



Ea AgriStrip – ein neuer Schnelltest zum Nachweis von Feuerbrand

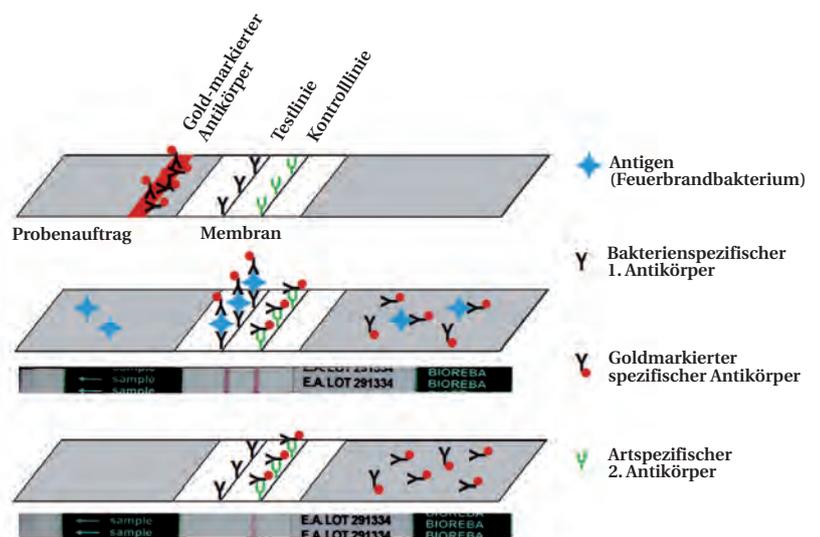
Damit Massnahmen zur Bekämpfung von Feuerbrand rasch eingeleitet werden können, braucht man schnelle Diagnoseverfahren zur Ursachenabklärung des beobachteten Pflanzenschadens. Bisherige Methoden erforderten die Einsendung feuerbrandverdächtigen Pflanzenmaterials ins Feuerbrand-Diagnoselabor und mindestens zwei Tage bis zum Ergebnis durch Erregernachweis mit dem Plattenverfahren und Bestätigung durch Serum-Agglutination. Der neue Immun-Schnelltest (Ea AgriStrip), dem eine serologische Funktionsweise basierend auf bakterienspezifischen Antikörpern zugrunde liegt, wurde in einem gemeinsamen Projekt (2006–2009) durch die BIOREBA AG entwickelt und von der Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW in Zusammenarbeit mit den Kantonalen Pflanzenschutzdiensten unter Praxisbedingungen in Labor und Feld getestet.

ANDREA BRAUN-KIEWNICK, JACOB VOGELSANGER, BEATRICE SCHOCH, LUCIE FRANCK, EDUARD HOLLIGER UND BRION DUFFY, FORSCHUNGSANSTALT AGROSCOPE CHANGINS-WÄDENSWIL ACW DENISE ALTENBACH, THOMAS OBERHÄNSLI, WALTER BITTERLIN, BIOREBA AG, REINACH BL
brion.duffy@acw.admin.ch

Die Bewertung des neuen Schnelltests (Abb. 1) erfolgte dabei, neben der Bestimmung der Spezifität und Sensitivität (Nachweisgrenze), durch Vergleich mit bewährten und von der EPPO empfohlenen Verfahren zur Feuerbranddiagnose wie der Isolierung des Feuerbrandbakteriums auf Nähr-Agarplatten und der Nested PCR (EPPO Bulletin 2004).

Spezifität – reagiert der Schnelltest auch mit anderen Mikroorganismen?

Im Test mit 47 Bakterienisolaten wies der Schnelltest eine sehr hohe Spezifität gegenüber *Erwinia amylovora*-Isolaten (20) aus Europa und den USA auf. Nur mit *Erwinia pyrifoliae*, einem nahen Verwandten des Feuerbranderreger, der aber in der Schweiz bisher nicht vorkommt, zeigte sich eine Kreuzreaktion. Mit anderen Bakterien, die auch häufig auf den Feuerbrandwirtpflanzen zu finden sind, wie Pseudomonaden, Xanthomonaden, *Pantoea sp.* oder Bakterien, die als Antagonisten gegen Feuerbrand eingesetzt werden können,



wie *Bacillus sp.* (Serenade™) und Hefen (Blossom Protect™) ergaben sich keine Reaktionen.

Sensitivität – bei welcher Bakterienmenge findet noch eine Reaktion statt?

Untersuchungen zur Nachweisgrenze des Schnelltests zeigten sowohl bei Reinkulturen von *Erwinia amylovora*

Abb. 1: Serologische Funktionsweise des Ea AgriStrip Schnelltests (Antigen-Antikörperreaktion).

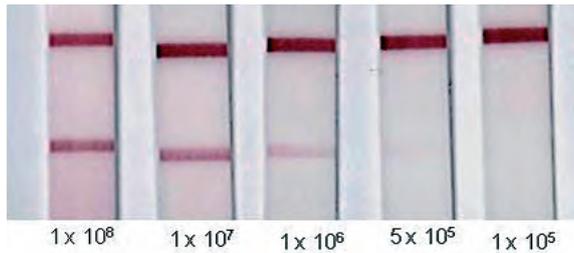


Abb. 2: Nachweisgrenze (Bakterienkonzentrationen in cfu/ml) des Schnelltests in Verdünnungsreihen von *Erwinia amylovora* (CFBP 1430).

als auch bei künstlich inokulierten Pflanzenextrakten (aus Apfelholz) eine benötigte Bakteriendichte von mindestens 5×10^5 cfu/ml (Abb. 2), um noch schwach positive Reaktionen hervorzurufen. Dies ist besonders wichtig im Frühjahr und Herbst, wenn sich die Bakteriendichten im Feld aufgrund der tieferen Temperaturen knapp um die Nachweisgrenze herum bewegen. Sollte es nötig sein, tiefere Bakterienmengen nachzuweisen, müssten sensitivere DNA-Methoden herangezogen werden.

Vergleichsuntersuchungen im Feuerbranddiagnoselabor (2006–2008)

Von den insgesamt 525 getesteten feuerbrandverdächtigen Proben stammten 157 von Birne, 177 von Apfel, 84 von Quitte, 31 von Weissdorn und 30 von *Cotoneaster dammeri*. Der Rest kam von weiteren Feuerbrandwirtspflanzen wie Scheinquitte, Vogelbeere, Feuerdorn und *Cotoneaster salicifolius* (47). Die Proben stammten von Blättern, Ästen, Zweigen, Blüten und Früchtchen mit feuerbrandverdächtigen Symptomen. Zur Testung wurden sie zunächst visuell beurteilt und dann Übergänge zwischen befallenem und gesundem Pflanzengewebe gesucht. Bei der visuellen Bonitur werden Zahlen von 0 bis 4 vergeben, je nach Schweregrad der feuerbrandverdächtigen Symptome:

VBL 0 = kein feuerbrandverdächtiges Material

Zum Beispiel keine Symptome.

VBL 1 = wenig verdächtig

Unspezifische Nekrosen an Trieben und Ästen; Nekrosen nur auf der äusseren Rinde, gesundes Pflanzengewebe unter der Rinde, keine Übergänge; Mehltau oder Insektenbefall (Birnentriebwespen-Befall zeigt ähnliche Symptome wie Feuerbrand).

VBL 2 = verdächtig

Blattstiele und Blattbüschel verfärbt (ohne Symptome im Holz); am Baum abgestorbene Blütenbüschel; Canker (altes Holz) mit unklaren Übergängen; trockener Übergang im Holz; Verwechslungsgefahr mit Rindenbrand oder Monilia.

VBL 3 = sehr verdächtig

FrISCHE, feuchte rot-braun marmorierte Übergangsstellen im Holz; schwammiges Holz; Schwarzfärbung des Blatts vom Blattstiel her, dem Blattnerve entlang oder am Blattgrund; rötlich-schwarz verfärbte Blütenstiele; Früchte schwarz und vertrocknet; feucht-glänzende Oberflächen an Holz und/oder Blütenstielen; Verwechslungsgefahr mit *Pseudomonas syringae*.

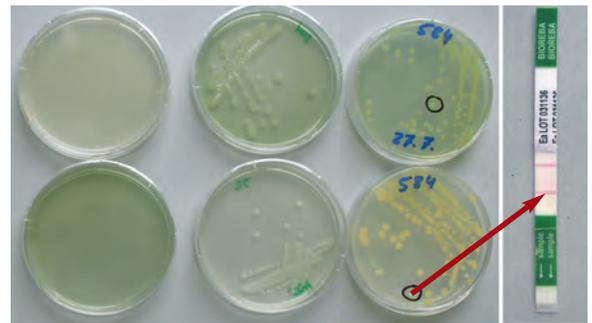


Abb. 3: Erregernachweis durch Isolierung auf Nähragarplatten (Koloniecharakteristik), evtl. Kolonie-Nachtestung mit Serumagglutination oder Ea AgriStrip Schnelltest.



Abb. 4: Erregernachweis durch den Ea AgriStrip Schnelltest im Labor.

VBL 4 = definitiv feuerbrandverdächtiges Material

Typische Feuerbrandsymptome; ganzer Zweig schwarz, verbrannt; Schwarzfärbung der Blütenstiele und Mittelrippen an Blättern; U-förmig abgebogene Zweige; Schleimtropfen.

Das Pflanzenmaterial (ca. 0.1 g; drei bis vier kleine Stücke von 0.5 bis 3 cm Grösse) wurde mit sterilen Messern und Pinzetten entnommen und in 4 ml Phosphatpuffer für 15 bis 30 (60) Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und mit den entsprechenden Methoden getestet.

Von den 525 untersuchten Proben waren 56% feuerbrandpositiv mit dem Plattenverfahren (Abb. 3) und 54% positiv mit dem neuen Schnelltest (Abb. 4). Weitere Vergleichsuntersuchungen des Schnelltestes mit der Standarddiagnose ergaben eine 95 bis 98% Übereinstimmung positiver und negativer Resultate, das heisst im Schnitt 96.3% über drei Jahre. Dies sind sehr gute Übereinstimmungen, besonders wenn man berücksichtigt, wie unterschiedlich und inhomogen das vorhandene Pflanzenmaterial war (Blätter, Früchte, Zweige von unterschiedlichen Feuerbrandwirtspflanzen).

Vergleichsuntersuchungen im Feld in Zusammenarbeit mit den kantonalen Pflanzenschutzdiensten KPSD (2008)

Auch der Vergleich der positiven und negativen Ergebnisse des Ea AgriStrip Schnelltests im Feld (Abb. 5) mit

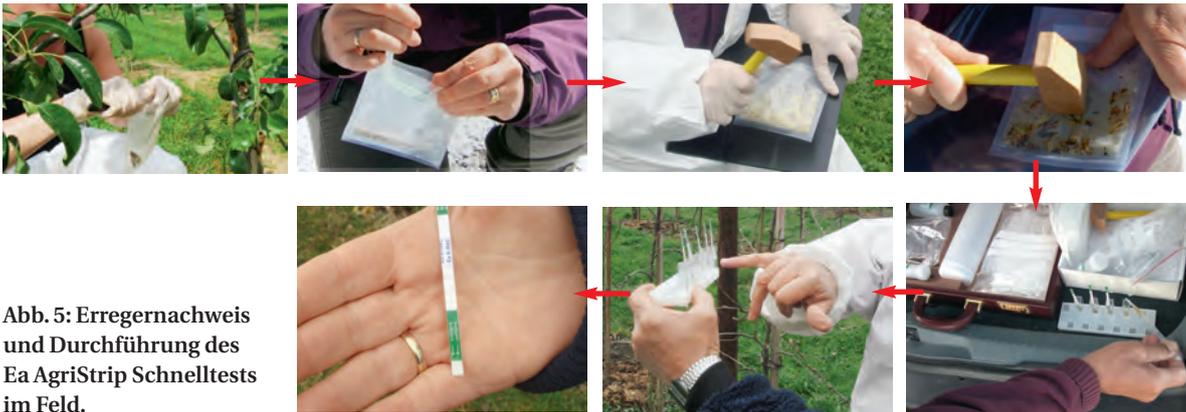


Abb. 5: Erregernachweis und Durchführung des Ea AgriStrip Schnelltests im Feld.

Ergebnissen der Isolation des Erregers auf Platte (Abb. 3) und der Nested PCR im Labor zeigten gute Übereinstimmung. Die allgemeine Übereinstimmung positiver und negativer Ergebnisse von Schnelltest und der Plattenisolierung lagen bei 89% und von Schnelltest und PCR bei 91%. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe von Korrelationsanalysen bestätigt werden. Der Vergleich von Ea AgriStrip mit der Plattenisolierung ergab einen höchst signifikanten positiven linearen Zusammenhang zwischen den beiden Methoden ($r = 0.810$, $P \leq 0.001$, $n = 201$). Der Vergleich von Ea AgriStrip mit PCR-Ergebnissen ergab ebenfalls einen höchst signifikanten positiven linearen Zusammenhang ($r = 0.834$, $P \leq 0.001$, $n = 201$). Der Vergleich von Plattentest mit PCR ergab einen höchst signifikanten, aber moderaten positiven Zusammenhang der Ergebnisse beider Methoden ($r = 0.698$, $P \leq 0.001$, $n = 201$).

Dies ist erklärlich, denn die höchst sensitive Nested PCR Methode detektierte die grösste Anzahl an positiven Feuerbrandproben von Apfel- und Birnbäumen (70%) im Vergleich zu Schnelltest (65%) und Plattenisolierung (51%, Tabelle). Insbesondere in Cankerproben und Pflanzenproben, die eine Vielzahl anderer epiphytischer Bakterien aufwiesen, konnte *Erwinia amylovora* weniger häufig auf der Platte isoliert und damit nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen mit den Kantonalen Pflanzenschutzdiensten waren von insgesamt 305 untersuchten feuerbrandverdächtigen Proben 186 positiv mit dem Schnelltest im Feld, 92 Proben waren negativ und 27 zeigten unsichere Ergebnisse (sehr schwache Testlinien im Vergleich zur Kontrolllinie). Von diesen wurden 13 Proben (4%) zur weiteren Abklärung ins Feuerbranddiagnose-Labor der ACW eingesandt.

Schlussfolgerung

Der Ea AgriStrip Schnelltest eignet sich sowohl im Labor als auch im Feld zur schnellen Diagnose des Feuerbrand-erregers in Pflanzengewebe mit Symptomen.

Aufgrund der sehr guten und hohen Übereinstimmung des Schnelltests mit der Standarddiagnosemethode und der sehr hohen Spezifität werden Feuerbrandverdachtsproben, deren visuelle Beurteilung eine Note von mindestens 2 und eine Trübung nach dem Schütteln in Puffer aufweisen, im Diagnoselabor jetzt routinemässig mit dem Schnelltest geprüft. Durch die

Nachweis von *Erwinia amylovora* (Ea) in feuerbrandverdächtigen Pflanzenproben mittels Plattenisolierung (Standarddiagnose), Nested PCR und dem neu entwickelten Immuntest (Ea AgriStrip).

Wirtspflanze	Anzahl positiver Proben/Gesamtanzahl der Proben		
	Plattenisolierung	Nested PCR	Ea AgriStrip
Gesamt	105/201	142/201	131/201
Apfel	79/141	98/141	95/141
Birne	18/49	36/49	28/49
Quitte	3/3	3/3	3/3
Andere	5/8	5/8	5/8
Zeit, bis Testergebnis vorliegt	2–3 Tage	24 Stunden	10–15 Minuten

Verkürzung der Diagnosedauer von 48 Stunden auf 15 Minuten (Tabelle) können die Resultate rascher an den kantonalen Pflanzenschutzdienst geschickt werden und damit Schritte zur Sanierung schneller erfolgen. Im Weiteren wird der Serum-Agglutinationstest zur Nachbestätigung von *Erwinia amylovora*-Kolonien auf der Platte jetzt durch den Schnelltest ersetzt. Er verkürzt die Laborarbeitszeit für diesen Arbeitsschritt von über 50 auf unter 15 Minuten. Dies ist das Resultat von Vergleichen vom Serum-Agglutinationstest mit den Schnelltests in den Jahren 2006 und 2007. Die Ergebnisse waren bei den 490 untersuchten Verdachtsproben zu 97% übereinstimmend.

Auch der Vergleich der Ergebnisse des Schnelltests im Feld mit der Standardmethode und der Nested PCR zeigte mit 89% beziehungsweise 91% überzeugende Übereinstimmungen. Die Zufriedenheit der KPSD mit dem Schnelltest und die Akzeptanz bei den Obstbauern ist aufgrund der einfachen Handhabung, der Anwendung direkt im Feld, der Bestätigung des visuellen Verdachts, der Schnelligkeit bis zum Endresultat und damit der sofortigen Einleitung von Sanierungsmassnahmen sehr hoch. Die Bestätigung des visuellen Verdachts ist von besonderer Bedeutung, da sich gerade die Diagnose von Symptomen der unteren Boniturstufen (VBL 1–2), die im Labor am häufigsten auftreten (Abb. 6a), aufgrund oft vorkommender Mischinfektionen manchmal als schwierig darstellt. In unseren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass in diesen Boniturstufen die Anzahl positiv getesteter Proben mit dem Schnelltest meist zwischen den Werten des Plattentests und der Nested PCR lag (Abb. 6b).

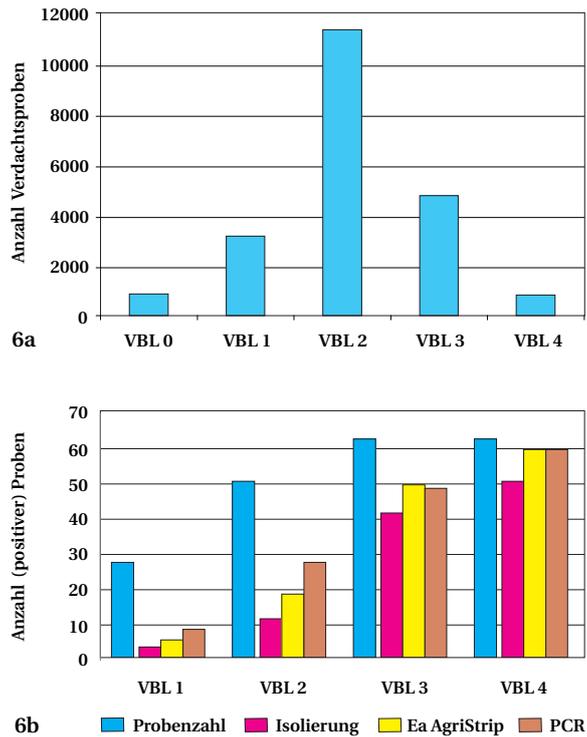


Abb. 6a: Verteilung der feuerbrandverdächtigen Pflanzenproben auf die visuellen Boniturstufen (VBL 0 – 4) im Feuerbranddiagnoselabor in den Jahren 2005–2008 (n = 20904).

Abb. 6b: Nachweis von *Erwinia amylovora* mittels Plattenisolierung (Standard), Ea AgriStrip und Nested PCR in Pflanzenproben (n = 201) aus unterschiedlichen visuellen Boniturstufen.

Allerdings hat der Schnelltest wie alle Methoden neben Vorteilen (Schnelligkeit, Preis – Leistung, Anwendung direkt im Feld, sofortige Einleitung von Sanierungsmaßnahmen) auch Grenzen (verzögerte Streifenentwicklung bei geringer Bakterienkonzentration und tiefen Temperaturen, z.B. im Frühjahr/Herbst). Er ist zurzeit weiterhin nicht geeignet, um den Feuerbranderreger in latent befallenen Pflanzenteilen (ohne Symptome) nachzuweisen. Auch müssen beim Gebrauch des Schnelltests zur Diagnose im Feld besondere gesetzliche Bestimmungen eingehalten werden, da es sich beim Feuerbranderreger um ein Quarantänebakterium handelt, mit dessen Umgang besondere Auflagen verknüpft sind (vergleiche SZOW 9/2009, Seite 16).

Dank

Das Projekt (8818.1 PFLS-LS) wurde von der Schweizer Kommission für Technologie und Innovation (KTI) finanziell unterstützt. Ein besonderer Dank gilt den Personen der Kantonalen Pflanzenschutzfachstellen, die bei der Probenevaluierung tatkräftig mitgeholfen haben, insbesondere die Kantone ZH, TG, LU, SG und alle anderen, die die Fragebogen vorschriftsmässig ausgefüllt und an uns zurückgesandt haben. Auch dem Pflanzenschutzinspektorat der ACW sei an dieser Stelle für die stete Unterstützung gedankt. ■

Ea AgriStrip – le test rapide pour le dépistage du feu bactérien

Afin que les mesures de lutte contre le feu bactérien puissent être déclenchées dans les plus brefs délais, il faut un diagnostic rapide. C'est à cet effet que le test rapide AgriStripEa a été mis au point par la maison BIOREBA AG et testé en laboratoire et sur le terrain par la Station de recherches Agroscope Changins-Wädenswil ACW dans les conditions de la pratique. Au fil des essais réalisés de 2006 à 2008 avec 47 isolats de bactéries (entre autres *Pseudomonades*, *Xanthomonades*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Bacillus* et levures), la ban-

de test a affiché une très forte spécificité. Les services phytosanitaires cantonaux se montrent très satisfaits de ce test rapide et les arboriculteurs l'ont très vite adopté en raison de sa manipulation simple, de l'application directe au site, de la certitude complémentaire qu'il apporte en sus de l'examen visuel, de la rapidité du résultat final et donc, de la possibilité de prendre immédiatement les mesures d'assainissement nécessaires.

R É S U M É