aineen tilavuuden on vastattava vähintään levitetyn uutteen tilavuutta.

Seuraava menettely olisi toteutettava, jos vasta-aineiden toimittajilta ei ole saatu nimenomaisia ohjeita:

- 5.3.2 Inkuboidaan levyjä kannen alla kostealla paperilla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C).
- 5.3.3 Ravistetaan pisarat pois kaikilta levyiltä ja huuhdellaan levyt varovasti IF-puskurilla. Pestään 5 minuutin ajan IF-puskuri-Tweenillä (lisäys 4) ja sen jälkeen IF-puskurissa. Vältetään roiskeita tai pisaroiden kulkeutumista, joista saattaa olla seurauksena ristikontaminaatio. Poistetaan varovasti ylimääräinen kosteus paperipyyhkeellä.
- 5.3.4 Järjestetään levyt kostean paperin päälle. Täytetään testisyvennykset FITC-konjugaatin laimennoksella, jota on käytetty titterin määrittämiseen. Syvennyksiin lisätyn konjugaatin määrän on vastattava lisätyn vasta-aineen määrää.
- 5.3.5 Inkuboidaan levyt kannen alla kostealla paperilla 30 minuutin ajan huoneenlämmössä (18–25 °C).
- 5.3.6 Ravistetaan konjugaattipisarat pois levyiltä. Huuhdellaan ja pestään kuten edellä (5.3.3 alakohta).

Poistetaan varovasti ylimääräinen kosteus paperipyyhkeellä.

- 5.3.7 Pipetoidaan 5–10 µl 0,1 M fosfaattipuskuroitua glyserolia (lisäys 4) tai vastaavaa kaupallisesti saatavilla olevaa haa-lustumiselta suojaavaa peittäusainetta kuhunkin syvennykseen ja asetetaan peitelasi.

#### 5.4 IF-testin lukeminen

- 5.4.1 Tutkitaan testilevyjä mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä, FITC:n eksitaatioon sopivilla suodattimilla öljy- tai vesi-immersio-objektiivin 500–1 000-kertaisella suurennoksella. Tarkastellaan objekti-kenttää laidasta laitaan pystysuoraan ja vaakasuoraan ja kiertämällä ulkoreunaa pitkin. Näytteistä, joissa ei näy yhtään tai vain hyvin vähän soluja, tarkastellaan vähintään 40 mikroskooppikenttää.

Tutkitaan ensin positiiviset kontrollilevyt. Solujen on oltava kirkkaasti fluoresoivia ja täydellisesti värjäytyneitä määritellyllä vasta-ainetitterillä tai työskentelylaimennoksella. IF-testi (VI jakson A kohdan 5 alakohta) on uusittava, jos värjäytyminen ei ole täydellistä.

- 5.4.2 Tarkastellaan testisyvennyksissä kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen *R. solanacearum*-bakteerille (ks. www-sivusto osoitteessa <http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main>). Fluoresenssin intensiteetin on vastattava positiivista kontrollikantaa samassa vasta-ainelaimennoksessa. Sellaisia soluja, joiden värjäytyminen on epätäydellistä tai joiden fluoresenssi on heikko, ei oteta huomioon.

Jos epäillään kontaminaatiota, testi on toistettava. Näin saattaa käydä, jos kaikilla erän levyillä on positiivisia soluja puskurin kontaminaation vuoksi tai jos positiivisia soluja löytyy (levyn syvennyksen ulkopuolelta) levyn kalvolta.

- 5.4.3 Immunofluoresenssistien spesifisyyteen liittyä useita ongelmia. Perunan napapäiden ja varren palasten sakassa esiintyy todennäköisesti morfologisesti epätypillisiä fluoresoivien solujen ja *R. solanacearum*-bakteerin kanssa kooltaan ja morfologialtaan samanlaisten ristiin reagoivien saprofyyttisten bakteerien populaatioita.
- 5.4.4 Tarkastellaan ainoastaan fluoresoivia soluja, joilla on tyypillinen koko ja morfologia vasta-ainetitterissä tai -työskentelylaimennoksessa, kuten 5.3 alakohdassa kuvattiin.

## 5.4.5 IF-testin tulosten tulkinta:

- i) Jos näytteestä löytyy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, arvioidaan tyypillisten solujen keskimääräinen lukumäärä mikroskooppikenttää kohden ja lasketaan näiden solujen lukumäärä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden (lisäys 5).

IF-testin tulos on positiivinen, jos näytteissä on vähintään  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden. Näytettä pidetään mahdollisesti saastuneena, ja lisätestaus on tarpeen.

- ii) IF-testin tulos on negatiivinen, jos näytteissä on vähemmän kuin  $5 \times 10^3$  solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, ja näytettä pidetään negatiivisena. Lisätestausta ei vaadita.

## 6. PCR-testi

*Periaatteet*

Kun PCR-testiä käytetään pääasiallisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, toisena pakollisena seulontatestinä on tehtävä eristys- tai IF-testi. Kun PCR-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, vuokaavion mukainen lisätestaus on tarpeen määrittämisen tekemiseksi.

Tätä menetelmää on suositeltavaa käyttää pääasiallisena seulontatestinä ainoastaan, jos käytettävissä on sen tekemiseen vaadittavaa erityisasiantuntemusta.

*Huomautus:* Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteuutteisiin lisätyt *R. solanacearum* -bakteerin solut ( $10^3$ – $10^4$ /ml). Testi on voitava toistaa. Optimoitukokeet saattavat olla tarpeen herkkyuden ja spesifisyyden maksimoimiseksi kaikissa laboratorioissa.

Käytetään validoituja PCR-reagensseja ja -testausprotokollia (ks. lisäys 6). Olisi mielellään valittava menetelmä, johon kuuluu sisäinen kontrolli.

On toteutettava tarkoituksenmukaisia varotoimia, jotta vältetään näytteen kontaminaatio kohde-DNA:lla. PCR-testi olisi annettava kokeneiden teknikoiden tehtäväksi erikoistuneissa molekyylibiologian laboratorioissa, jotta minimoidaan näytteen mahdollinen kontaminaatio kohde-DNA:lla.

Negatiivisia kontrolleja (DNA:n uuttamis- ja PCR-menettelyjen osalta) olisi aina käsiteltävä menettelyn viimeisenä näytteenä, jotta voitaisiin osoittaa selvästi, onko DNA:n siirtymistä tapahtunut.

PCR-testiin olisi sisällytettävä seuraavat negatiiviset kontrollit:

- näyteute, joka on aiemmin testattu *R. solanacearum* -bakteerin suhteen negatiiviseksi,
- puskurikollit, joita käytetään bakteerin ja DNA:n uuttamiseksi näytteestä,
- PCR-reaktioseos.

Testissä olisi käytettävä seuraavia positiivisia kontrolleja:

- uudelleen suspendoitujen sakkujen määräsot, joihin *R. solanacearum* -bakteeri on lisätty (valmistus ks. lisäyksen 3 B kohta),
- vesisuspensio *R. solanacearum* -bakteerin virulentista isolaatista (esim. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ks. lisäyksen 3 B kohta) saaduista soluista,  $10^6$  solua/ml,
- jos mahdollista, PCR-testissä käytetään myös positiivisista kontrollinäytteistä saatua DNA:ta.

**Mahdollisen kontaminaation välttämiseksi positiiviset kontrollit valmistetaan erillään testinäytteistä.**

Näyteuutteiden olisi oltava mahdollisimman puhtaita mullasta. Joissakin tapauksissa saattaisi siksi olla suositeltavaa valmistaa uutteet pestyistä perunoista, mikäli aiotaan käyttää PCR-testausprotokollia.

Tämän testin yhteydessä käytettäviksi on saatavilla standardoituja positiivisia ja negatiivisia kontrollimateriaaleja, jotka luetellaan lisäyksessä 3.

## 6.1 DNA:n puhdistusmenetelmät

Käytetään edellä kuvattuja negatiivisia ja positiivisia kontrollinäytteitä (ks. lisäys 3).

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

Kohde-DNA:n eristämiseksi kompleksisista näytealustoista on käytettävissä useita eri menetelmiä, joilla voidaan poistaa PCR:n ja muiden entsyymireaktioiden inhibiittorit ja konsentroida kohde-DNA näyteuutteessa. Seuraava menetelmä on optimoitu käytettäväksi lisäyksessä 6 kuvatuilla validoiduilla PCR-menetelmillä.

## a) Pastrikin menetelmä (2000)

- 1) Pipetoidaan 220 µl lyysipuskuria (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) 1,5 ml:n eppendorffputkeen.
- 2) Lisätään 100 µl näyteuutetta ja asetetaan kuumentimelle tai vesihauteeseen 95 °C:ssa 10 minuutin ajaksi.
- 3) Siirretään putki jäihin 5 minuutiksi.
- 4) Lisätään 80 µl lysotsyymikantaliuosta (50 mg lysotsyymia/ml 10 mM Tris HCl:ssa, pH 8,0) ja inkuboidaan 37 °C:ssa 30 minuutin ajan.
- 5) Lisätään 220 µl Easy DNA<sup>®</sup> -liuosta A (Invitrogen), sekoitetaan hyvin vorteksoimalla ja inkuboidaan 65 °C:ssa 30 minuutin ajan.
- 6) Lisätään 100 µl Easy DNA<sup>®</sup> -liuosta B (Invitrogen), vorteksoidaan voimakkaasti, kunnes sakka valuu putkessa vapaasti ja näyte on kauttaaltaan yhtäläisen viskoosi.
- 7) Lisätään 500 µl kloroformia ja vorteksoidaan, kunnes viskositeetti vähenee ja seos on homogeeninen.
- 8) Sentrifugoidaan 15 000 g 20 minuutin ajan 4 °C:ssa faasien erottamiseksi ja interfaasin muodostamiseksi.
- 9) Siirretään yläfaasi puhtaaseen eppendorffputkeen.
- 10) Lisätään 1 ml 100 % etanolia (- 20 °C), vorteksoidaan pikaisesti ja inkuboidaan jäissä 10 minuutin ajan.
- 11) Sentrifugoidaan 15 000 g 20 minuutin ajan 4 °C:ssa ja poistetaan etanoli pelletistä.
- 12) Lisätään 500 µl 80 % etanolia (- 20 °C) ja sekoitetaan kääntelemällä putkea.
- 13) Sentrifugoidaan 15 000 g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa, säästetään pelletti ja poistetaan etanoli.
- 14) Annetaan pelletin kuivua ilmassa tai DNA Speed Vac -laitteessa.
- 15) Suspendoidaan pelletti uudelleen 100 µl:aan steriiliä ultrapuhdasta vettä ja jätetään seisomaan huoneenlämpöön vähintään 20 minuutin ajaksi.
- 16) Varastoidaan - 20 °C:ssa, kunnes näytettä tarvitaan PCR-testissä.
- 17) Erotetaan mahdollinen valkea sakka sentrifugoimalla, ja PCR-määrittämiseen käytetään 5 µl DNA:ta sisältävää liuosta.

## b) Muut menetelmät

Muita DNA:n uuttamismenetelmiä (esim. Qiagen Dneasy Plant Kit) voidaan käyttää, jos niiden on osoitettu olevan yhtä tehokkaita DNA:n puhdistamisessa kontrollinäytteistä, jotka sisältävät  $10^3$ – $10^4$  taudinaiheuttajasolua/ml.

## 6.2 PCR-testi

- 6.2.1 Valmistetaan PCR-testin testi- ja kontrollitemplaattit validoitujen testausprotokollien mukaisesti (VI jakson A kohdan 6 alakohta). Valmistetaan yksi kymmenkertainen laimennos DNA-näyteutetta (1:10 ultrapuhtaaseen veteen).
- 6.2.2 Valmistetaan tarkoituksenmukainen PCR-reaktioseos julkaistujen testausprotokollien mukaisesti (lisäys 6) kontaminaatiolta vapaassa ympäristössä. Jos mahdollista, on suositeltavaa käyttää moninkertaisista PCR-protokollaa, johon sisältyy myös sisäinen PCR-kontrolli.
- 6.2.3 Lisätään 2–5 µl DNA- uutetta 25 µl:aan PCR-reaktioseosta steriileihin PCR-putkiin PCR-protokollien mukaisesti (ks. lisäys 6).
- 6.2.4 Otetaan ainoastaan PCR-reaktioseosta sisältävä negatiivinen kontrollinäyte ja lisätään näytteen sijasta ultrapuhdasta vettä samasta lähteestä, jota käytettiin PCR-seoksessa.
- 6.2.5 Asetetaan putket samaan lämpösyklilaitteeseen, jota käytettiin esitestauksessa, ja ajetaan asianmukaisesti optimoitu PCR-ohjelma (lisäys 6).

## 6.3 PCR-tuotteen määrittäminen

- 6.3.1 Erotetaan PCR-amplikonit agarosigeelielektroforeesilla. Lisätään vähintään 12 µl monistettua DNA-reaktioseosta jokaisesta näytteestä ja sekoitetaan se 3 µl:aan latauspuskuria (lisäys 6) 2,0 % (w/v) agarosigeelissä trisasetaatielektroforeesipuskurissa (TAE) (lisäys 6) ajaen geeliä 5–8 V/cm. Käytetään tarkoituksenmukaista DNA-markkeria, 'esim. 100 emäsparia.'
- 6.3.2 Saatetaan DNA-fragmentit näkyviin värjäämällä näyte etidiumbromidiliuoksessa (0,5 mg/l) 30–60 minuutin ajan huolehtien asianmukaisista varotoimista tämän mutageenin käsittelyssä.
- 6.3.3 Tarkastellaan värjäytynyttä geeliä UV-läpivalaisulla ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) odotetunkokoisten monistettujen PCR-tuotteiden (lisäys 6) löytämiseksi ja dokumentoidaan tiedot.
- 6.3.4 Kaikkien uusien löydösten/tapausten osalta varmistetaan PCR-amplikonin autenttisuus tekemällä restriktioentsyymianalyysi jäljellä olevan monistetun DNA:n näytteelle inkuboimalla optimilämpötilassa ja -ajassa tarkoituksenmukaisella entsyymillä ja puskurilla (ks. lisäys 6). Määritetään pilkotut fragmentit agarosigeelielektroforeesilla kuten edellä ja tarkkaillaan tyypillistä restriktiofragmenttikuviota UV-läpivalaisulla etidiumbromidivärjätksen jälkeen ja verrataan pilkkoutumattomiin ja pilkottuihin positiivisiin kontrolliin.

### PCR-testin tulosten tulkinta

PCR-testin tulos on negatiivinen, jos odotetunkokoista *R. solanacearum* -spesifistä PCR-amplikonina ei todeta kyseisestä näytteestä, mutta se todetaan kaikista positiivisista kontrollinäytteistä (kun on kyse moninkertaisista PCR-tuotteista, joilla on kasveille spesifiset sisäiset kontrollialukkeet: toinen odotetunkokoinen PCR-tuote on monistettava kyseisellä näytteellä).

PCR-testin tulos on positiivinen, jos odotetunkokoinen *R. solanacearum* -spesifinen PCR-amplikoni ja odotettu restriktioreaktio (jos sellaista vaaditaan) todetaan edellyttäen, että sitä ei ole monistettu mistään negatiivisesta kontrollinäytteestä. Positiivisen tuloksen luotettava varmistus voidaan saada myös toistamalla testi toisilla PCR-alukkeilla (lisäys 6).

**Huomautus:** PCR:n inhibitiota voidaan epäillä, jos odotettu amplikoni saadaan positiivisesta kontrollinäytteestä, joka sisältää *R. solanacearum* -bakteeria vedessä, mutta negatiiviset tulokset saadaan positiivisista kontrolleista, jotka sisältävät *R. solanacearum* -bakteeria perunauutteessa. Moninkertaisten reaktioiden määritykseen perustuissa PCR-testausprotokollissa, joissa on mukana sisäinen PCR-kontrolli, reaktion inhibitio näyttää olevan kyseessä silloin, jos ei saada kumpaakaan näistä kahdesta amplikonista.

Saastunutta voidaan epäillä, jos odotettua amplikonina ei saada yhdestä tai useammasta negatiivisesta kontrollista.

## 7. FISH-testi

## Periaate

Kun FISH-testiä käytetään ensimmäisenä seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, toisena pakollisena seulontatestinä on tehtävä eristystesti tai IF-testi. Kun FISH-testiä käytetään toisena seulontatestinä ja siitä saadaan positiivinen tulos, vuokaavion mukainen lisättestaus on tarpeen määrityksen tekemiseksi.

**Huomautus:** Käytetään valdoiduja *R. solanacearum* -spesifisiä oligokoettimia (lisäys 7). Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan toistettavasti todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin näyteuutteisiin lisätyt *R. solanacearum* -bakteerin solut vähintään pitoisuudella  $10^3$ – $10^4$ /ml.

Menettely voidaan tarvittaessa kuitenkin tehdä näyteuutteille, joita on säilytetty glyserolissa – 16— 24 °C:ssa tai – 68— 86 °C:ssa.

Negatiivisina kontrolleina käytetään sellaisia näyteuutteen osia, jotka on aiemmin testattu *R. solanacearum* -bakteerin osalta negatiivisiksi.

Positiivisiksi kontrolleiksi valmistetaan suspensioita, jotka sisältävät  $10^5$ – $10^6$  solua/ml *R. solanacearum* -bakteerin biovaria 2 (esim. kanta NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, ks. lisäys 3) 0,01 M fosfaattipuskurissa (PB) 3–5 vuorokauden viljelmästä. Valmistetaan erilliset positiiviset kontrollilevyt *R. solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta tai mistä tahansa muusta vertailukannasta, jotka on suspendoitu perunauutteeseen, kuten lisäyksen 3 B kohdassa täsmennetään.

FITC-leimatun eubakteriaalisen oligokoettimen käyttö toimii kontrollina hybridisaatioprosessissa, sillä se värjää kaikki näytteessä olevat eubakteerit.

Tämän testin yhteydessä käytettäviksi on saatavilla standardoituja positiivisia ja negatiivisia kontrollimateriaaleja, jotka luetellaan lisäyksen 3 A kohdassa.

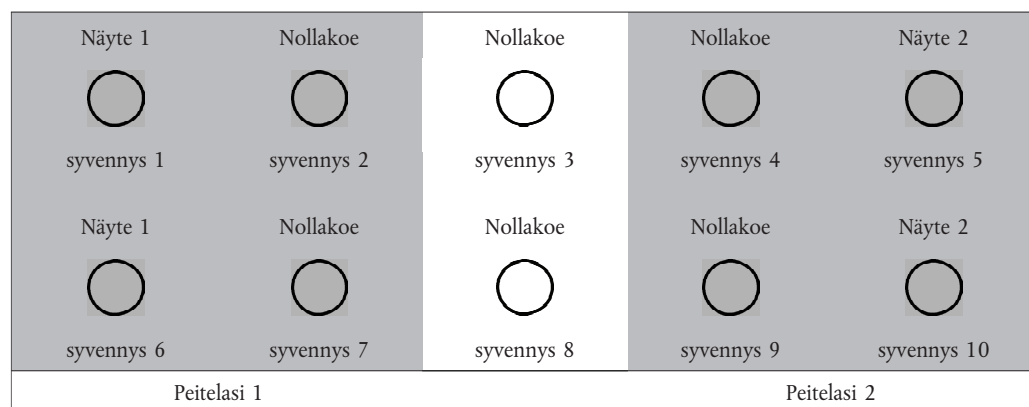
Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

## 7.1 Perunauutteen fiksointi

Seuraava testausprotokolla on peräisin lähteestä Wullings *et al.*, (1998):

- 7.1.1 Valmistetaan kiinniteliuos (ks. lisäys 7).
- 7.1.2 Pipetoidaan 100 µl kustakin näyteuutteesta eppendorffputkeen ja sentrifugoidaan 7 minuuttia 7 000 g:ssä.
- 7.1.3 Poistetaan supernatantti ja liuotetaan sakka 200 µl:aan kiinniteliuosta, joka on valmistettu < 24 tuntia aiemmin. Sekoitetaan vorteksilla ja inkuboidaan tunnin ajan jääkaapissa.
- 7.1.4 Sentrifugoidaan 7 minuutin ajan 7 000 g:ssä, poistetaan supernatantti ja suspensoidaan pelletti uudelleen 75 µl:aan 0,01 M fosfaattipuskuria (ks. lisäys 7).
- 7.1.5 Tiputetaan 16 µl kiinnitettyjä suspensioita kuvassa 7,1 esitetylle puhtaalle monitestilevyille. Laitetaan kullekin levyille 2 laimentamatonta eri näytettä ja käytetään 10 µl 1/100-laimennoksen (0,01 M:ssa fosfaattipuskuria) tekemiseksi. Jäljellä oleva näyteliuos (49 µl) voidaan varastoida - 20 °C:ssa, kun siihen on lisätty 1 tilavuus 96-prosenttista etanolia. Jos FISH-testi on toistettava, poistetaan etanoli sentrifugoimalla ja lisätään sama määrä 0,01 M fosfaattipuskuria (sekoitetaan vorteksilla).

Kuvio 7.1 FISH-levy





7.1.6 Ilmakuivataan levyt (tai kuivataan ne levynkuivaajalla 37 °C:ssa) ja kiinnitetään ne liekittämällä.

Tässä vaiheessa menettely voidaan keskeyttää, ja hybridisaatiota voidaan jatkaa seuraavana päivänä. Levyt olisi säilytettävä pölyltä suojassa ja kuivassa paikassa huoneenlämmössä.

## 7.2 Hybridisaatio

7.2.1 Poistetaan soluista vesi vaiheittain 50-, 80- ja 96-prosenttisisä etanolissa minuutin ajan kussakin. Ilmakuivataan levyt levynpidikkeessä.

7.2.2 Valmistellaan kostea inkubaatiokammio peittämällä ilmatiiviin laatikon pohja paperi- tai suodatinpaperilla, joka on kastettu 1X hybmixiin (lisäys 7). Esi-inkuboidaan laatikko hybridisaatiouunissa 45 °C:ssa vähintään 10 minuutin ajan.

7.2.3 Asetetaan 10 µl hybridisaatioliuosta (lisäys 7) kunkin levyn 8 syvennykseen (syvennykset 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9 ja 10; ks. kuva 7.1) siten, että kaksi keskimmäistä syvennystä (3 ja 8) jäävät tyhjiksi.

7.2.4 Asetetaan peitelasit (24 × 24 mm) ensimmäiseen ja neljään viimeiseen syvennykseen siten, että väliin ei jää ilmaa. Laitetaan levyt esilämmitettyyn kosteaan kammioon ja hybridisoidaan 5 tuntia pimeässä uunissa 45 °C:ssä.

7.2.5 Valmistetaan 3 dekanterilasia, joiden koostumus on seuraava: 1 l Milli Q (molekyylisuodattimilla puhdistettua) -vettä, 1 l 1X hybmix (334 ml 3X hybmix ja 666 ml Milli Q -vettä) ja 1 l 1/8X hybmix (42 ml 3X hybmix ja 958 ml Milli Q -vettä). Esi-inkuboidaan kukin vesihauteessa 45 °C:ssa.

7.2.6 Poistetaan peitelasit levyiltä ja asetetaan levyt levytelineeseen.

7.2.7 Pestään ylimääräinen koetin inkuboimalla 15 minuutin ajan dekanterilasissa, jossa on 1X hybmix, 45 °C:ssa.

7.2.8 Siirretään levyteline 1/8X hybmix -pesuliuokseen ja inkuboidaan vielä 15 minuutin ajan.

7.2.9 Kastetaan levyt pikaisesti Milli Q -veteen ja asetetaan ne suodatinpaperille. Poistetaan liiallinen kosteus peittämällä pinta kevyesti suodatinpaperilla. Pipetoidaan 5–10 µl haalistumiselta suojaavaa peittäusainetta (esim. Vectashield, Vecta Laboratories, CA, USA, tai vastaavaa) jokaiseen syvennykseen ja asetetaan iso peitelasi (24 × 60 mm) koko levyn päälle.

## 7.3 FISH-testin lukeminen

7.3.1 Tutkitaan levyt välittömästi mikroskoopilla, joka on varustettu epifluoresoivalla valonlähteellä, öljyimmissio-objektiivin 630–1 000-kertaisella suurennoksella. FITC:iin sopivilla suodattimilla näytteen eubakteerisolut (mukaan luettuina useimmat gramnegatiiviset solut) fluoresoivat vihreinä. Kun käytetään tetrametyylirodamiini-5-isotiosyanaatille tarkoitettua suodatinta, Cy3-värjätyt *R. solanacearum* -bakteerin solut näkyvät fluoresoivan punaisina. Verrataan solujen morfologiaa positiivisten kontrollien morfologiaan. Solujen on oltava kirkkaasti fluoresoivia ja täydellisesti värjäytyneitä. FISH-testi (VI jakson A kohdan 7 alakohta) on toistettava, jos värjäytyminen on poikkeavaa. Tutkitaan syvennyksiä tarkasti kohtisuoraan kahden halkaisijan suuntaisesti ja pitkin aukon kehää. Näyteistä, joissa ei näy yhtään tai vain hyvin vähän soluja tarkastellaan vähintään 40 mikroskooppikenttää.

7.3.2 Tarkastellaan testisyvennyksissä kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen *R. solanacearum* -bakteerille (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)). Fluoresenssin intensiteetin on vastattava vähintään positiivisen kontrollikannan fluoresenssin intensiteettiä. Sellaisia soluja, joiden värjäytyminen on epätäydellistä tai joiden fluoresenssi on heikko, ei oteta huomioon.

7.3.3 Jos epäillään kontaminaatiota, testi on toistettava. Näin saattaa käydä, jos kaikilla erän levyillä on positiivisia soluja puskurin saastumisen vuoksi tai jos positiivisia soluja löytyy (levyn syvennysten ulkopuolelta) levyn kalvolta.

7.3.4 FISH-testin spesifisyyteen liittyy useita ongelmia. Perunan napapäiden ja varren palasten sakassa saattaa esiintyä morfologisesti epätyypillisiä fluoresoivien solujen ja *R. solanacearum* -bakteerin kanssa kooltaan ja morfologialtaan samanlaisten ristiin reagoivien saprofyttisten bakteerien populaatioita, vaikkakin huomattavasti harvemmin kuin IF-testissä.

7.3.5 Ainoastaan ne fluoresoivat solut, jotka ovat kooltaan ja morfologialtaan tyypillisiä, on otettava huomioon.

7.3.6 FISH-testin tulosten tulkinta

- i) FISH-testistä saadaan validit tulokset, jos FITC-suodatinta käyttäen havaitaan kirkkaan vihreitä fluoresoivia soluja, joiden koko ja morfologia on *R. solanacearum* -bakteerille tyypillinen, ja jos rodamiinisuoatinta käyttäen havaitaan kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja kaikissa positiivissa kontrolleissa muttei yhdessäkään negatiivisessa kontrollissa. Jos näytteestä löytyy kirkkaasti fluoresoivia soluja, joiden morfologia on tyypillinen, arvioidaan tyypillisten solujen keskimääräinen lukumäärä mikroskooppikenttää kohden ja lasketaan näiden solujen lukumäärä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden (lisäys 4). Näytteitä, joissa on vähintään  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, pidetään mahdollisesti saastuneina. Lisätestaus on tarpeen. Näytteitä, joissa on vähemmän kuin  $5 \times 10^3$  tyypillistä solua uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohden, pidetään negatiivisina.
- ii) FISH-testin tulos on negatiivinen, jos rodamiinisuoatinta käyttäen ei havaita kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja, joiden koko ja morfologia on *R. solanacearum* -bakteerille tyypillinen edellyttäen, että tyypillisiä kirkkaan punaisia fluoresoivia soluja havaitaan positiivisissa kontrollivalmisteissa silloin, kun käytetään rodamiinisuoatinta.

## 8. ELISA-testi

### Periaate

ELISA-testiä voidaan käyttää ainoastaan valinnaisena testin IF-, PCR- tai FISH-testin lisäksi, koska testin herkkyys on verrattain alhainen. Kun käytetään DAS ELISA -testiä, rikastus ja monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö ovat pakollisia (ks. [www-sivusto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)). Näytteiden rikastus ennen ELISA-testin käyttöä voi olla hyödyllistä testin herkkyyden parantamiseksi, mutta se voi epäonnistua näytteessä olevien muiden organismien kilpailun vuoksi.

**Huomautus:** Käytetään validoitua *R. solanacearum* -vasta-aineiden lähdettä (ks. [www-sivusto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)). On suositeltavaa määrittää titteri kullekin uudelle vasta-aine-erälle. Titteri määritellään korkeimmaksi laimennokseksi, jolla optimaalinen reaktio tapahtuu, kun testataan suspensiota, joka sisältää millilitraa kohden  $10^5$ – $10^6$  *R. solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta saatua solua, ja kun käytetään sopivia sekundaareja vasta-ainekonjugaatteja valmistajan suositusten mukaisesti. Testauksen aikana vasta-aineita olisi käytettävä lähellä kaupallisesti saatavilla olevaa titteriä olevassa tai titterin suuruudessa työskentelylaimennoksessa.

Määritetään vasta-aineiden titteri suspensiossa, jossa on millilitraa kohden  $10^5$ – $10^6$  solua *R. solanacearum* -bakteerin homologisesta kannasta.

Negatiiviksi kontrolleiksi otetaan näyteute, joka on aiemmin testattu negatiiviseksi *R. solanacearum* -bakteerin osalta, sekä fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS) oleva bakteeri, joka ei reagoi ristiin.

Positiivisena kontrollina käytetään sellaisia näyteuutteen osia, jotka on aiemmin testattu *R. solanacearum* -bakteerin osalta negatiivisiksi ja joihin on sekoitettu millilitraa kohden  $10^3$ – $10^4$  *R. solanacearum* -bakteerin biovarin 2 solua (esim. kanta NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857, ks. lisäyksen 2 A ja B kohta). Tulosten vertailemiseksi kullakin levyllä käytetään standardiliuosta, jossa on millilitraa kohden  $10^5$ – $10^6$  *R. solanacearum* -solua fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. On varmistettava, että positiiviset kontrollit on tarkoin erotettu testattavista näytteistä mikrotitterilevyllä.

Tämän testin yhteydessä käytettäväksi on saatavilla standardoituja positiivisia ja negatiivisia kontrollimateriaaleja, jotka luetellaan lisäyksen 3 A kohdassa.

Testataan kontrollimateriaali samalla tavoin kuin näyte (näytteet).

Kaksi ELISA-protokollaa on validoitu.

a) Epäsuora ELISA (Robinson Smith *et al.*, 1995)

- 1) Käytetään 100–200 µl näyteuutteen osia. (Kuumentaminen 100 °C:ssa 4 minuutin ajan vesihautteessa tai kuumentimella voi joissakin tapauksissa vähentää ei-spesifisiä tuloksia.)
- 2) Lisätään sama tilavuusmäärä väkevyydeltään kaksinkertaista kiinnityspuskuria (lisäys 4) ja sekoitetaan vorteksilla.
- 3) Lisätään 100 µl:aa kuhunkin, vähintään kahteen, mikrotitterilevyn syvennykseen (esim. Nunc-Polysorp tai vastaava). Inkuboidaan tunnin ajan 37 °C:ssa tai yön yli 4 °C:ssa.

- 4) Kaadetaan uutteen pois syvennyksistä. Pestään syvennykset kolme kertaa PBS-Tweenillä (lisäys 4) siten, että viimeinen pesuliuos jätetään syvennyksiin vähintään 5 minuutiksi.
- 5) Valmistetaan sopiva laimennos *R. solanacearum* -bakteerin vasta-aineista estopuskuriin (lisäys 4). Validoiduista kaupallisista vasta-aineista käytetään suositeltuja laimennoksia (yleensä kaksinkertainen konsentraatio titteriin verrattuna).
- 6) Lisätään 100 µl kuhunkin syvennykseen ja inkuboidaan tunnin ajan 37 °C:ssa.
- 7) Kaadetaan vasta-aineliuos syvennyksistä ja pestään kuten edellä (kohta 4).
- 8) Valmistetaan sopiva laimennos sekundaarista vasta-aine-emäsfosfataasikonjugaattia estopuskuriin. Lisätään 100 µl kuhunkin syvennykseen ja inkuboidaan tunnin ajan 37 °C:ssa.
- 9) Kaadetaan konjugaattivasta-aine syvennyksistä ja pestään kuten edellä (kohta 4).
- 10) Lisätään 100 µl emäksistä fosfataasisubstraattiliuosta (lisäys 4) kuhunkin syvennykseen. Inkuboidaan pimeässä huoneenlämmössä ja mitataan absorbanssi 405 nm:ssä säännöllisesti 90 minuutin välein.

b) DASI ELISA

- 1) Valmistetaan sopiva laimennos *R. solanacearum* -bakteerin polyklonaalisista immunoglobuliinivasta-aineista kiinnityspuskuriin, pH 9,6 (lisäys 4). Lisätään 200 µl kuhunkin syvennykseen. Inkuboidaan 37 °C:ssa 4–5 tunnin ajan tai 4 °C:ssa 16 tunnin ajan.
- 2) Pestään syvennykset kolme kertaa PBS-Tweenillä (lisäys 4).  
  
Lisätään 190 µl näyteutetta vähintään kahteen syvennykseen. Lisätään myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit kahteen syvennykseen kullakin levyllä. Inkuboidaan 16 tunnin ajan 4 °C:ssa.
- 3) Pestään syvennykset kolme kertaa PBS-Tweenillä (lisäys 4).
- 4) Valmistetaan sopiva laimennos *R. solanacearum* -bakteerille spesifisistä monoklonaalisista vasta-aineista fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS) (lisäys 4), joka sisältää myös 0,5 % naudan seerumin albumiinia (BSA), ja lisätään 190 µl kuhunkin syvennykseen. Inkuboidaan kahden tunnin ajan 37 °C:ssa.
- 5) Pestään syvennykset kolme kertaa PBS-Tweenillä (lisäys 4).
- 6) Valmistetaan sopiva laimennus hiiren vasta-aineimmunoglobuliineja konjugoituna emäksiseen fosfataasiin fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa. Lisätään 190 µl kuhunkin syvennykseen. Inkuboidaan kahden tunnin ajan 37 °C:ssa.
- 7) Pestään syvennykset kolme kertaa PBS-Tweenillä (lisäys 4).
- 8) Valmistetaan emäksinen fosfataasisubstraattiliuos, jossa on 1 mg p-nitrofenyylyfosfaattia substraattipuskuriin millilitraa kohden (lisäys 4). Lisätään 200 µl kuhunkin syvennykseen. Inkuboidaan pimeässä huoneenlämmössä ja mitataan absorbanssi 405 nm:ssä säännöllisesti 90 minuutin välein.

ELISA-testitulosten tulkinta

ELISA-testi on negatiivinen, jos kahden näytteen keskimääräinen optinen tiheys (OD) on  $< 2 \times$  negatiivisen kontrollinäytesyvennyksen OD, sillä edellytyksellä, että kaikkien positiivisten kontrollien OD on suurempi kuin 1,0 (kun kontrolleja on inkuboitu 90 minuutin ajan substraatin kanssa) ja enemmän kuin kaksinkertainen negatiivista näyteutesta saatuun OD:hen verrattuna.

ELISA-testi on positiivinen, jos kahden näytesyvennyksen keskimääräinen OD on  $> 2 \times$  negatiivisen näyteutteen syvennyksen OD, sillä edellytyksellä, että kaikkien negatiivisten kontrollisyvennyksien OD on  $< 2 \times$  positiivisten kontrollisyvennyksien OD.

Negatiivinen ELISA-tulos positiivisissa kontrollisyvennyksissä osoittaa, että testiä ei ole tehty oikein tai se on inhi-  
boitunut. Positiiviset ELISA-tulokset negatiivisissa kontrollisyvennyksissä ilmaisevat, että testissä on tapahtunut risti-  
kontaminaatiota tai epäspesifistä vasta-aineen sitoutumista.

## 9. Biologinen määrittäminen

*Huomautus:* Alustavan testauksen tällä menetelmällä pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta aiemmin negatiivisiksi testattuihin  
näyteuutteisiin lisätyt *R. solanacearum* -bakteerin pesäkkeitä muodostavat yksiköt ( $10^3$ – $10^4$ ) (valmistus ks. lisäys 3).  
Testi on voitava toistaa.

Suurinta todentamisherkkyyttä voidaan odottaa, kun käytetään vasta valmistettua näyteuutetta optimaalisissa kas-  
vuolosuhteissa. Menetelmää voidaan kuitenkin käyttää menestyksekkäästi myös sellaisiin uutteisiin, joita on varas-  
toitu glyserolissa - 68– 86 °C:ssa.

Seuraava testausprotokolla on peräisin lähteestä Janse (1988):

- 9.1 Testikasveina käytetään 10 kasvia, jotka ovat taudille altista kolmilehtiasteella olevaa tomaattilajiketta (esim. Money-  
maker tai lajike, jonka alttiuden testilaboratorio on määrittänyt vastaavaksi). Viljelyn yksityiskohdista tarkemmin  
ks. lisäys 8. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää munakoisoja (esim. lajike Black Beauty tai lajikkeet, joiden alttius on  
vastaava). Käytetään ainoastaan kasveja, jotka ovat kaksi- tai kolmilehtiasteella ja enintään todellisen kolman-  
nen lehden täyteen puhkeamiseen asti. Munakoison oireiden on osoitettu olevan lievempiä ja kehittyvän hitaam-  
min. Tämän vuoksi suositellaan mahdollisuuksien mukaan tomaatin taimien käyttöä.

- 9.2 Jaetaan 100 µl näyteuutetta testikasvien kesken.

### 9.2.1 Inokulointi injektioimalla

Inokulointi tehdään ruiskulla, joka on varustettu hypodermisellä neulalla (vähintään 23G), kasvin varsiin juuri sirk-  
kalehtien yläpuolelle. Näyte jaetaan testikasvien kesken.

### 9.2.2 Inokulointi viiltämällä

Pidellään kasvia kahden sormen välissä ja tiputetaan pipetillä pisara (noin 5–10 µl) suspendoitua sakkaa varren  
päälle sirkkalehtien ja ensimmäisen kasvulehden väliin.

Tehdään steriilillä leikkausveitsellä sakan pisarasta lähtien vinosti poikittainen noin 1 cm:n viilto, jonka syvyys on  
noin kaksi kolmannesta varren paksuudesta.

Suljetaan viilto steriilillä vaseliinilla ruiskua käyttäen.

- 9.3 Inokuloidaan samalla tekniikalla viisi taimea positiivisena kontrollina vesisuspensiolla, jossa on  $10^5$ – $10^6$  solua/ml  
virulenttia *R. solanacearum* -bakteerin biovarin 2 kantaa (positiivinen kontrolli) 48 tunnin viljelmästä, ja negatiivi-  
sena kontrollina sakkapuskurilla (lisäys 4). Kasvit, joita käytetään positiivisena ja negatiivisena kontrollina, pidetään  
erillään muista kasveista ristikontaminaation estämiseksi.

- 9.4 Kasvatetaan testikasveja karanteenioloissa enintään 4 viikon ajan 25–30 °C:ssa ja korkeassa suhteellisessa kosteu-  
dessa sopivasti kastellen siten, että vältetään sekä vettä että toisaalta kuivuminen vedenpuutteen vuoksi. Saas-  
tunnan välttämiseksi inkuboidaan positiiviset ja negatiiviset kontrollikasvit selkeästi toisistaan erotettuihin penkkeihin  
kasvihuoneessa tai kasvatuskammioissa tai, jos tilaa on rajoitetusti, huolehditaan siitä, että käsittelyt tehdään tiu-  
kasti toisistaan erillään. Jos eri näytteisiin kuuluvat kasvit on inkuboitava lähellä toisiaan, ne on eroteltava asianmu-  
kaisilla suojilla. Lannoitettaessa, kasteltaessa tai tutkimuksia ja muita toimenpiteitä tehtäessä on huolellisesti vältettävä  
ristikontaminaatio. Kasvihuoneisiin ja kasvatuskammioihin ei ehdottomasti saa päästä mitään hyönteistuholaisia,  
sillä ne saattavat siirtää bakteeria näytteestä toiseen.

Tarkkaillaan nuutumisoireita, epinastiaa, kloroosia ja/tai hidastunutta kasvua.

- 9.5 Tartunnan saaneista kasveista eristetään (II jakson 3 kohta) ja tunnistetaan oletetun *R. solanacearum* -bakteerin puhtaat viljelmät (VI jakson B kohta).
- 9.6 Jos 3 viikon jälkeen ei havaita oireita, tehdään IF-, PCR- tai eristystesti kokoomanäytteelle, jossa on kustakin testikasvista 1 cm:n mittaisia varren palasia, jotka on otettu inokulointipaikan yläpuolelta. Jos testi on positiivinen, tehdään laimennussarja (alakohta 4.1).
- 9.7 Tunnistetaan mahdolliset oletetun *R. solanacearum* -bakteerin puhtaat viljelmät (VI jakson B kohta).

#### Biologisen määrittelyn tulosten tulkinta

Biologisesta määrittämisestä saadaan validit tulokset, jos positiivisen kontrollin kasveissa näkyy tyypillisiä oireita, bakteerit voidaan eristää uudelleen näistä kasveista ja negatiivisista kontrolleista ei löydy oireita.

Biologisen määrittelyn tulos on negatiivinen, jos testikasveissa ei ole *R. solanacearum* -bakteerin aiheuttamaa tartuntaa ja *R. solanacearum* -bakteeri todetaan positiivisista kontrolleista.

Biologisen määrittelyn tulos on positiivinen, jos testikasveissa on *R. solanacearum* -bakteerin aiheuttama tartunta.

#### B) TUNNISTUSTESTIT

Tunnistetaan oletettujen *R. solanacearum* -isolaattien puhtaat viljelmät käyttäen ainakin kahta seuraavista eri biologisiin periaatteisiin perustuvista testeistä.

Sisällytetään tarvittaessa tunnetut vertailukannat kuhunkin testiin (ks. lisäys 3).

#### 1. Ravintokokeet ja entsyymaattiset tunnistustestit

Määritetään seuraavat fenotyyppiset ominaisuudet, jotka yleisesti joko esiintyvät *R. solanacearum* -bakteerissa tai puuttuvat siitä. Käytetään seuraavissa lähteissä kuvattuja menetelmiä: Lelliott ja Stead (1987), Klement *et al.* (1990) ja Schaad (2001).

Testi	Tavoiteltavat tulokset
Fluoresoivan pigmentin muodostus-	
Poly-β-hydroksibutyraatti-inkluusiot	+
Hapettumis-/käymistesti (O/F)	O+/F-
Katalaasi aktiivisuus	+
Kovacin oksidaasitesti	+
Nitraatin pelkistyminen	+
Sitraatin käyttö	+
Kasvu 40 °C:ssa	-
Kasvu 1-prosenttisessä NaCl:ssa	+
Kasvu 2-prosenttisessä NaCl:ssa	-
Arginiinidihydrolaasin aktiivisuus	-
Gelatiinin nesteytyminen	-
Tärkkelyksen hydrolyysi	-
Eskuliinin hydrolyysi	-
Levaanin tuotanto	-

#### 2. IF-testi

- 2.1 Valmistetaan suspensio (noin 10<sup>6</sup> solua/ml) IF-puskuriin (lisäys 4).
- 2.2 Valmistetaan kaksinkertaisia laimennoksia tarkoituksenmukaisesta antiseerumista (ks. [www-sivusto osoitteessa http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main)).
- 2.3 Sovelletaan IF-menettelyä (VI jakson A kohdan 5 alakohta).
- 2.4 IF-testistä saadaan positiivinen tulos, jos viljelmän IF-titteri vastaa positiivisen kontrollin titteriä.

### 3. ELISA-testi

*Huomautus:* Jos tehdään ainoastaan kaksi tunnistustestiä, ei tämän menetelmän lisäksi käytetä muuta serologista testiä.

- 3.1 Valmistetaan suspensio (noin  $10^8$  solua/ml) 1X PBS -puskuriin (lisäys 4).
- 3.2 Toteutetaan soveltuva ELISA-menettely *R. solanacearum* -taudinaiheuttajalle spesifisellä monoklonaalisella vasta-aineella.
- 3.3 Positiivinen ELISA-testitulos saadaan, jos viljelmästä saatu ELISA-tulos on vähintään puolet positiivisen kontrollin tuloksesta.

### 4. PCR-testi

- 4.1 Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) molekyyliuodattimilla puhdistettuun veteen.
- 4.2 Kuumennetaan 100 µl solususpensiota suljetuissa putkissa kuumentimessa tai kiehuvaan vesihauteeseen 100 °C:ssa 4 minuutin ajan. Näytteet voidaan varastoida -16–24 °C:ssa, kunnes niitä tarvitaan.
- 4.3 Sovelletaan tarkoituksenmukaisia PCR-menettelyjä *R. solanacearum* -spesifisten amplikonien monistamiseksi (esim. Seal *et al.* (1993); Pastrik and Maiss (2000); Pastrik *et al.* (2002); Boudazin *et al.* (1999); Opina *et al.* (1997), Weller *et al.* (1999)).
- 4.4 *R. solanacearum* -bakteerin positiivinen tunnistus toteutuu, jos PCR-amplikonit ovat samankokoisia kuin positiivisen kontrollikannan amplikonit ja niillä esiintyy samaa restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa.

### 5. FISH-testi

- 5.1 Valmistetaan suspensio (noin  $10^6$  solua/ml) ultrapuhtaaseen veteen.
- 5.2 Käytetään FISH-menettelyä (VI jakson A kohdan 7 alakohta) vähintään kahdella *R. solanacearum* -spesifisellä oligokoottimella (lisäys 7).
- 5.3 FISH-testistä saadaan positiivinen tulos, jos viljelmästä ja positiivisesta kontrollista saadaan samat reaktiot.

### 6. Rasvahappoprofilointi (FAP)

- 6.1 Kasvatetaan viljelmä tryptikaasi-soija-agarissa (Oxoid) 48 tunnin ajan 28 °C:ssa.
- 6.2 Tehdään tarkoituksenmukainen FAP-testi (Janse, 1991; Stead, 1992).
- 6.3 FAP-testistä saadaan positiivinen tulos, jos oletetun viljelmän profiili on identtinen positiivisen kontrollin profiiliin kanssa. Tyypillisten rasvahappojen esiintyminen on seuraava: 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2OH ja 18:1 2OH, ja 16:0 3OH:n puuttuminen on erittäin vahva osoitus *Ralstonia* sp:stä.

### 7. Kantojen määrittämismenetelmät

Kannan määrittystä jollakin seuraavista menetelmistä suositellaan kaikissa uusissa *R. solanacearum* -bakteerin eristämistapauksissa.

Sisällytetään tarvittaessa tunnetut vertailukannat kuhunkin testiin (ks. lisäys 3).

#### 7.1 Biovarin määrittäminen

*R. solanacearum* -bakteerin biovarit erotetaan kolmen disakkaridin ja kolmen heksoosialkoholin käyttö- ja/tai hapetuskyvyn perusteella (Hayward, 1964 ja Hayward *et al.*, 1990). Biovaritestin kasvualustat kuvataan lisäyksessä 2. Testi voidaan tehdä inokuloimalla kasvualusta pistämällä siihen *R. solanacearum* -bakteerin isolaattien puhdasta viljelmää ja inkuboimalla 28 °C:ssa. Jos kasvualustat laitetaan steriileihin 96-syvennyksen soluviljelmävevyihin (200 µl/syvennys), 72 tunnin kuluessa voidaan havaita värinmuutos oliivinvihreästä keltaiseksi, mikä osoittaa positiivisen testituloksen.

	Biovari				
	1	2	3	4	5
Käyttö:					
Maltoosi	–	+	+	–	+
Laktoosi	–	+	+	–	+
D (+) sellobioosi	–	+	+	–	+
Mannitoli	–	–	+	+	+
Sorbitoli	–	–	+	+	–
Dulsiitoli	–	–	+	+	–

Lisätesteillä biovari 2 jaetaan alafenotyyppeihin.

	Biovari 2A (esiintyy maailmanlaajuisesti)	Biovari 2A (esiintyy Chiessä ja Kolumbiassa)	Biovari 2T (esiintyy tropiikissa)
Trehaloosin käyttö	–	+	+
Meso-inositolin käyttö	+	–	+
D-riboosin käyttö	–	–	+
Pektolyttinen aktiivisuus (1)	vähäinen	vähäinen	suuri

(1) Ks. Lelliott and Stead (1987).

## 7.2 Genomien sormenjäljet

*R. solanacearum* -kompleksin kantojen molekulaarinen erottaminen voi tapahtua useilla menetelmillä. Näitä ovat

7.2.1 RFLP-analyysi (Restriction fragment length polymorphism analysis) (Cook *et al.*, 1989).

7.2.2 Toistuvan järjestyksen PCR, jossa käytetään REP-, ERIC- ja BOX-alueita (primers) (Louws *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995).

7.2.3 AFLP-analyysi (Amplified fragment length polymorphism) (Van der Wolf *et al.*, 1998).

## 7.3 PCR-menetelmät

Spesifisiä PCR-alueita (primers) (Pastrik *et al.*, 2002; ks. lisäys 6) voidaan käyttää alunperin RFLP-analyysillä (Cook *et al.*, 1989) ja 16S rDNA -sekvensoinnilla (Taghavi *et al.*, 1996) *R. solanacearum* -bakteerin luokkaan 1 (biovarit 3, 4 ja 5) sekä luokkaan 2 (biovarit 1, 2A ja 2T) kuuluvien kantojen erottamiseksi.

## C) VARMISTUSTESTI

Patogeenisyydestä on tehtävä *R. solanacearum* -bakteerin määrittämisen lopulliseksi varmistamiseksi ja *R. solanacearum* -bakteeriksi tunnistettujen viljelmien virulenssin arvioimiseksi.

- 1) Valmistetaan inokulaatti (noin  $10^6$  solua/ml) testattavan isolaatin 24–48 tunnin viljelmästä ja *R. solanacearum* -bakteerin asianmukaisesta positiivisesta kontrollikannasta (esim. NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857; ks. lisäys 3).
- 2) Inokuloidaan 5–10 taudille altista tomaatin tai munakoison taimea niiden kolmilehtiasteella (ks. VI jakson A kohdan 9 alakohta).

- 3) Inkuboidaan enintään 2 viikon ajan 25–28 °C:ssa ja korkeassa suhteellisessa kosteudessa sopivasti kastellen siten, että vältetään sekä vettyminen että toisaalta kuivuusstressi. Puhtailla viljelmillä pitäisi 14 päivän kuluessa saavuttaa tyypillinen kasvin nuutuminen. Jos oireita ei ole tämän ajan kuluessa ilmaantunut, ei voida vakuuttaa siitä, että olisi kyse *R. solanacearum* -bakteerin patogeenisen muodon kasvustosta.
  - 4) Tarkkaillaan nuutumisoireita, epinastiaa, kloroosia ja hidastunutta kasvua.
  - 5) Eristetään kasveista, joilla esiintyy oireita, poistamalla pätkä varresta noin 2 cm inokulaatiokohdan yläpuolelta. Pienennetään ja suspendoidaan pieneen määrään steriiliä tislattua vettä tai 50 mM fosfaattipuskuria (lisäys 4). Eristetään suspensiosta levittämällä laimennos tai sivelemällä soveltuvalle alustalle, mieluiten selektiiviselle alustalle (lisäys 2), inkuboidaan 48–72 tuntia 28 °C:ssa ja tutkitaan, muodostuuko *R. solanacearum* -bakteerille tyypillisiä pesäkkeitä.
-



## Lisäys 1

## Optimointi- ja validointimenettelyissä mukana olevat laboratoriot

Laboratorio (1)	Paikka	Maa
Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit	Wien ja Linz	Itävalta
Departement Gewasbescherming	Merelbeke	Belgia
Plantedirektoratet	Lyngby	Tanska
Central Science Laboratory	York	Englanti
Scottish Agricultural Science Agency	Edinburgh	Skotlanti
Laboratoire national de la protection des végétaux, Unité de Bactériologie	Angers	Ranska
Laboratoire national de la protection des végétaux, Station de quarantaine de la pomme de terre	Le Rheu	Ranska
Biologische Bundesanstalt	Kleinmachnow	Saksa
Pflanzenschutzamt Hannover	Hannover	Saksa
State Laboratory	Dublin	Irlanti
Dipartimento di Scienze e Tecnologia Agroambientali	Bologna	Italia
Regione Veneto Unità Periferica per i Servizi Fitosanitari	Verona	Italia
Nederlandse Algemene Keuringsdienst	Emmeloord	Alankomaat
Plantenziektenkundige Dienst	Wageningen	Alankomaat
Direcção-Geral de Protecção das Culturas	Lissabon	Portugali
Centro de Diagnostico de Aldearrubia	Salamanca	Espanja
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias	Valencia	Espanja
Sveriges lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences)	Upsala	Ruotsi

(1) Yhteyshenkilöt: ks. [www-sivusto http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main](http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main).

## Lisäys 2

**Kasvatusalustat *R. solanacearum* -kasvintuhoojan eristämistä ja viljelyä varten**

## a) Yleinen kasvatusalusta

*Ravinneagar (NA)*

Ravinneagar (Difco)	23,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

*Hiiva-peptoni-glukoosiagar (YPGA)*

Hiivauute (Difco)	5,0 g
Bacto-Peptoni (Difco)	5,0 g
D(+)-glukoosi (monohydraatti)	10,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

*Sakkaroosipeptoniagar (SPA)*

Sakkaroosi	20,0 g
Bacto-Peptoni (Difco)	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

pH 7,2–7,4

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

*Kelmanin tetratsolium-alusta*

Casaminohapot (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptoni (Difco)	10,0 g
Dekstroosi	5,0 g
Bacto-Agar (Difco)	15,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

Liuotetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:een ja lisätään suodatinsteriloitua 2,3,5-trifenyyilitetratsoliumkloridin (Sigma) vesiliuosta, jotta lopputuotukseksi saadaan 50 mg/l.

## b) Validoitu selektiivinen kasvatusalusta

*SMSA-alusta (Englebrecht, 1994, sellaisena kuin se on muutettuna julkaisulla Elphinstone et al., 1996)*

## Kasvualusta

Casaminohappoja (Difco)	1,0 g
Bacto-Peptoni (Difco)	10,0 g
Glyseroli	5,0 ml
Bacto-Agar (Difco) (ks. Huomautus 2)	15,0 g
Tislattua vettä	1,0 L

Liuetetaan ainesosat ja steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Jäähdytetään 50 °C:een ja lisätään seuraavien aineiden suodatinstერიloituja vesikantaliuoksia, jotta saadaan määrättyt loppupitoisuudet:

Kristallivioletti (Sigma)	5 mg/l
Polymyksiini-B-sulfaatti	(Sigma P-1004) 600 000 U(noin 100 mg) / l
Basitrasiiini (Sigma B-0125)	1 250 U (noin 25 mg)/l
Kloramfenikoli (Sigma C-3175)	5 mg/l
Penisilliini G (Sigma P-3032)	825 U (noin 0,5 mg)/l
2,3,5-trifenyyilitetratsoliumkloridi (Sigma)	50 mg/l

**HUOMAUTUS:**

1. Muiden kuin edellä määritettyjen reagenssien käyttö voi vaikuttaa *R. solanacearum* -bakteerin kasvuun.
2. Oxoid Agar #1:tä voidaan käyttää Bacto-Agarin (Difco) sijaan. Tällöin *R. solanacearum* -bakteerin kasvu on hitaampaa, mutta kilpailevien saprofyttien kasvu voi myös vähentyä. Tyypillisten *R. solanacearum* -pesäkkeiden syntymiseen voi mennä 1–2 päivää kauemmin ja niiden punainen väritys voi olla vaaleampaa ja hajanaisempaa kuin Bacto-Agarissa.
3. Basitrasiiinipitoisuuden nostaminen arvoon 2 500 U/l voi pienentää kilpailevien bakteerien populaatiota vaikuttamatta *Ralstonia solanacearum* -bakteerin kasvuun.

Kasvualustat ja antibioottien kantaliuokset on varastoitava 4 °C:ssa pimeässä ja käytettävä kuukauden kuluessa.

Levyillä ei saa olla tiivistynyttä kosteutta ennen niiden käyttöä.

Levyjen liiallista kuivumista on vältettävä.

Jokaisen uuden alustuerän valmistuksen jälkeen olisi toteutettava laadunvarmistustoimia maljaamalla *R. solanacearum* -bakteerin viiteviljelmän suspensio (ks. lisäys 3) ja tarkkailemalla tyypillisten pesäkkeiden muodostumista, kun levyä on inkuboitu 28 °C:ssa 2–5 päivän ajan.

c) Validoitu rikastusalusta

*SMSA-ravintoliuos (Elphinstone et al., 1996)*

Valmistetaan kuten selektiivinen SMSA-agaralusta, mutta jätetään pois Bacto-Agar ja 2,3,5-tetratsoliumkloridi.

*Muunnettu Wilbrinkin ravintoliuos (Caruso et al., 2002)*

Sakkarosi	10 g
Proteosipeptoni	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
NaNO <sub>3</sub>	0,25 g
Tislattua vettä	1 l

Steriloidaan autoklavaimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan ja jäähdytetään 50 °C:seen.

Lisätään antibioottien kantaliuokset kuten SMSA-ravintoliuoksessa.

## Lisäys 3

## A) Kaupallisesti saatavilla olevat standardoidut kontrollimateriaalit

## a) Bakteeri-isolaatit

Seuraavia bakteerien isolaatteja suositellaan käytettäväksi standardoituina viitemateriaaleina joko positiivisina kontroleina (taulukko 1) tai testien optimoinnin aikana ristireaktioiden välttämiseksi (taulukko 2). Kaikki kannat ovat kaupallisesti saatavilla seuraavista lähteistä:

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

Taulukko 1 *R. solanacearum* -isolaattien SMT-viitepaneeli

NCPBP-koodi	SMT-nro #	Muut koodit	Alkuperämaa	Biovari
NCPBP 4153	6	CFBP 4582, Pr 3020, EURS11	Egypti	2
NCPBP 4154	10	CFBP 4585, 550, EURS21	Turkki	2
NCPBP 3857	12	CFBP 4587, Pr 1140, EURS26	Englanti	2
NCPBP 1584	23	CFBP 4598, EURS49	Kypros	2
NCPBP 2505	24	CFBP 4599, EURS50	Ruotsi	2
NCPBP 4155	26	CFBP 4601, 502, EURS55	Belgia	2
NCPBP 4156 (*)	71 (*)	PD 2762, CFBP 3857	Alankomaat	2
NCPBP 4157	66	LNPV 15.59	Ranska	2
NCPBP 4158	39	CFBP 4608, Port 448, EURS80, NCPBP 4066	Portugali	2
NCPBP 4160	69	IVIA-1632-2	Espanja	2
NCPBP 4161	76	B3B	Saksa	2
NCPBP 325	41	CFBP 2047, KEL60-1, R842	Yhdysvallat	1
NCPBP 3967	42	CFBP 4610, R285, GONG7	Costa Rica	1
NCPBP 4028	43	CFBP 4611, R303/571, CIP310, SEQ205	Kolumbia	2
NCPBP 3985	44	CFBP 4612, R578, CIP312	Peru	2T
NCPBP 3989	45	CFBP 4613, R568, CIP226	Brasilia	2T
NCPBP 3996	46	CFBP 3928, R276/355, CIP72, SEQ225	Peru	3
NCPBP 3997	47	CFBP 4614, R280/363, CIP49, HAY0131a	Australia	3
NCPBP 4029	48	CFBP 4615, R297/349, CIP121, CM1b2861	Sri Lanka	4
NCPBP 4005	49	CFBP 4616, R470	Filippiinit	4
NCPBP 4011	50	CFBP 4617, R288, HEmps2	Kiina	5

(\*) Käytetään *R. solanacearum* -bakteerin biovarin 2 (rotu 3) standardoituna viitekantana.

Huomautus: Edellä lueteltujen kantojen aitous voidaan taata ainoastaan, jos ne on saatu aidosta viljelmäkoelmasta.

Taulukko 2 Serologisesti tai geneettisesti toisiaan muistuttavien bakteerien SMT-viitepaneeli käytettäväksi toteamistestien optimoinnissa.

NCPPB-koodi	SMT-nro #	Muu koodi	Tunnistus
NCPPB 4162	51	CFBP 1954	<i>Bacillus polymyxa</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4163	52	CFBP 1538	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4164	—	CFBP 2227	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4165	—	CFBP 2459	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4166	58	CFBP 3567 CSL Pr1150	<i>Ralstonia pickettii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 4167	60	CFBP 4618 PD 2778	<i>Ralstonia</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 1127	53	CFBP 3575	<i>Burkholderia andropogonis</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 353	54	CFBP 3572	<i>Burkholderia caryophylli</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 945	55	CFBP 3569	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3708	56	CFBP 3574	<i>Burkholderia glumae</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3590	57	CFBP 3573	<i>Burkholderia plantarii</i> <sup>(1)</sup>
NCPPB 3726	59	CFBP 3568	<i>Banana Blood Disease Bacterium</i> <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup>
NCPPB 4168	61	CFBP 4619 IPO S339	<i>Enterobacter</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4169	62	IPO 1695	<i>Enterobacter</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4170	63	CFBP 4621 IPO S306	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4171	64	CFBP 4622 IPO 1693	<i>Curtobacterium</i> sp. <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>
NCPPB 4172	65	IPO 1696a	<i>Pseudomonas</i> sp. <sup>(1)</sup>
NCPPB 4173	—	PD 2318	<i>Aureobacterium</i> sp. <sup>(2)</sup>
NCPPB 4174	81	IVIA 1844.06	<i>Flavobacterium</i> sp. <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Serologisissa testeissä (IF ja/tai ELISA), joissa käytetään polyklonaalisia antiserumeita, potentiaalisesti ristiin reagoiva kanta.

<sup>(2)</sup> Kanta, josta joissakin laboratorioissa voidaan monistaa PCR-tuote, joka on vastaavan kokoinen kuin spesifisiä OLI-1- ja Y-2- alukkeita käytettäessä odotettava tulos (ks. lisäys 6).

<sup>(3)</sup> Aiheuttaa todennäköisesti ristireaktion useimmissa testeissä mutta esiintyy tunnetusti ainoastaan banaanissa Indonesiassa.

b) *Kaupallisesti saatavilla olevat standardoidut kontrollimateriaalit*

Seuraavat standardoidut kontrollimateriaalit ovat saatavilla NCPPB-viljelmäkokoelmasta.

Pakastekuivattuja perunauutepellettejä 200:sta terveestä mukulasta kaikissa testeissä käytettäväksi negatiivisiksi kontrolleiksi.

200:sta terveestä mukulasta saatuja pakastekuivattuja perunauutepellettejä, jotka sisältävät  $10^3$ – $10^4$  ja  $10^4$ – $10^6$  *R. solanacearum* -bakteerin biovarin 2 solua (kanta NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) positiivisiksi kontrolleiksi serologisiin ja PCR-testeihin. Koska pakastekuivaus vaikuttaa solujen elinkelpoisuuteen, ne eivät sovellu standardikontrolleiksi eristystesteihin tai biologiseen määrittelyyn.

Formaliiniin kiinnitetyt suspensiot ( $10^6$  solua/ml) *R. solanacearum* -bakteerin biovarista 2 (kanta NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) positiivisiksi kontrolleiksi serologisiin testeihin.

B) **Positiivisten ja negatiivisten kontrollien valmistaminen napapäiden seulontatestejä PCR/IF ja FISH varten**

Tuotetaan 48 tunnin viljelmä *R. solanacearum* -bakteerin rodun 3 / biovarin 2 virulentista kannasta (esim. kanta NCPPB 4156 = PD 2762 = CFBP 3857) SMSA-kasvualustalle ja suspendoidaan 10 mM fosfaattipuskuriin, jotta saataisiin solutiheydeksi noin  $2 \times 10^8$  PMY/ml. Tämä saadaan tavallisesti hieman samealla suspensiolla, joka vastaa 0,15:n optista tiheyttä 600 nanometrissä.

Poistetaan 200 mukulan napapäästä kappaleet, jotka on otettu valkokuorisesta osasta, jonka tiedetään olevan *R. solanacearum* -bakteerista vapaa.

Käsitellään napapääät tavalliseen tapaan ja suspendoidaan sakka uudelleen 10 ml:aan.

Valmistetaan 10 steriiliä 1,5 ml:n mikroampullia, joissa on 900 µl uudelleen suspendoitua sakkaa.

Siirretään 100 µl *R. solanacearum* -bakteerin suspensiosta ensimmäiseen mikroampulliin. Sekoitetaan vorteksilla.

Saastumisaste määritetään laimennussarjan (seuraavat 5 ampullia) avulla.

Kuutta mikroampullia, jotka sisältävät bakteerinäytettä, käytetään positiivisina kontrolleina. Neljää mikroampullia, jotka eivät sisällä bakteerinäytettä, käytetään negatiivisina kontrolleina. Ampullit merkitään vastaavasti.

Valmistetaan 100 µl:an osanäytteitä steriileihin 1,5 ml:n mikroampulleihin, jolloin saadaan 9 toisintoa kustakin kontrollinäytteestä. Varastoidaan -16—24 °C:ssa käyttöön saakka.

*R. solanacearum* -bakteerin esiintyminen ja määrä kontrollinäytteissä olisi ensin varmistettava IF-testillä.

PCR-testiä varten DNA uutetaan positiivisista ja negatiivisista kontrollinäytteistä kullakin testinäytesarjalla.

IF- ja FISH-testejä varten tehdään määritykset positiivisista ja negatiivisista kontrollinäytteistä kullakin testinäytesarjalla.

IF-, FISH- ja PCR-määrityksissä *R. solanacearum* -bakteeri on osoitettava ainakin niistä positiivisista kontrolleista, joissa on  $10^6$  ja  $10^4$  solua/ml, eikä sitä saa esiintyä yhdessäkään negatiivisessa kontrollissa.

---

## Lisäys 4

**Puskuriliuokset testimenettelyihin**

**YLEISTÄ:** Avaamattomia steriloituja puskuriliuoksia voidaan säilyttää enintään vuoden ajan.

**1. Puskurit uuttamisenettelyä varten****1.1 Uuttopuskuri (50 mM fosfaattipuskuri, pH 7,0)**

Tätä puskuriliuosta käytetään bakteerin uuttamiseen kasvisolukoista homogenoimalla tai ravistamalla.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (vedetön)	4,26 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g
Tislattua vettä	1,00 l

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Muita aineksia voidaan lisätä seuraavasti:

	Päämäärät	Määrä (litraa kohden)
Lubrol-hiutaleita	Höytelöitymisenestoaine (*)	0,5 g
DC-silikoni-vaahdonesto	Vaahdonestoaine (*)	1,0 ml
Tetranatriumpyrofosfaatti	Hapettumisenestoaine	1,0 g
Polyvinyyliipyrrolidoni-40000 (PVP-40)	PCR:n inhibiittorien sidonta- aine	50 g

(\*) Käytetään homogenoimalla tapahtuvassa uuttamisenettelyssä.

**1.2 Sakkapuskuri (10 mM fosfaattipuskuri, pH 7,2)**

Tätä puskuria käytetään perunan mukulan napapääuutteiden uudelleen suspendointiin ja laimentamiseen, kun ne on ensin konsentroitui sakaksi sentrifugoimalla.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
Tislattua vettä	1,0 l

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

**2. Puskurit IF-testiä varten****2.1 IF-puskuri (10 mM fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,2)**

Tätä puskuria käytetään vasta-aineiden laimentamiseen.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

## 2.2 IF-puskuri-Tween

Tätä puskuria käytetään levyjen pesuun.

Lisätään 0,1 % Tween 20:tä IF-puskuriin.

## 2.3 Fosfaattipuskuroitu glyseroli, pH 7,6

Tätä puskuria käytetään peittäusliuoksena IF-levyjen syvennyksissä fluoresenssin tehostamiseksi.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glyseroli	50 ml
Tislattua vettä	100 ml

Haalistumiselta suojaavia peittäusaineita on saatavana kaupallisesti, esim. Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories) tai Citifluor<sup>®</sup> (Leica).

## 3. Puskurit epäsuoraa ELISA-testiä varten

### 3.1 Väkevyydeltään kaksinkertainen kiinnityspuskuri, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,36 g
NaHCO <sub>3</sub>	11,72 g
Tislattua vettä	1,00 l

Liuotetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Natriumsulfiittia (0,2 %) voidaan lisätä antioksidanttina, jos halutaan estää hapettuneiden aromaattisten molekyylien muodostuminen.

### 3.2 10X fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29,0 g
KCl	2,0 g
Tislattua vettä	1,0 l

### 3.3 PBS-Tween

10X PBS	100 ml
10 % Tween 20	5 ml
Tislattua vettä	895 ml

### 3.4 Estopuskuri (valmistettava juuri ennen käyttöä)

10X PBS	10,0 ml
Polyvinyylipyrrolidoni-44000 (PVP-44)	2,0 g
10 % Tween 20	0,5 ml
Maitojauhe	0,5 g
Tislattua vettä	100 ml:aan asti



## 3.5 Emäksinen fosfaasisubstraattiliuos, pH 9,8

Dietanolamiini	97 ml
Tislattua vettä	800 ml

Sekoitetaan ja säädetään pH:ksi 9,8 väkevällä HCl:llä.

Täytetään 1 l:ksi tislattulla vedellä.

Lisätään 0,2 g MgCl<sub>2</sub>:a.

Liuotetaan 2 × 5 mg fosfaasisubstraattitablettia (Sigma) 15 ml liuosta kohden.

## 4. Puskurit DASI ELISA -testiä varten

## 4.1 Kiinnityspuskuri, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
Tislattua vettä	1 000 ml

Liuotetaan ainesosat ja tarkastetaan pH 9,6.

## 4.2 10X fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS), pH 7,2–7,4

NaCl	80,0 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	4,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	27,0 g
Tislattua vettä	1 000 ml

## 4.3 PBS-Tween

10X PBS	50 ml
10 % Tween 20	5 ml
Tislattua vettä	950 ml

## 4.4 Substraattipuskuri, pH 9,8

Dietanolamiini	100 ml
Tislattua vettä	900 ml

Sekoitetaan ja säädetään pH:ksi 9,8 väkevällä HCl:llä.

---

## Lisäys 5

**Bakteerien määrän arvioiminen IF- ja FISH-testeillä**

1. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä kenttää kohden (c).
2. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä kuoppaa kohden (C).

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

jossa  $S$  = monikuoppatestilevyn yhden kuopan pinta-ala

ja  $s$  = objektiivikentän pinta-ala

$s = \pi^2/4G^2K^2$  jossa  $i$  = kentän kerroin (8-24 okulaarin tyypin mukaan)

$K$  = putken kerroin (1 tai 1,25)

$G$  = objektiivin suurennos (100-kertainen, 40-kertainen jne.).

3. Lasketaan tyypillisten fluoresoivien solujen määrä uudelleen suspendoidun sakan millilitraa kohti (N):

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

jossa  $y$  = uudelleen suspendoidun sakan tilavuus kuopassa

ja  $F$  = uudelleen suspendoidun sakan laimennuskerroin.

---

## Lisäys 6

## Validoidut PCR-protokollat ja -reagenssit

**Huomautus:** Alustavan testauksen pitäisi mahdollistaa se, että voidaan todeta *R. solanacearum* -bakteerin solut, joiden pitoisuus on  $10^3$ – $10^4$  näyteutteen millilitraa kohden. Testi on voitava toistaa.

Alustavassa testauksessa ei myöskään pitäisi näkyä vääriä positiivisia tuloksia valikoiduilla bakteerikannoilla (ks. lisäys 3).

1. PCR-protokolla: Seal *et al.* (1993)

## 1.1 Oligonukleotidialukkeet

Koodaavan suunnan aluke OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3'

Vastakkaisen suunnan aluke Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

*R. solanacearum* -bakteerin templaatti-DNA:sta odotettu ampliconikoko = 288 bp.

## 1.2 PCR-reaktioseos

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriliä ultrapuhdasta vettä	17,65 µl	
10X PCR-puskuri <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTP-seos (20 mM)	0,25 µl	0,2 mM
Aluke OLI-1 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Aluke Y-2 (20 µM)	1,25 µl	1µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,1 µl	0,5 U
Näytteen tilavuus:	2,0 µl	
Kokonaistilavuus:	25 µl	

<sup>(1)</sup> Menetelmä validoitiin käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliTaq) ja Gibco BRL:tä.

## 1.3 PCR-reaktion olosuhteet

Ajetaan seuraava ohjelma:

- |           |      |   |
|-----------|------|---|
| 1 sykli   | i)   | 2 minuuttia 96 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi) |
| 35 sykliä | ii)  | 20 sekuntia 94 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi) |
|           | iii) | 20 sekuntia 68 °C:ssa (alukkeiden pariutuminen)       |
|           | iv)  | 30 sekuntia 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)          |
| 1 sykli   | v)   | 10 minuuttia 72 °C:ssa (lisääminen edelleen)          |
|           | vi)  | pidetään 4 °C:ssa.                                    |

**Huomautus:** Tämä ohjelma on optimoitu käytettäväksi Perkin Elmer 9600 -lämpösyklilaitteella. Muut mallit saattavat vaatia syklien ii, iii ja iv keston muuttamisen.

## 1.4 Ampliconin restriktio-entsyymianalyysi

*R. solanacearum* -bakteerin DNA:sta monistetut PCR-tuotteet tuottavat entsyymillä *Ava II* tyypillistä restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa, kun niitä on inkuboitu 37 °C:ssa.

## 2. PCR-protokolla: Pastrik ja Maiss (2000)

### 2.1 Oligonukleotidialukkeet

Koodaavan suunnan aluke Ps-1      5'-agt cga acg gca gcg ggg g-3'  
 Vastakkaisen suunnan aluke Ps-2      5'-ggg gat ttc aca tcg gtc ttg ca-3'

*R. solanacearum* -bakteerin templaatti-DNA:sta odotettu amplikonikoko = 553 bp.

### 2.2 PCR-reaktioseos

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriliä ultrapuhdasta vettä	16,025 µl	
10X PCR-puskuri (1)	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fraktio V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-seos (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Aluke Ps-1 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Aluke Ps-2 (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) (1)	0,1 µl	0,5 U
Näytteen tilavuus	5,0 µl	
Kokonaistilavuus:	25,0 µl	

(1) Menetelmät validoitiin käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliTaq) ja Gibco BRL:tä.

Huom: Alun perin optimoitu käytettäväksi MJ Research PTC 200 -lämpösyklilaitteella Gibcon Taq -polymerasilla.

Myös Perkin Elmerin AmpliTaqia ja puskuria voidaan käyttää samoina pitoisuuksina.

### 2.3 PCR-reaktion olosuhteet

Ajetaan seuraava ohjelma:

- |           |      |   |
|-----------|------|---|
| 1 sykli   | i)   | 5 minuuttia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi) |
| 35 sykliä | ii)  | 30 sekuntia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:                |
|           | iii) | 30 sekuntia 68 °C:ssa (alukkeiden parituminen)        |
|           | iv)  | 45 sekuntia 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)          |
|           | v)   | 5 minuuttia 72 °C:ssa (lisääminen edelleen)           |
| 1 sykli   | vi)  | pidetään 4 °C:ssa.                                    |

Huomautus: Tämä ohjelma on optimoitu käytettäväksi MJ Research PTC 200 -lämpösyklilaitteella. Muut mallit saattavat vaatia syklien ii, iii ja iv keston muuttamisen.

### 2.4 Amplikonin restriktio-entsyymianalyysi

*R. solanacearum* -bakteerin DNA:sta monistetut PCR-tuotteet tuottavat entsyymillä Taq I tyypillistä restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa, kun niitä on inkuboitu 65 °C:ssa 30 minuutin ajan. *R. solanacearum* -spesifisestä fragmentista saadut restriktiofragmentit ovat kooltaan 457 ja 96 emäsparia.

## 3. Moninkertaiseen reaktioon perustuva PCR-testausprotokolla, johon kuuluu sisäinen PCR-kontrolli (Pastrik et al., 2002)

### 3.1 Oligonukleotidialukkeet

Koodaavan suunnan aluke Rs-1-F      5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3'  
 Vastakkaisen suunnan aluke Rs-1-R      5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'  
 Koodaavan suunnan aluke Ns-5-F      5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'  
 Vastakkaisen suunnan aluke Ns-6-R      5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'

*R. solanacearum* -bakteerin templaatti-DNA:sta odotettu amplikonikoko = 718 bp (Rs-alukesarja).

18S rRNA sisäisestä PCR-kontrollista odotettu amplikonikoko = 310 emäsparia (Ns-alukesarja).

## 3.2 PCR-reaktioseos

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	12,625 µl	
10X PCR-puskuri <sup>(1)</sup> (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fraktio V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-seos (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Aluke Rs-1-F (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Aluke Rs-1-R (10 µM)	2,0 µl	0,8 µM
Aluke Ns-5-F (10µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Aluke Ns-6-R (10µM) <sup>(2)</sup>	0,15 µl	0,06 µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1,0 U
Näytteen tilavuus	5,0 µl	
Kokonaistilavuus:	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Menetelmät validoitiin käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliTaq) ja Gibco BRL:tä.

<sup>(2)</sup> Alukkeiden Ns-5-F ja Ns-6-R konsentraatio optimoitiin perunan napapääuutteelle käyttäen homogenointimenetelyä ja DNA:n puhdistusta Pastrikin mukaan (2000) (ks. VI jakson A kohdan 6.1.a alakohta). Reagenssien konsentraatit on optimoitava uudelleen, jos käytetään ravistamalla tapahtuvaa uuttamismenetelmää tai muuta DNA:n eristämismenetelmää.

## 3.3 PCR-reaktion olosuhteet

Ajetaan seuraava ohjelma:

- |           |      |   |
|-----------|------|---|
| 1 sykli   | i)   | 5 minuuttia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi) |
| 35 sykliä | ii)  | 30 sekuntia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi) |
|           | iii) | 30 sekuntia 58 °C:ssa (alukkeiden pariutuminen)       |
|           | iv)  | 45 sekuntia 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)          |
|           | v)   | 5 minuuttia 72 °C:ssa (lisääminen edelleen)           |
| 1 sykli   | vi)  | pidetään 4 °C:ssa.                                    |

**Huomautus:** Tämä ohjelma on optimoitu käytettäväksi MJ Research PTC 200 -lämpösyklilaitteella. Muut mallit saattavat vaatia syklien ii, iii ja iv keston muuttamisen.

## 3.4 Amplikonin restriktio-entsyymianalyysi

*R. solanacearum* -bakteerin DNA:sta monistetut PCR-tuotteet tuottavat entsyymillä *Bsm* I tyypillistä restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa tai isoskitsomeerin (esim. Mva 1269 I), kun niitä on inkuboitu 65 °C:ssa 30 minuutin ajan.

4. *R. solanacearum* -bakteerin biovarispesifinen PCR-protokolla (Pastrik *et al.*, 2001)

## 4.1 Oligonukleotidialukkeet

- |                                   |                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Koodaavan suunnan aluke Rs-1-F    | 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3' |
| Vastakkaisen suunnan aluke Rs-1-R | 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3'      |
| Vastakkaisen suunnan aluke Rs-3-R | 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3'        |

*R. solanacearum* -bakteerin templaatti-DNA:sta odotettu amplikonikoko:

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

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

## 4.2 PCR-reaktioseos

## a) Biovari 1/2 -spesifinen PCR

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	12,925 µl	
10X PCR-puskuri <sup>(1)</sup>	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fraktio V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-seos (20mM)	0,125 µl	0,1 mM
Aluke Rs-1-F (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Aluke Rs-1-R (10 µM)	2 µl	0,8 µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1 U
Näytteen tilavuus	5,0 µl	
Kokonaistilavuus:	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Menetelmät on validoitu käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliTaq) ja Gibco BRL:tä.

## b) Biovari 3/4/5 -spesifinen PCR

Reagenssi	Määrä reaktiota kohden	Lopullinen pitoisuus
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	14,925 µl	
10X PCR-puskuri <sup>(1)</sup>	2,5 µl	1X (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
BSA (fraktio V) (10 %)	0,25 µl	0,1 %
dNTP-seos (20 mM)	0,125 µl	0,1 mM
Aluke Rs-1-F (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Aluke Rs-3-R (10 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq-polymeraasi (5 U/µl) <sup>(1)</sup>	0,2 µl	1 U
Näytteen tilavuus	5,0 µl	
Kokonaistilavuus:	25,0 µl	

<sup>(1)</sup> Menetelmät on validoitu käyttäen Perkin Elmerin Taq-polymeraasia (AmpliTaq) ja Gibco BRL:tä.

## 4.3 PCR-reaktion olosuhteet

Ajetaan seuraava ohjelma sekä biovari 1/2- että biovari 3/4/5-spesifisiä reaktioita varten:

1 sykli	i)	5 minuuttia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi)
35 sykliä	ii)	30 sekuntia 95 °C:ssa (templaatti-DNA:n denaturointi)
	iii)	30 sekuntia 58 °C:ssa (alukkeiden pariutuminen)
	iv)	45 sekuntia 72 °C:ssa (kopioiden lisääminen)
1 sykli	v)	5 minuuttia 72 °C:ssa (lisääminen edelleen)
	vi)	pidetään 4 °C:ssa.

**Huomautus:** Tämä ohjelma optimoitiin käytettäväksi MJ Research PTC 200 -lämpösyklilaitteella. Muut mallit saattavat vaatia syklilien ii, iii ja iv keston muuttamisen.

## 4.4 Amplikonin restriktio-entsyymianalyysi

*R. solanacearum* -bakteerin DNA:sta alukkeita Rs-1-F ja Rs-1-R käyttämällä monistetut PCR-tuotteet tuottavat entsyymillä *Bsm* I tyypillistä restriktiofragmenttien pituuspolymorfiaa tai isokitsomeerin (esim. *Mva* 1269 I), kun niitä on inkuboitu 65 °C:ssa 30 minuutin ajan. *R. solanacearum* -bakteerin DNA:sta alukkeita Rs-1-F ja Rs-1-R käyttämällä monistetuilla PCR-tuotteilla ei ole restriktiokohtia.

**5. Latauspuskurin valmistaminen****5.1 Bromifenolisinin (10-prosenttinen kantaliuos)**

Bromifenolisinin	5 g
Kahteen kertaan tislattua vettä	50 ml

**5.2 Latauspuskuri**

Glyseroli (86 %)	3,5 ml
Bromifenolisinin (5.1)	300 µl
Kahteen kertaan tislattua vettä	6,2 ml

**6. 10X trisetaatti-EDTA-puskuri (TAE), pH 8,0**

Tris-puskuri	48,40 g
Jäätikka	11,42 ml
EDTA (dinatriumsuola)	3,72 g
Tislattua vettä	1,00 l

Laimennetaan 1X:ään ennen käyttöä.

Saatavana myös kaupallisesti (esim. Invitrogen tai vastaava).

---

## Lisäys 7

## Validoidut reagenssit FISH-testiä varten

## 1. Oligokoettimet

*R. solanacearum* -spesifinen koetin OLI-1-CY3 5'-ggc agg tag caa gct acc ccc-3'

Ei-spesifinen eubakteriaalinen koetin EUB-338-FITC 5'-gct gcc tcc cgt agg agt -3'

## 2. Kiinniteliuos

[VAROITUS! KIINNITE SISÄLTÄÄ PARAFORMALDEHYDIÄ, JOKA ON TOKSISTA. SITÄ EI SAA HENGITTÄÄ, JA ON KÄYTETTÄVÄ KÄSINEITÄ. ON SUOSITELTAVAA TYÖSKENNELLÄ VETOKAAPISSA.]

- i) Kuumennetaan 9 ml molekyyliuodattimilla puhdistettua vettä (esim. ultrapuhdasta vettä – UPW) noin 60 °C:een ja lisätään 0,4 g paraformaldehydiä. Paraformaldehydi liukenee, kun on lisätty 5 tippaa 1N NaOH:ta ja sekoitettu magneettisekoittimella.
- ii) Säädetään pH arvoon 7,0 lisäämällä 1 ml 0,1 M fosfaattipuskuria (PB; pH 7,0) ja 5 tippaa 1N HCl:ää. Tarkistetaan pH indikaattoriliuskoilla ja säädetään tarvittaessa HCl:llä tai NaOH:lla. [VAROITUS! PARAFORMALDEHYDILIUOKSISSA EI SAA KÄYTTÄÄ PH-MITTARIA.]
- iii) Suodatetaan liuos 0,22 µm:n kalvosuodattimen läpi ja pidetään pölyltä suojassa 4 °C:ssa, kunnes sitä tarvitaan.

## 3. 3X Hybmix

NaCl	2,7 M
Tris-HCl	60 mM (pH 7,4)
EDTA (suodatinsteroitu ja autoklavoitu)	15 mM

Laimennetaan 1X:ään tarpeen mukaan.

## 4. Hybridisaatioliuos

1X Hybmix

Natriumdodekyylisulfaatti (SDS)	0,01 %
Formamidi	30 %,
koetin EUB 338	5 ng/µl
koetin OLI-1 tai OLI-2	5 ng/µl

Valmistetaan taulukossa esitettyjen laskelmien mukaisia määriä hybridisaatioliuosta. Kutakin levyä (jotka sisältävät 2 eri näytettä kahteen kertaan) varten tarvitaan 90 µl hybridisaatioliuosta. TÄRKEÄÄ: FORMAMIDI ON ERITTÄIN TOKSISTA, JOTEN KÄSINEITÄ ON KÄYTETTÄVÄ JA TARVITTAVIIN VAROTOIMIIN ON RYHDYTTÄVÄ!

Taulukko Hybridisaatioseoksen valmistamiseen ehdotetut määrät

Levyjen lukumäärä:	1	4	6	8	10
Steriiliä ultrapuhdasta vettä	23,1	92,4	138,6	184,8	231,0
3X hybmix	30,0	120,0	180,0	240,0	300,0
1 % SDS	0,9	3,6	5,4	7,2	9,0
Formamidi	27,0	108,0	162,0	216,0	270,0
Koetin EUB 338 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Koetin OLI-1 tai OLI-2 (100 ng/µl)	4,5	18,0	27,0	36,0	45,0
Kokonaismäärä (µl)	90,0	360,0	540,0	720,0	900,0

Huom. Varastoidaan kaikki valolle herkkiä oligokoettimia sisältävät liuokset pimeässä – 20 °C:ssa. Suojataan käytön aikana suoralta auringonvalolta tai sähkövalolta.



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

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,52 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,44 g
Tislattua vettä	1,00 l

Liuetetaan ainesosat, tarkastetaan pH ja steriloidaan autoklavoimalla 121 °C:ssa 15 minuutin ajan.

---

## Lisäys 8

**Munakoiso- ja tomaattiviljelmä**

Kylvetään tomaatin (*Lycopersicon esculentum*) tai munakoison (*Solanum melongena*) siemeniä pastöroidulle kylvöalustalle. Istutetaan kylvötaimet uudelleen pastöroituun istutusalueeseen, kun sirkkalehdet ovat täysin kehittyneet (10–14 päivää).

Munakoisot tai tomaatit on ennen inokulointia viljeltävä kasvihuoneessa seuraavissa olosuhteissa:

Päivän pituus	14 tuntia tai luonnollinen päivän pituus, jos se on tätä pidempi
Lämpötila	päivä 21–24 °C yö 14–18 °C
Sopiva tomaattilajike	'Moneymaker'
Sopiva munakoisolajike	'Black Beauty'
Tomaattien tai munakoisojen toimittajat	ks. www-sivusto osoitteessa <a href="http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main">http://forum.europa.eu.int/Public/irc/sanco/Home/main</a> .

## VIITTEET

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

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

## LIITE III

1. Kaikissa epäillyissä esiintymistapauksissa, joiden seulontakokeista on luettelossa olevan kasviaineiston osalta sekä kaikkien muiden tapausten osalta saatu positiivinen tulos käyttäen liitteessä II esitettyä asianmukaista menetelmää ja joille odotetaan vahvistusta tai kumoamista kyseisen menetelmän päätyttyä, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa kyseisen menetelmän loppuun saattamiseen asti

- kaikki mukulat, joista on otettu näyte, ja jos se on mahdollista, kaikki kasvit, joista on otettu näyte,
- jäljellä oleva uute ja seulontatestejä varten valmistettu lisämateriaali, esim. immunofluoresenssilevyt,  
ja
- kaikki asian kannalta merkityksellinen dokumentaatio kyseisten menetelmien loppuun saattamiseen asti.

Mukuloiden säilyttämisen ansiosta voidaan tarvittaessa tehdä lajiketestausta.

2. Niissä tapauksissa, joissa organismin esiintyminen on varmistunut, olisi säilytettävä ja varastoitava asianmukaisissa olosuhteissa vähintään yhden kuukauden ajan 5 artiklan 2 kohdassa säädetyn ilmoitusmenettelyn jälkeen

- 1 kohdassa tarkoitettu aineisto,  
ja
- tomaatti- tai munakoisonäyte, joka on saastutettu inokuloimalla mukula- tai kasviuutteella,  
ja
- organismin eristetty viljelmä.

—

## LIITE IV

Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan i alakohdassa tarkoitettussa tutkimuksessa olisi tarvittaessa otettava huomioon seuraavat tekijät:

## i) tuotantopaikat,

- joilla viljellään tai on viljelty perunoita, jotka polveutuvat samasta kloonista kuin organismin saastuttamat perunat,
- joilla viljellään tai on viljelty tomaatteja, joiden alkuperä on sama kuin organismin saastuttamien tomaattien,
- joilla viljellään tai on viljelty perunoita tai tomaatteja, jotka ovat virallisen valvonnan alaisina organismin epäillyn esiintymisen vuoksi,
- joilla viljellään tai on viljelty perunoita, jotka polveutuvat samasta kloonista kuin perunat, joiden on todettu kasvaneen organismin saastuttamissa tuotantopaikoissa,
- joilla viljellään perunoita tai tomaatteja, jotka sijaitsevat saastuneiden tuotantopaikkojen läheisyydessä mukaan lukien tuotantopaikat, jotka joutuvat tekemisiin samojen välineiden tai tuotantotilojen kanssa välittömästi tai yhteisen yrittäjän välityksellä,
- joilla käytetään pintavettä kasteluun tai sumutukseen lähteestä, joka on vahvistettu tai jota epäillään organismin saastuttamaksi,
- joilla käytetään pintavettä kasteluun tai sumutukseen lähteestä, jota käytetään myös organismin saastuttamiksi vahvistetuilla tai epäillyillä tuotantopaikoilla,
- joilla organismin saastuttamaksi vahvistettu tai epäilty pintavesi tulvii tai on tulvinut;

ja

## ii) pintavesi, jota käytetään kasteluun tai sumutukseen tai joka on tulvinut pellolla (pelloilla) tai tuotantopaikalla (-paikoilla), jonka on vahvistettu olevan organismin saastuttamia.

—

## LIITE V

1. Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdassa ja 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan iii alakohdassa tarkoitettujen todennäköisen saastunnan laajuuden määrittämiseen olisi otettava huomioon seuraavat tekijät:
  - luettelossa oleva kasviaineisto, jota on viljelty 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla tuotantopaikalla,
  - tuotantopaikat, jotka ovat tuotantojärjestelmässä jossakin yhteydessä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettuun luettelossa olevaan kasviaineistoon, mukaan lukien ne, jotka joutuvat tekemisiin samojen välineiden tai tuotantotilojen kanssa välittömästi tai yhteisen yrittäjän välityksellä,
  - luettelossa oleva kasviaineisto, joka on tuotettu edellisessä luettelmakohdassa tarkoitettulla tuotantopaikalla (-paikoilla) tai joka on mainitulla paikalla (mainituilla paikoilla) aikana, jolloin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettu luettelossa oleva kasviaineisto oli ensimmäisessä luettelmakohdassa tarkoitetuissa tuotantopaikoissa,
  - tilat, joissa on käsitelty edellä mainituissa luettelmakohdissa tarkoitetuilta tuotantopaikoilta peräisin olevaa luettelossa olevaa kasviaineistoa,
  - kaikki koneet, ajoneuvot, säiliöt, varastot tai näiden osat sekä kaikki muut esineet, mukaan lukien pakkaukset, jotka ovat voineet olla kosketuksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetun luettelossa olevan kasviaineiston kanssa,
  - luettelossa oleva kasviaineisto, joka on varastoitu johonkin edellisessä luettelmakohdassa tarkoitettuun rakenteeseen tai esineeseen tai joka on ollut kosketuksissa niiden kanssa ennen kyseisten rakenteiden ja esineiden puhdistamista ja desinfiointia,
  - perunan osalta 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan i alakohdassa tarkoitettujen tutkimusten ja testien jälkeen ne mukulat tai kasvit, jotka ovat samaa sisarus- tai vanhemmaisloonialkuperää, ja tomaatin osalta kasvit, jotka ovat samasta lähteestä kuin 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettu luettelossa oleva kasviaineisto ja joiden saastunta näyttäisi todennäköiseltä samasta kloonista polveutumisen kautta, vaikka niiden testitulokset ovat negatiiviset organismin osalta. Saastuneiden ja samasta kloonista polveutuvien mukuloiden tai kasvien tunnistamisen varmistamiseksi voidaan tehdä lajiketestausta,
  - edellisessä luettelmakohdassa tarkoitettujen luettelossa olevan kasviaineiston tuotantopaikka (-paikat),
  - luettelossa olevan kasviaineiston tuotantopaikka (-paikat), jossa (joissa) käytetään 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitettua pintavettä kasteluun tai sumutukseen,
  - pelloilla, joilla on tulvinut organismin saastuttamaksi vahvistettu pintavesi, tuotettu luettelossa oleva kasviaineisto.
2. Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdassa ja 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan iii alakohdassa tarkoitettujen mahdollisen leviämisen määrittämisessä on otettava huomioon seuraavat tekijät:
  - i) 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan mukaisissa tapauksissa
    - muiden sellaisten tuotantopaikkojen läheisyys, joilla viljellään luettelossa olevaa kasviaineistoa,
    - siemenperunoiden yhteistuotanto ja -käyttö,
    - tuotantopaikat, joilla käytetään pintavettä luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun tai sumutukseen, jos kyseessä olevissa tapauksissa 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulta tuotantopaikalta (-paikoilta) on tai on ollut vaarana valua pintavettä tai jos siellä on tai on ollut tulvimisvaara;

- ii) tapauksissa, joissa pintavesi on edellä 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti ilmoitettu saastuneeksi
- tuotantopaikka (-paikat), jossa tuotetaan luettelossa olevaa kasviaineistoa ja joka sijaitsee saastuneeksi ilmoitetun pintaveden läheisyydessä tai jossa esiintyy sen tulvimisen uhka,
  - kaikki erilliset kastelualtaat, jotka ovat yhteydessä saastuneeksi ilmoitettuun pintaveteen,
  - kaikki vedet, jotka ovat yhteydessä saastuneeksi ilmoitettuun pintaveteen, ottaen huomioon
    - saastuneeksi ilmoitetun veden virtaussuunta ja -nopeus,
    - luonnonvaraisten isäntäkasvina toimivien koisokasvien esiintyminen.
3. Edellä 5 artiklan 2 kohdan ensimmäisessä alakohdassa tarkoitettu ilmoittaminen on hoidettava seuraavien sääntöjen mukaisesti:
- välittömästi sen jälkeen, kun kasvintuhoojan esiintyminen on varmistettu laboratoriotestauksella käyttäen liitteessä II esitettyjä menetelmiä, on ilmoitettava ainakin
    - perunoiden osalta
      - a) perunaerän lajikenimi;
      - b) tyyppi (ruoka-, siemenperuna jne.) ja tarvittaessa siemenluokka,
    - tomaattikasvien osalta erän lajikenimi ja tarvittaessa luokka,
  - jos on olemassa toisesta jäsenvaltiosta tai toiseen jäsenvaltioon siirrettävään luettelossa olevaan kasviaineistoon liittyvä saastuntariski, sen jäsenvaltion, jossa taudinaiheuttajan esiintyminen on vahvistettu, on ilmoitettava viipymättä kyseiselle toiselle jäsenvaltiolle (-valtioille) 5 artiklan 3 kohdan noudattamisen edellyttämät tiedot, sanotun kuitenkin rajoittamatta 4 artiklan 3 kohdassa säädettyjä velvoitteita ilmoittaa epäilystä esiintymistapauksesta; näitä tietoja ovat esimerkiksi
    - a) peruna- tai tomaattierän lajikenimi;
    - b) lähettäjän ja vastaanottajan nimi ja osoite;
    - c) peruna- tai tomaattierän toimituspäivämäärä;
    - d) toimitetun peruna- tai tomaattierän koko;
    - e) jäljennös kasvipassista tai tarvittaessa ainakin kasvipassin numero, tai tarvittaessa viljelijän tai kauppiaan rekisteröintinumero ja jäljennös toimitusilmoituksesta.

Komissiolle on viipymättä ilmoitettava tällaisten tietojen toimittamisesta.

4. Edellä 5 artiklan 2 kohdan toisessa alakohdassa tarkoitettu ilmoittaminen on hoidettava seuraavien sääntöjen mukaisesti:

kun kaikki tutkimukset on tehty, on aina ilmoitettava

- a) päivämäärä, jona saastunta varmistui;
- b) lyhyt kuvaus tutkimuksista, jotka tehtiin saastunnan lähteen ja mahdollisen leviämisen tunnistamiseksi, toteutetun näytteenoton laajuus mukaan luettuna;
- c) tiedot saastunnan tunnistetusta tai oletetusta lähteestä (tai lähteistä);
- d) ilmoitetun saastunnan laajuutta koskevat tiedot, mukaan luettuina tuotantopaikkojen lukumäärä ja perunoiden osalta erien lukumäärä ja lajike sekä siemenperunoiden yhteydessä myös luokka;



- e) alueen rajoittamista koskevat tiedot, mukaan luettuina sellaisten tuotantopaikkojen lukumäärä, joita ei ole ilmoitettu saastuneiksi mutta jotka on sisällytetty alueeseen;
  - f) tiedot vedestä, myös veden nimi ja sijainti sekä saastuneeksi toteamisen/kastelukiellon laajuus;
  - g) kaikkien saastuneiksi ilmoitettujen tomaattilähetysten tai -erien osalta direktiivin 2000/29/EY 13 artiklan 1 kohdan ii alakohdassa säädetyt todistukset ja passin numero direktiivin 2000/29/EY liitteessä V olevan A kohdan I jakson 2.2 kohdan luettelon mukaisesti;
  - h) vahvistettua esiintymistä (tai esiintymisiä) koskevat muut tiedot, joita komissio voi vaatia.
-

## LIITE VI

1. Edellä 6 artiklan 1 kohdassa tarkoitettut säännökset ovat seuraavat:

- käyttäminen eläinten rehuksi sellaisen lämpökäsittelyn jälkeen, jolla varmistetaan ettei organismi jää henkiin,  
tai
- hävittäminen virallisesti hyväksytyllä tarkoitukseen varatulla jätteidenhävittämispaikalla, jossa ei ole tunnistettavaa riskiä organismin pääsystä ympäristöön, esimerkiksi siten, että se valuisi maatalousmaahan tai joutuisi kosketuksiin sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita voitaisiin käyttää maatalousmaan kasteluun,  
tai
- tuhkaksi polttaminen,  
tai
- teollinen käsittely toimittamalla suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään virallisesti hyväksytyt jätteidenhävitystilat ja -laitteet, joista on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ei ole, sekä järjestelmä, jolla ainakin laitoksesta lähtevät ajoneuvot voidaan puhdistaa ja desinfioida,  
tai
- muut toimenpiteet, jos on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ei ole; nämä toimenpiteet ja niiden perustelut on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille.

Edellä mainittuihin vaihtoehtoihin liittyvä tai niistä syntyvä mahdollinen jäljelle jäävä jäte hävitetään virallisesti hyväksytyillä menetelmillä tämän direktiivin liitteen VII mukaisesti.

2. Kyseisen jäsenvaltion (-valtioiden) vastuullisten toimivaltaisten viranomaisten valvonnan alaista 6 artiklan 2 kohdassa tarkoitettujen luettelossa olevan kasviaineiston asianmukaista käyttöä tai hävittämistä on, edellyttäen, että toimivaltaisten viranomaisten välillä toimii asianmukainen tiedonvaihto jatkuvan valvonnan varmistamiseksi ja että jäsenvaltion vastuullinen toimivaltainen viranomais on hyväksynyt ensimmäisessä ja toisessa luetelmakohtadissa tarkoitettujen jätteidenhävitystilat ja -laitteet paikoissa, joissa perunat on tarkoitus pakata tai jalostaa, seuraava:

i) perunan mukuloiden osalta

- niiden käyttö kulutukseen tarkoitettuina ruokaperunoina, suoraan toimitukseen ja käyttöön valmiissa pakkauskauksissa, jotka eivät edellytä minkäänlaista uudelleen pakkaamista, paikassa, jossa on asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet. Kylvämiseen tarkoitettuja perunoita saa käsitellä samassa paikassa ainoastaan, jos tämä tapahtuu erikseen tai puhdistuksen ja desinfiointin jälkeen,

tai

- niiden käyttö teolliseen käsittelyyn tarkoitettuina perunoina, jotka toimitetaan suoraan ja välittömästi sellaiselle käsittelylaitokselle, jolla on käytettävissään asianmukaiset jätteidenhävitystilat ja -laitteet sekä järjestelmä, jolla ainakin laitoksesta lähtevät ajoneuvot voidaan puhdistaa ja desinfioida,

tai

- mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, jos on todettu, että se ei aiheuta tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisaavaa ja jos se on saanut mainittujen vastuussa olevien viranomaisten hyväksynnän;

ii) muiden kasvin osien osalta, varsien ja lehtien jätteet mukaan luettuina,

- hävittäminen,

tai

- mikä tahansa muu käyttö tai hävittäminen, jos on todettu, että se ei aiheuta tunnistettavaa organismin leviämisaavaa, ja jos se on saanut mainittujen vastuullisten toimivaltaisten viranomaisten hyväksynnän.

3. Asianmukaiset 6 artiklan 3 kohdassa tarkoitettujen esineiden puhdistamismenetelmät ovat pesu ja tarvittaessa desinfiointi siten, että ne eivät aiheuta tunnistettavaa organismin leviämistä; niitä on käytettävä jäsenvaltioiden vastuullisten viranomaisten valvonnassa.
4. Toimenpiteisiin, jotka jäsenvaltioiden on toteutettava 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan ja 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan iii alakohdan mukaisesti vahvistetuilla ja 6 artiklan 4 kohdassa tarkoitetuilla alueilla on kuuluttava seuraavat toimenpiteet:
- 4.1 Edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneiksi ilmoitettujen tuotantopaikkojen tapauksissa
- a) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetulla pellolla tai katteen alla kasvatettujen satokasvien tuotantoyksikössä joko
- i) ilmoitettua saastunutta seuraavien vähintään neljän kasvuvuoden aikana
- toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten perunan ja tomaatin kasvien sekä muiden organismin isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi,
- ja
- ei istuteta eikä kylvetä
    - perunan mukuloita, kasveja tai siemeniä,
    - tomaatin kasveja tai siemeniä,
    - organismin biologia huomioon ottaen
    - muita isäntäkasveja,
    - *Brassica*-sukuisia kaaleja, joiden osalta on olemassa tunnistettava vaara, että organismi säilyy hengissä,
    - satokasveja, joiden osalta on tunnistettu organismin leviämistä,
  - edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua ajanjaksoa seuraavan ensimmäisen perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana ja edellyttäen, että pelto on virallisen tarkastuksen yhteydessä todettu vähintään kahden perättäisen kasvuvuoden aikana ennen istuttamista vapaaksi ylivuotisista perunan tai tomaatin kasveista tai muista isäntäkasveista, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina,
    - perunoiden osalta sallitaan ainoastaan ruokaperunan tuotanto,
    - perunoiden ja tomaattien osalta korjatut mukulat tai tomaattikasvit on tutkittava liitteessä II kuvattun menettelyn mukaisesti,
  - edeltävässä luetelmakohdassa tarkoitettua kautta seuraavan perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana ja sopivan viljelykierron jälkeen – jonka pituus on vähintään kaksi vuotta, jos on kasvatettava siemenperunoita – perunoiden ja tomaattien osalta suoritetaan virallisia tutkimuksia 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti;
- tai
- ii) ilmoitettua saastunutta seuraavien viiden kasvuvuoden aikana
- toteutetaan toimenpiteitä ylivuotisten peruna- ja tomaattikasvien ja muiden luonnossa esiintyvien organismin isäntäkasvien, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, hävittämiseksi,
- ja
- pelto jätetään avokesannoksi ja sitä pidetään ensimmäisten kolmen vuoden ajan joko avokesantona tai viljalla tunnistetusta vaarasta riippuen tai se jätetään pysyvästi laitumeksi, jolloin sitä joko niitetään usein ja lyhyeksi tai laidunnetaan tehokkaasti, tai se pidetään nurmella siementuotantoa varten, minkä jälkeen seuraavien kahden vuoden ajan siinä viljellään muita kuin organismin isäntäkasveja, joista ei aiheudu tunnistettavaa organismin säilymis- tai leviämistä,

- edellisessä luetelmakohdassa tarkoitettua ajanjaksoa seuraavan ensimmäisen perunoiden tai tomaattien korjuukauden aikana ja edellyttäen, että pelto on virallisen tarkastuksen yhteydessä todettu vähintään kahden perättäisen kasvuvuoden aikana ennen istuttamista vapaaksi ylivuotisista perunan tai tomaatin kasveista tai muista isäntäkasveista, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina,
  - perunoiden osalta sallitaan ainoastaan siemen- tai ruokaperunan tuotanto,
  - korjatut mukulat tai tomaattikasvit on tutkittava liitteessä II kuvatun menettelyn mukaisesti;
- b) kaikilla muilla saastuneen tuotantopaikan pelloilla, jos vastuussa olevilla viranomaisilla on varmuus siitä, että ylivuotiset peruna- ja tomaattikasvit ja muut luonnostaan esiintyvät kasvintuhoojan isäntäkasvit, koisokasvien rikkakasvit mukaan luettuina, on hävitetty
  - ilmoitettua saastunutta seuraavan kasvuvuoden aikana
    - ei istuteta tai kylvetä yhtään perunan mukulaa, kasvia tai siementä tai muuta kasvintuhoojan isäntäkasvia,
 

tai
    - perunan mukuloiden osalta istutetaan sertifioitua siemenperunaa ainoastaan ruokaperunan tuottamiseksi,
    - tomaattien osalta istutetaan tomaattikasveja, jotka on kasvatettu direktiivin 2000/29/EY vaatimukset täyttävästä siemenestä, ainoastaan hedelmien tuottamiseksi,
  - ilmoitettua saastunutta seuraavan toisen kasvuvuoden aikana
    - istutetaan tai kylvetään siemen- tai ruokaperunan tuottamiseksi ainoastaan varmennettuja siemenperunoita tai siemenperunoita, jotka on virallisissa testeissä todettu perunan tummasta rengasmädästä vapaiksi ja jotka on kasvatettu virallisessa valvonnassa muissa kuin 4.1 kohdassa tarkoitetuissa tuotantopaikoissa,
    - istutetaan tai kylvetään kasvien tai hedelmien tuottamiseksi ainoastaan sellaisia tomaattikasveja, jotka on kasvatettu direktiivin 2000/29/EY vaatimukset täyttävästä siemenestä, tai jos ne on lisätty kasvullisesti, tomaattikasveista, jotka on tuotettu sellaisesta siemenestä ja kasvatettu virallisessa valvonnassa muissa kuin 4.1 kohdassa tarkoitetuissa tuotantopaikoissa,
  - vähintäänkin kolmannen ilmoitettua saastunutta seuraavan kasvuvuoden aikana
    - perunoiden osalta istutetaan ainoastaan sertifioituja siemenperunoita tai sertifioituista siemenperunoista virallisen valvonnan alaisina kasvatettuja siemenperunoita joko siemenen tai ruokaperunan tuottamiseksi,
    - tomaattien osalta istutetaan ainoastaan sellaisia tomaattikasveja, jotka on kasvatettu direktiivin 2000/29/EY vaatimukset täyttävästä siemenestä, tai virallisessa valvonnassa tällaisista kasveista kasvatettuja tomaattikasveja, joko kasvien tai hedelmien tuottamiseksi,
- c) välittömästi 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisen saastunnan toteamisen jälkeen ja ensimmäisenä tätä seuraavana kasvuvuotena
  - kaikki tuotantopaikan koneet ja varastotilat, joita käytetään perunan ja tomaatin tuotantoon, on puhdistettava ja tarvittaessa desinfioitava sopivin menetelmin 3 kohdan mukaisesti,
  - kastelu- ja sumutusohjelmia sekä niiden kieltoa koskevia virallisia tarkastuksia on tarvittaessa toteutettava organismin leviämisen estämiseksi;

- d) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetussa, katteen alla kasvatettujen satokasvien yksikössä, jossa kasvualustan korvaaminen kokonaan on mahdollista
- mukuloita, kasveja tai siemeniä tai muita organismin isäntäkasveja, tomaattikasvit ja tomaatin siemenet mukaan luettuina, saa istuttaa tai kylvää ainoastaan, jos tuotantoyksikköön sovelletaan virallisessa valvonnassa toimenpiteitä, joiden tarkoituksena on organismin ja kaikkien isäntäkasviaineistoon kuuluvien kasvien hävittäminen, mukaan lukien vähintään kasvualustan vaihtaminen kokonaan sekä kyseisen yksikön ja kaikkien välineiden puhdistus ja tarvittaessa desinfiointi, ja jos vastuulliset viranomaiset ovat tämän seurauksena hyväksyneet sen perunan tai tomaatin tuotantoon,
- ja
- perunantuotannossa perunoita tuotetaan sertifioituista siemenperunoista tai testatuista lähteistä olevista minimukuloista tai mikrokasveista,
  - tomaatintuotannossa tomaatteja tuotetaan direktiivin 2000/29/EY vaatimukset täyttävästä siemenestä, tai jos ne on lisätty kasvullisesti, tomaattikasveista, jotka on tuotettu sellaisesta siemenestä ja kasvatettu virallisessa valvonnassa,
  - kastelu- ja sumutusohjelmia sekä niiden kieltoa koskevia virallisia tarkastuksia on tarvittaessa toteutettava organismin leviämisen estämiseksi.

#### 4.2 Rajoittamatta 4.1 kohdassa lueteltujen toimenpiteiden soveltamista, jäsenvaltioiden on rajoitusalueen sisällä

- a) huolehdittava siitä, että välittömästi ilmoitetun saastunnan jälkeen kaikki tuotantopaikan laitteistot ja varastotilat, jotka ovat yhteydessä perunan tai tomaatin tuotantoon, puhdistetaan ja desinfioidaan tarvittaessa 3 kohdassa tarkoitetuilla sopivilla menetelmillä;
- b) välittömästi todetun saastunnan jälkeen ja sen jälkeen vähintään kolmen kasvuvuoden ajan
- ba) edellä 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iv alakohdan mukaisesti määritetyn alueen osalta
- määrättävä vastuulliset viranomaiset valvomaan tiloja, joissa harjoitetaan perunan mukuloiden tai tomaattien viljelystä varastointia tai käsittelyä, sekä niiden yritysten tiloja, jotka käyttävät perunan- tai tomaatintuotannossa koneita sopimuksen perusteella,
  - vaadittava, että kyseisen alueen kaikki perunasadot istutetaan ainoastaan sertifioitua siementä käyttäen tai virallisen valvonnan alaisena kasvatettua siementä ja että korjuun jälkeen testataan 5 artiklan 1 kohdan a alakohdan iii alakohdan mukaisesti mahdollisesti saastuneiksi määritellyillä tuotantopaikoilla kasvaneet siemenperunat,
  - vaadittava, että kaikissa alueen yrityksissä siemenperuna ja ruokaperuna käsitellään erillään tai että siemen- ja ruokaperunoiden käsittelyn välillä huolehditaan tarvittaessa puhdistamisesta ja desinfioinnista,
  - vaadittava, että kaiken alueella kasvatettavan tomaattisadon istutukseen käytetään ainoastaan tomaattikasveja, jotka on kasvatettu direktiivin 2000/29/EY vaatimukset täyttävästä siemenestä, tai jos ne on lisätty kasvullisesti, tomaattikasveja, jotka on tuotettu sellaisesta siemenestä ja kasvatettu virallisessa valvonnassa,
  - toteutettava viralliset tutkimukset 2 artiklan 1 kohdan mukaisesti;
- bb) edellä 5 artiklan 1 kohdan c alakohdan ii alakohdan mukaisesti saastuneeksi ilmoitetun tai liitteessä V olevan 2 kohdan mukaisesti organismin mahdollisen leviämisen määrittämisessä huomioon otettaviin tekijöihin kuuluvan pintaveden osalta
- toteutettava luettelossa olevan kasviaineiston osalta soveltuvina ajankohtina vuosittainen tutkimus, joka käsittää näytteenoton pintavedestä sekä asiaankuuluvista isäntäkoisoskasveista soveltuviin vedensaanti-lähteisiin liittyen sekä testauksen liitteessä II vahvistetuina soveltuvin menetelmin ja muiden tapausten osalta,

- toteutettava virallisia tarkastuksia, jotka koskevat kastelu- ja sumutusohjelmia sekä saastuneeksi ilmoitetun veden luettelossa olevan kasviaineiston kasteluun ja sumutukseen tarkoitettua käyttöä koskevaa kieltoa ja tarvittaessa muita isäntäkasveja organismin leviämisen estämiseksi. Kieltoa voidaan tarkistaa mainitussa vuosittaisessa tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella ja saastuneeksi toteaminen voidaan peruuttaa, jos vastuullinen toimivaltainen viranomainen katsoo, että pintavesi ei enää ole saastunutta. Kiellon kohteena olevan veden käyttö isäntäkasvien kasteluun ja sumutukseen voidaan sallia virallisessa valvonnassa, jos käytetään virallisesti hyväksytyjä menetelmiä, joilla taudinaiheuttaja hävitetään ja sen leviäminen estetään,
  - saastuneiden nestemäisten jätepäästöjen osalta toteutettava virallisia tarkastuksia, jotka koskevat luettelossa olevaa kasviaineistoa käsittelevien teollisten jalostus- ja pakkauslaitosten kiinteiden jätteiden tai nestemäisten jätepäästöjen hävittämistä;
- c) laadittava tarvittaessa ohjelma kaikkien siemenperunavarastojen korvaamiseksi sopivan ajanjakson kuluessa.
-

## LIITE VII

Liitteessä VI olevassa 1 kohdassa tarkoitettujen virallisesti hyväksytyjen jätteidenhävitysmenetelmien on vastattava seuraavia säännöksiä siten, että vältetään mahdollinen tunnistettava kasvintuhoojan leviämisvaara:

- i) peruna- ja tomaattijäte (hylätyt perunat ja kuoret ja tomaatit mukaan luettuina) ja mahdollinen muu perunoihin ja tomaatteihin liittyvä kiinteä jäte (maaperä, kivet ja muu jäte mukaan luettuina) hävitetään joko
- hävittämällä virallisesti hyväksytyllä tarkoitukseen varatulla jätteidenhävittämispaikalla, jossa ei ole tunnistettavaa riskiä kasvintuhoojan pääsystä ympäristöön, esimerkiksi siten, että se imeytyisi maatalousmaahan tai joutuisi kosketuksiin sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita saatetaan käyttää maatalousmaan kasteluun; jäte on kuljetettava suoraan hävittämispaikalle pakkaamalla se siten, ettei ole vaaraa jätteen häviämisestä,
- tai
- tuhkaksi polttamalla,
- tai
- muilla toimenpiteillä, jos on todettu, että minkäänlaista tunnistettavaa kasvintuhoojan leviämisvaaraa ei ole; nämä toimenpiteet on ilmoitettava komissiolle ja muille jäsenvaltioille;
- ii) nestemäinen jäte: nestemäinen jäte, joka sisältää suspendoituneita kiinteitä aineita, suodatetaan ennen hävittämistä tai kiintoaineet poistetaan laskeuttamalla. Nämä kiintoaineet hävitetään i alakohdassa esitetyllä tavalla.

Tämän jälkeen nestemäinen jäte joko

- kuumennetaan kauttaaltaan vähintään 60 °C:seen 30 minuutin ajaksi ennen hävittämistä,
- tai
- hävitetään muulla virallisesti hyväksytyllä tavalla virallisessa valvonnassa siten, ettei ole olemassa tunnistettavaa riskiä jätteen pääsystä kosketuksiin maatalousmaan tai sellaisten vedensaantilähteiden kanssa, joita saatetaan käyttää maatalousmaan kasteluun. Asiaan liittyvät yksityiskohdat on ilmoitettava muille jäsenvaltioille ja komissiolle.

Tässä liitteessä kuvatut vaihtoehdot koskevat myös saastuneiden erien käsittelyyn, hävittämiseen ja prosessointiin liittyvää jätettä.”