

Verbesserte Feuerbranddiagnose mittels qPCR

Richard Gottsberger

Abteilung für Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten

21. Feuerbrand Round Table, Wien 14.12.2017

Entwicklung der qPCR für Forschungsprojekt Dafne 100060



„Untersuchungen ausgewählter Parameter im Hinblick auf die Verbesserung der Möglichkeiten zur Vorbeugung und Bekämpfung von Feuerbrand (*Erwinia amylovora*)“

- Sensitive quantitative Nachweismethode um Verteilung der *Ea* Bakterien in künstlich infizierten Bäumchen zu erfassen (real time qPCR).
- Korrelation der Bakterienanzahl mit Symptomausprägung (Bonituren)
- qPCR detektiert chromosomalen Genabschnitt; auch *Ea* Stämme ohne *pEA29* plasmid
- Wurde 2 Jahre lang vergleichend an Routine Proben und Stammsammlung getestet >
Gottsberger RA (2010) *Lett Appl Microbiol.* 51: 285-92
- Wird ständig an neuen, auch nicht österreichischen *Ea* getestet (z.B. 2011 RU, 2012 BE, NL, 2014 IL, 2017 PT), ab 2013 akkreditiert.
- Wird für das Bienen-*Erwinia*-Monitoring (Dafne 100404) verwendet
- Im EPPO PM 7/20 (2) und Standard Methode in Spanien, Portugal, Russland, Kanada



Hohe Nachweisempfindlichkeit lässt detailliertere Diagnose zu

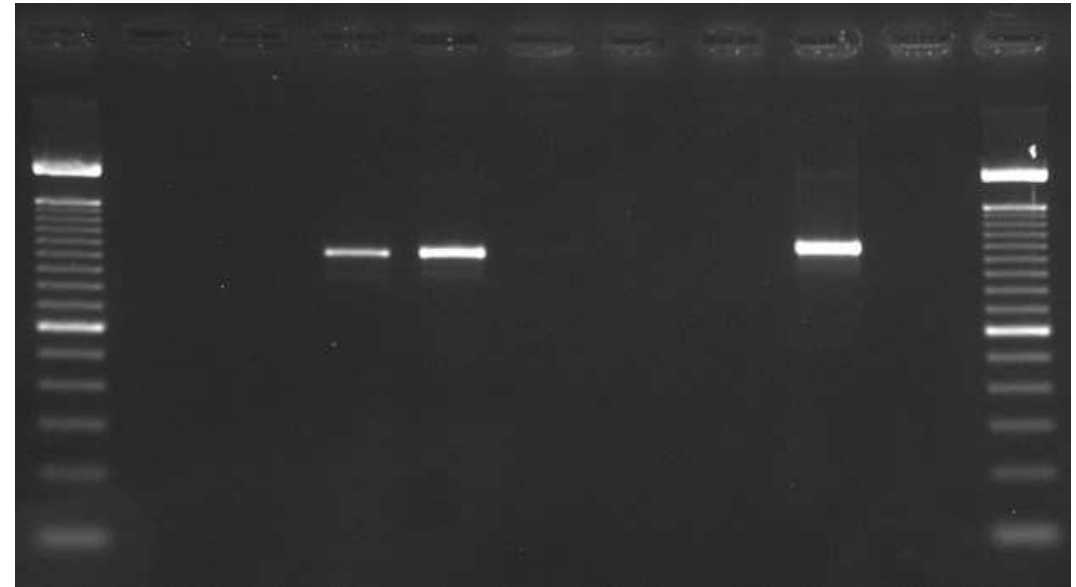
Gesamtdiagnose kostenneutral verbessert!

Kosten-Nutzen Analyse

Höhere Kosten für Chemikalien und Gerät wird durch Arbeitszeiterparnis kompensiert

Konventionelle PCR vs qPCR:

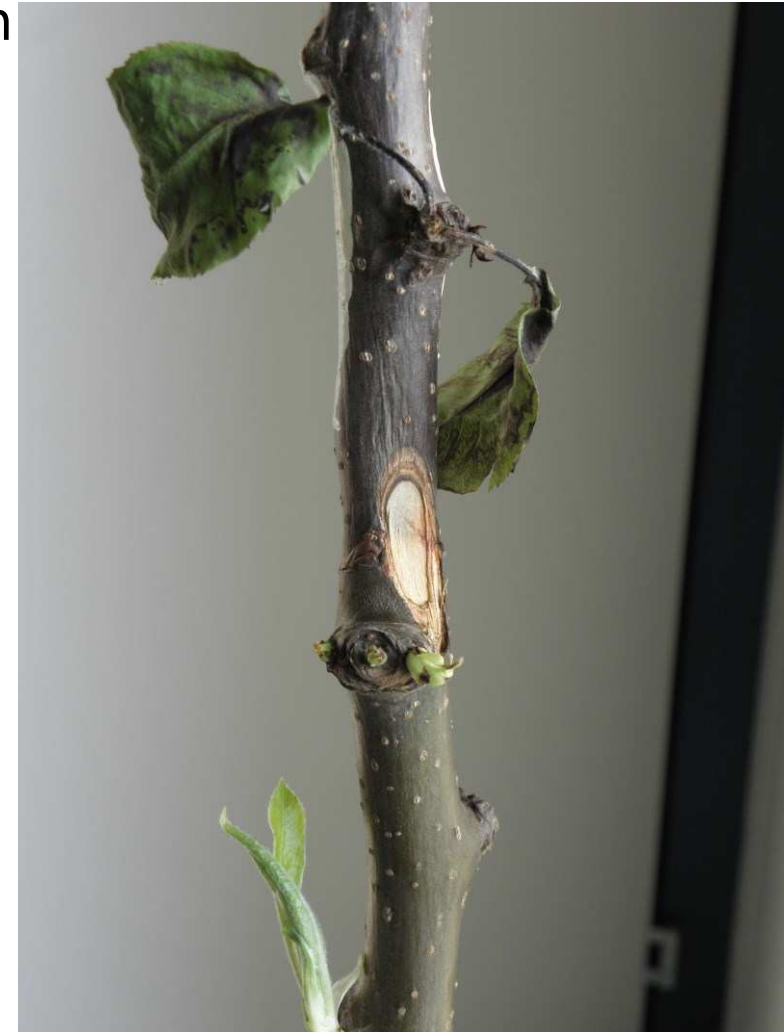
- Vorbereitung gleich, qPCR Sonde zusätzlich
- Lauf circa gleich, qPCR Gerät aufwendiger
- Nach dem Lauf bei qPCR > Ergebnis (in Echtzeit)
- Bei konventioneller PCR > Elektrophorese + Visualisierung (+ 1,25 h, davon circa 15 min Arbeitszeit) > Ergebnis



Detallierte Vorgangsweise für *Ea* Diagnose I

Kombination von klassischer und moderner Methoden

- Es wird aus den Übergangsbereichen von symptomatischen zu asymptomatischen beprobt.
- Bakterien werden aus homogenisiertem Material geschwemmt
- Auf Agarplatte (Kings B) ausplattiert, 48 h inkubiert
- Im Vergleich zu Referenzstamm ausgewertet

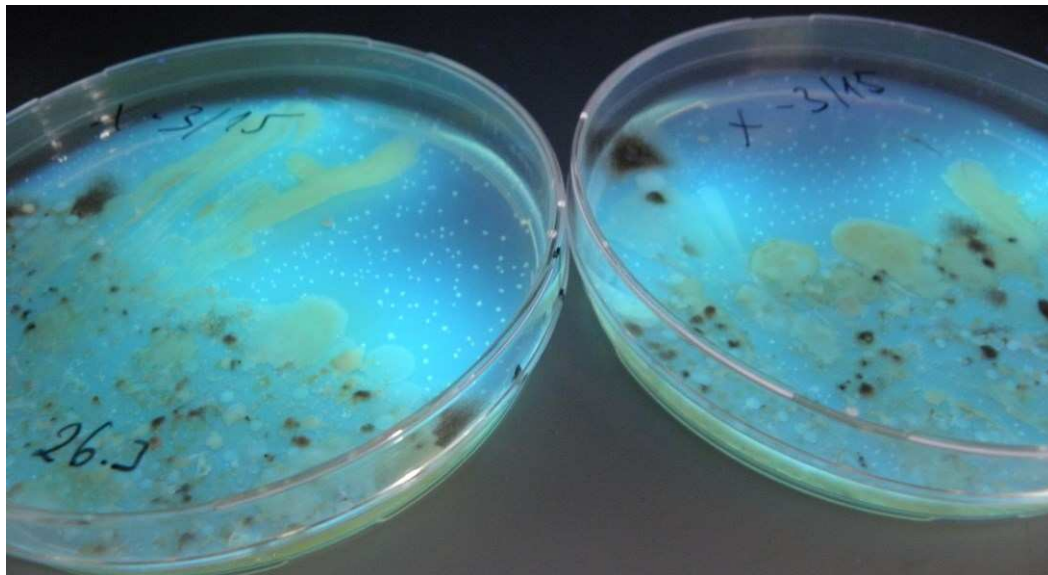


Detallierte Vorgangsweise für *Ea* Diagnose II

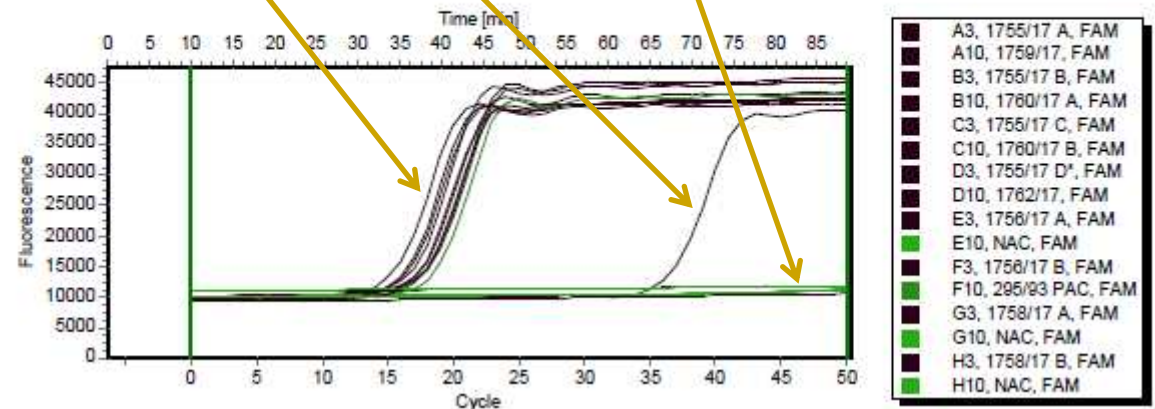
Kombination von klassischer und moderner Methoden



- Auswertung der Fluoreszenz bei 366 nm (*Ea* fluoresziert nicht)
- Verdächtige Kolonien werden in Suspension aufgekocht > thermische Zytolyse
- Mit real time qPCR identifiziert
- Differenzierte *Ea* Auswertung möglich: nachgewiesen; nicht nachgewiesen; detektiert, Lebenderregernachweis konnte nicht geführt werden



Fluorescence Profile



Interpretation der detaillierteren Diagnose

Ea detektiert, Lebenderregernachweis konnte nicht geführt werden

- Beim Ausplattieren de Probenextraktes wurden abgestorbene *Ea* Zellen auf die Agarplatte verbracht.
 - Beim Abimpfen der Kolonien werden auch die abgestorbenen *Ea* Zellen aufgenommen und mittels qPCR identifiziert
 - Durch die sehr hohe Nachweis-Sensitivität und der relativen Quantifizierung finden sich diese Zellen als spätes Signal in der qPCR (es fand keine Anreicherung von *Ea* auf der Agarplatte statt)
 - z.B. Altbefall von Feuerbrand aus dem Vorjahr, Bakterien im Winter (größtenteils) abgestorben...
- Verbesserte Feuerbranddiagnose mittels qPCR: Kombination von klassischer und moderner Methoden ermöglicht detailliertere Diagnose



Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
www.ages.at