



### **ADVIES 11-2010**

**Betreft :** Alternatieve analyseprocedures voor *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) en *Ralstonia solanacearum* (Raso) (dossier Sci Com 2009/31).

Advies gevalideerd door het Wetenschappelijk Comité op 19 maart 2010.

#### **Samenvatting**

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd om in dit advies alternatieve analyseprocedures voor te stellen voor het opsporen van *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en *Ralstonia solanacearum* in aardappelknollen.

Met het aangeven van alternatieve analyseprocedures wordt ernaar gestreefd het gebrek aan specificiteit te verhelpen van de analyses ter opsporing van *C. m.* subsp. *sepedonicus* en de analysetermijn bij vermoede aanwezigheid van *C. m.* subsp. *sepedonicus* of *R. solanacearum* aanzienlijk te verkorten.

Het Wetenschappelijk Comité stelt een aantal alternatieve analyses voor het opsporen van *C. m.* subsp. *sepedonicus* en *R. solanacearum* voor maar meent dat deze problematiek ook op Europees niveau, door toedoen van de EFSA, zou moeten worden onderzocht.

#### **Summary**

**Advice 11-2010 of the Scientific Committee of the FASFC on alternative procedures for the analysis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and *Ralstonia solanacearum* (Raso)**

The Scientific Committee is asked to propose alternative analysis procedures for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and *Ralstonia solanacearum* (Raso) in tubers of potatoes.

By putting forward alternative analysis procedures it is aimed to remediate for the lack of specificity of the analyses for the detection of *C. m.* subsp. *sepedonicus* and to reduce significantly the time of analysis in case of suspected presence of *C. m.* subsp. *sepedonicus* or *R. solanacearum*.

The Scientific Committee proposes several alternative analysis for the detection of *C. m.* subsp. *sepedonicus* and *R. solanacearum* but is of the opinion that this subject should be discussed at European level, through the EFSA.

## **Sleutelwoorden**

Aardappel – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) – *Ralstonia solanacearum* (Raso) – analyse – alternatieve procedure

## 1. Referentietermen

### 1.1. Vragen

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd de volgende drie vragen te beantwoorden :

1. Welke alternatieve analyseprocedures zouden voor *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) in aardappelen moeten worden uitgewerkt en ter goedkeuring aan de Europese Commissie voorgelegd om de thans bij herhaling voorkomende valspositieve resultaten te vermijden en de huidige termijn voor het bevestigen van besmettingen te verkorten ?
2. Welke alternatieve analyseprocedures zouden voor *Ralstonia solanacearum* (Raso) in aardappelen moeten worden uitgewerkt en ter goedkeuring aan de Europese Commissie voorgelegd om de huidige termijn voor het bevestigen van besmettingen te verkorten ?
3. Welke onderzoekspistes zouden het meest relevant zijn, als het Wetenschappelijk Comité niet in staat mocht zijn om dergelijke alternatieve procedures voor te stellen, en welke referentietermen zou het Agentschap kunnen voorstellen aan het door de Commissie aangeduide panel van deskundigen met het oog op het zoeken naar en uitwerken van alternatieve analyseprocedures ?

### 1.2. Wetgevende context

Richtlijn 93/85/EEG van de Raad van 4 oktober 1993 betreffende de bestrijding van aardappelringrot (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).

Richtlijn 98/57/EG van de Raad van 20 juli 1998 betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Richtlijn 2006/56/EG van de Commissie van 12 juni 2006 tot wijziging van de bijlagen bij Richtlijn 93/85/EEG van de Raad betreffende de bestrijding van aardappelringrot.

Richtlijn 2006/63/EG van de Commissie van 14 juli 2006 tot wijziging van de bijlagen II tot VII van richtlijn 98/57/EG van de Raad betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Ministerieel besluit van 3 november 1994 betreffende de bestrijding van aardappelringrot (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).

Ministerieel besluit van 30 augustus 1999 betreffende de bestrijding van *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroep van 21 oktober 2009 en de plenaire zitting van 19 maart 2010,

**geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :**

## 2. Inleiding

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) is de fytopathogene bacterie die verantwoordelijk is voor ringrot bij aardappelen. De aanwezigheid van de ziekte uit zich in en op knollen vooral door het rotten van de vaatring en op de planten vooral door het verwelken van het hele plant. De bacterie verspreidt zich ofwel rechtstreeks bij contact tussen een besmette aardappel en een gezonde aardappel die evenwel niet gaaf is, ofwel onrechtstreeks bij contact tussen een dergelijke aardappel en een oppervlak dat in contact is geweest met een besmette aardappel. De bacterie geldt in de Europese Unie als quarantaineorganisme. Dat betekent dat alle lidstaten maatregelen moeten treffen om de bacterie op te sporen en de ziekte uit te roeien. De voorgeschreven maatregelen zijn weergegeven in Richtlijn 93/85/EEG.

*Ralstonia solanacearum* (Raso) is de fytopathogene bacterie die verantwoordelijk is voor bruinrot bij aardappelen. De aanwezigheid van de ziekte uit zich op de knollen vooral door het naar buiten treden van bacterieslijm uit de ogen en de navelinden van besmette knollen. Op de planten uit zij zich vooral door verwelking van het loof aan de uiteinden van de stengels als het overdag warm is. De bacterie verspreidt zich vooral door gebruik van oppervlaktewater bij beregening bij aanwezigheid van *Solanum dulcamara* (bitterzoet). Die plant treedt op als reservoir waarin de bacterie in de winter kan overleven en zich daarna in de zomer kan vermeerderen. De bacterie geldt in de Europese Unie eveneens als een quarantaineorganisme. Dat betekent dat alle lidstaten maatregelen moeten treffen om de bacterie op te sporen en de ziekte uit te roeien. De voorgeschreven maatregelen zijn weergegeven in Richtlijn 98/57/EG.

Het analyseproces voor het opsporen van *C. m.* subsp. *sepedonicus* en *R. solanacearum* in aardappelknollen staat zeer nauwkeurig in de wetgeving beschreven (cf. met name Richtlijnen 2006/56/EG en 2006/63/EG) Dat proces verloopt als volgt :

- Er wordt een eenheidsmonster van 200 knollen genomen ; van één partij kunnen meerdere monsters worden genomen al naargelang van het areaal ;
- Er wordt op het monster een eerste analyse uitgevoerd : via immunofluorescentie (IF), via Polymerase Chain Reaction (PCR) of via Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) voor *C. m.* subsp. *sepedonicus* (cf. ook EPPO (2006) en van der Wolf *et al.* (2005) voor meer details over die methoden) en via IF, via PCR of via selectief isoleren voor *R. solanacearum* ;
- Als het resultaat positief is wordt op hetzelfde monster een tweede analyse uitgevoerd die steunt op een ander biologisch principe dan het eerste ;
- Alleen als de resultaten van de twee analyses positief zijn wordt aanwezigheid van de bacterie vermoed en wordt daarvan melding gedaan. Het analyseproces moet worden voortgezet waarbij een kweek van de bacterie wordt aangelegd om de identiteit en de fytopathogeniciteit ervan te bepalen. Rechtstreeks isoleren van *C. m.* subsp. *sepedonicus* uit een besmet monster is moeilijk en gebeurt daarom na verrijking van de bacterie via een bioassay op aubergineplanten. Voor *R. solanacearum* zijn er geen moeilijkheden. De fytopathogeniciteit van beide bacteriën wordt aangetoond op kiemplanten van aubergine (voor *C. m.* subsp. *sepedonicus*) of tomaat (voor *R. solanacearum*). Intussen wordt bewarend beslag gelegd op alle partijen die ermee verbonden zijn (klonale verwantschap of via contact).

In de praktijk doen zich bij de uitvoering van die analyses twee problemen voor.

1. Alleen voor *C. m.* subsp. *Sepedonicus* : de analyses voor het opsporen van de bacterie zijn te weinig specifiek en te weinig gevoelig. Het gebeurt immers dat bij de twee analyses verkregen positieve resultaten achteraf niet worden bevestigd bij de kweek, rechtstreeks isoleren of bioassay op aubergine.

2. De analysetermijn is zeer lang bij vermoede aanwezigheid van zowel *C. m. subsp. sepedonicus* als van *R. solanacearum*. Er verloopt immers ten minste vier weken (tot twee maand als er geen proefplanten zijn of als zich moeilijkheden voordoen bij het isoleren) tussen het begin van de analyse en het verkrijgen van het resultaat van de bioassay en dat geldt voor de opsporing van beide bacteriën.

Dat kan zware economische gevolgen hebben voor de operatoren uit de sector die te maken krijgen met verdachte aardappelpartijen en des te meer als het gaat om pootaardappelen en de aanwezigheid wordt vastgesteld tijdens het verkoopseizoen van die pootaardappelen.

De vragen gesteld aan het Wetenschappelijk Comité beogen het aangeven van alternatieve analyseprocedures waarmee deze praktische problemen kunnen worden vermeden.

### 3. Advies

Pro memorie : bij alle analysemethoden kunnen valspositieve (risico  $\alpha$ ) en valsnegatieve (risico  $\beta$ ) resultaten voorkomen. Geen enkele analysemethode is dus 100 % betrouwbaar. De  $\alpha$  en  $\beta$  risico's moeten echter wel zo klein mogelijk worden gehouden.

Van besmetting met *C. m. subsp. sepedonicus* verdachte gevallen (positieve IF en PCR) die niet door bioassay worden bevestigd blijven zeldzaam. Voor alle analyses die werden uitgevoerd sinds 2006, het jaar waarin de nieuwe referentiemethode voor de opsporing werd ingevoerd (Richtlijn 2006/56/EG) werden bij het ILVO, het nationale referentielaboratorium voor analyses op quarantaine bacteriën bij aardappelen, amper 2 gevallen niet bevestigd op meer dan 5000 analyses, wat neerkomt op minder dan 0,04 %. Uitgedrukt in verhouding tot het totale aantal gevallen van besmetting met *C. m. subsp. sepedonicus* verdachte gevallen (= door de bioassay wel en niet bevestigde gevallen) zou dat percentage tussen 40 en 50 % schommelen, namelijk 2 niet-bevestigde verdachte gevallen op een totaal van 4 tot 5 verdachte gevallen.

Er zij ook aangestipt dat wanneer de analyses op pootaardappelen zouden worden uitgevoerd nadat die zijn geoogst maar vóór de jaarwisseling en dus lang voordat ze worden gepoot, de economische gevolgen duidelijk minder zwaar zouden zijn omdat de analyses dan buiten de planttijd zouden vallen.

Het probleem met valspositieve resultaten (= positieve IF en PCR maar niet bevestigd door bioassay) betreft alleen *C. m. subsp. sepedonicus* waarvoor besmetting van aardappelen kan worden veroorzaakt door een klein aantal bacteriën, ongeveer gelijk aan het aantal bacteriën dat niet kan worden opgespoord met IF, dat wil zeggen minder dan  $10^5$  cellen per in suspensie gebrachte ml geconcentreerd extract. Dit is in tegenstelling tot *R. solanacearum* waarvoor dat aantal doorgaans zeer groot is, wat de opsporing vergemakkelijkt. Zo geven bij een thans in het ILVO lopend project betreffende het valideren van de bioassay volgens norm ISO 17025 slechts 10 % van de gevallen een positief resultaat bij de bioassay als een besmettingsniveau van  $10^3$  cellen/in suspensie gebrachte ml geconcentreerd extract in aanmerking wordt genomen, tegenover 90 % als een besmettingsniveau van  $10^4$  cellen/in suspensie gebrachte ml geconcentreerd extract in aanmerking wordt genomen.

In een aantal landen worden de aardappelpartijen vrijwillig (= beslissing van de sector) uit het circuit voor pootaardappelen gehaald wanneer de aanwezigheid van deze quarantaine bacteriën wordt vermoed (= 2 analyses die een positief resultaat te zien geven), zonder dat wordt gewacht op de bevestiging bij middel van bioassay (bijvoorbeeld Duitsland). Die voorzichtige aanpak wijst op een sterk fytosanitair beleid.

Er moet ook worden gewezen op het belang van de evaluatie van de reagentia die nodig zijn voor de analyses (bijvoorbeeld : antistoffen, PCR initiator, methoden om DNA te isoleren, ...) door het nationale referentielaboratorium zoals dat in Frankrijk gebeurt. Het is immers zo dat reeds verschillen in de kwaliteit van de op de markt beschikbare antistoffen werden

vastgesteld en dat heel wat aspecifieke reacties met gewone bodembacteriën konden worden aangetoond.

Vanuit wetenschappelijk en statistisch oogpunt en gelet op de doorgaans lage infectiegraad (om en bij 0,1 %) bij de productie van (poot)aardappelen, zou men ongeveer 4500 knollen per partij moeten onderzoeken om met een betrouwbaarheidsniveau van 99 % kans te hebben om een dergelijk lage infectiegraad te detecteren (van der Wolf *et al.*, 2005). Een monster van 200 aardappelen, zoals thans gebruikelijk is, geeft slechts 18 % kans om een infectiegraad van 0,1 % te detecteren.

Het Wetenschappelijk Comité meent tot slot dat deze problematiek op Europees niveau zou moeten worden onderzocht en dat bijgevolg de EFSA hierover om advies moet worden gevraagd. De vraag of een bioassay noodzakelijk is als bewijs bij isolatie van de bacterie zou daarbij kunnen worden gesteld.

### **3.1. Welke alternatieve analyseprocedures zouden voor *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) in aardappelen moeten worden uitgewerkt en ter goedkeuring aan de Europese Commissie voorgelegd om de thans bij herhaling voorkomende valspositieve resultaten te vermijden en de huidige termijn voor het bevestigen van besmettingen te verkorten ?**

Een alternatieve analyseprocedure die potentieel specifiek, robuuster en gevoeliger is dan immunofluorescentie of gewone PCR zou bestaan in de uitvoering van een real time PCR analyse (EPPO, 2006). Een dergelijke analysemethode werd gebruikt in een test die werd gevalideerd tijdens een EUPHRESO interlaboratoriumproef. Die methode zal dan ook in 2010 aan de Commissie worden voorgelegd voor goedkeuring als analysemethode.

Het Wetenschappelijk Comité stelt daarom als alternatief analyseproces voor het opsporen van *C. m.* subsp. *sepedonicus* het volgende voor :

1. Uitvoering van drie verschillende analyses : een immunofluorescentietest, een gewone PCR-test en een real time PCR-test op basis van een andere genetische initiator van de bacterie dan die van een gewone PCR-test. Die drie analyses zouden worden uitgevoerd op een monster van 200 knollen.
2. Als ten minste twee van die drie analyses positief zijn moet de betreffende partij als bevestigd besmet worden beschouwd en moet dus geen bioassay meer worden uitgevoerd.
3. Als de operator het resultaat betwist wordt een nieuw, groter monster genomen van ten minste 4 605 knollen dat op verzoek en op kosten van de operator wordt geanalyseerd volgens de drie hierboven vermelde methoden. Het is de bedoeling zo de analyseonzekerheid te verkleinen en te voldoen aan de statistische voorwaarden. Het is bij een dergelijke monstergrootte immers vrijwel uitgesloten dat geen besmette aardappelen worden gevonden als de eerder verkregen resultaten authentiek zijn, dat wil zeggen werkelijk moeten worden toegeschreven aan *C. m.* subsp. *sepedonicus*.
4. Op basis van dat nieuwe monster en alleen als een negatief resultaat werd verkregen bij ten minste twee analyses van verschillend type, waaronder real time PCR, wordt het vermoeden opgeheven voor de van besmetting verdachte en van waarschijnlijke besmetting verdachte partijen.
5. Als de operator de analyseresultaten voor die 4 605 aardappelen opnieuw betwist, wordt op verzoek en op kosten van de operator een bioassay uitgevoerd. De operator moet daarbij wel beseffen dat het minstens 1 maand duurt eer een resultaat beschikbaar is.

In verband met de verkorting van de huidige termijnen om besmettingen te bevestigen zou het hierna uiteengezette voorstel (cf. antwoord op vraag 3.2.) ook in overweging kunnen worden genomen voor de analyses op *C. m.* subsp. *sepedonicus*.

**3.2. Welke alternatieve analyseprocedures zouden voor *Ralstonia solanacearum* (Raso) in aardappelen moeten worden uitgewerkt en ter goedkeuring aan de Europese Commissie voorgelegd om de huidige termijn voor het bevestigen van besmettingen te verkorten ?**

Doel van de bioassay is de aanwezigheid aantonen van levensvatbare bacteriën, dat zijn bacteriën die in staat zijn een infectie te veroorzaken. Als alternatief voor de bioassay zou het Wetenschappelijk Comité de ontwikkeling voorstellen van een analysemethode die steunt op de detectie van voor die quarantaine bacteriën specifiek boodschapper-RNA (Bach *et al.*, 2003 ; Gudmestad *et al.*, 2009 ; van Beckhoven *et al.*, 2002 ; Van der Wolf *et al.*, 2004 ; Weller *et al.*, 2000), in plaats van DNA. De aanwezigheid van boodschapper-RNA dat voortkomt uit de transcriptie van DNA is immers een bewijs van celactiviteit van de bacterie.

**3.3. Welke onderzoekspistes zouden het meest relevant zijn als het Wetenschappelijk Comité niet in staat mocht zijn om dergelijke alternatieve procedures voor te stellen, en welke referentietermen zou het Agentschap kunnen voorstellen aan het door de Commissie aangeduide panel van deskundigen met het oog op het zoeken naar en uitwerken van alternatieve analyseprocedures ?**

Niet van toepassing gelet op de op vragen 3.1 en 3.2 gegeven antwoorden.

#### **4. Conclusies**

Het Wetenschappelijk Comité stelt een aantal alternatieve analyses voor het opsporen van *C. m. subsp. sepedonicus* en *R. solanacearum* voor maar meent dat die problematiek ook op Europees niveau zou moeten worden onderzocht, door toedoen van de EFSA.

Voor het Wetenschappelijk Comité,  
De Voorzitter,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Brussel, 19/03/2010

## Referenties

Bach HJ, Jessen I, Schloter M and Munch JC, 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J Microbiol Methods*. 52(1):85-91.

EPPO, 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Diagnostic. PM 7/59. *EPPO Bulletin*. 36, 99-109.

Gudmestad NC, Mallik I, Pasche JS, Anderson NR and Kinzer K., 2009. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Disease*. 93: 649-659.

van Beckhoven JR, Stead DE and van der Wolf JM, 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J Appl Microbiol*. 93(5):840-9.

van der Wolf JM, Van Beckhoven JRCM, De Haan EG, Van den Bovenkamp GW and Leone GOM, 2004. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. *European Journal of Plant Pathology*. Volume 110, Number 1 / January, 2004.

van der Wolf JM, Elphinstone JG, Stead DE, Metzler M., Müller P., Hukkanen A. & Karjalainen R., 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. *Plant Research International*. Wageningen UR. Report 95.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N and Stead DE, 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol*. 66(7):2853-8.

## Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Lheureux, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem, G. Vansant

## Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt het wetenschappelijk secretariaat en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies. De werkgroep was samengesteld uit :

Leden van het Wetenschappelijk Comité  
Externe experts

C. Bragard (verslaggever), B. Schiffers  
M. Moens (ILVO), J.-L. Rolot (CRA-W), J. Van  
Vaerenbergh (ILVO)

## Wettelijk kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8 ;



Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen ;

Huishoudelijk reglement bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 27 maart 2006.

## **Disclaimer**

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.