

User-friendly Blue ^{Ea}LAMP diagnostic kit for on-site detection of *E. amylovora*

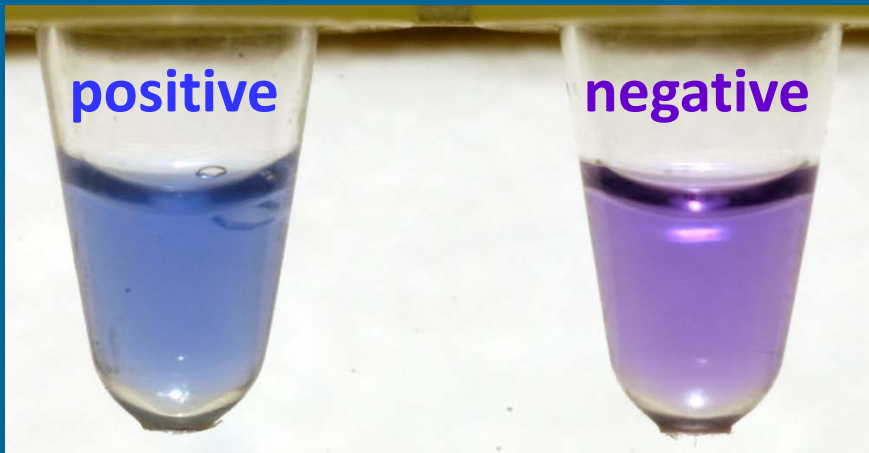
(adapted version for <http://www.phytfire.org>)

PHYTFIRE – WP 4 (Vector Monitoring)
WP team: Vienna University of Technology

Christian Gosch, Heidi Halbwirth, Karl Stich

Blue^{Ea}LAMP

Blue^{Ea}LAMP - a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. Gosch et al. (2012), *Eur. J. Plant. Pathol.* 134:835-845. Austrian patent granted (AT 510418)



- Loop-mediated isothermal amplification of DNA
- Detection limit: approx. approx. 20-25 bacteria/25 µl reaction volume
- 45 min. reaction time

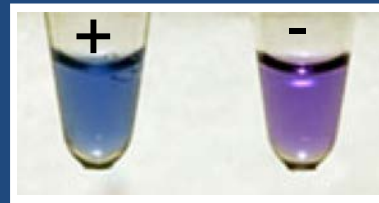
Monitoring

E. amylovora in
the orchard

Vectors (e.g. honey bees)

Integration into
prognosis models

Detection via
Blue^{Ea}LAMP



Bee monitoring:
Beehive mounted collecting
device (tube collectors)



1.

2.

1. Sample collection (tube collectors)
2. Sample analysis (Blue^{Ea}LAMP)

Goal

Practicable combination of the

(1) Bee monitoring and

(2) Blue ^{Ea}LAMP method

as fast and reliable on-site detection kit for *E. amylovora*.

Blue ^{Ea}LAMP – Equipment

1. Blue ^{Ea}LAMP test tubes (-20°C) incl. positive and negative controls



2. Sample: Bee monitoring or flower sampling



4. Pipette for sample transfer



5. Heating device (63 °C)



Step-by-Step Protocols

Probenahme von Kernobstblüten für den Nachweis von *E. amylovora* mittels Blue^{Ea}LAMP

(nach Protokoll Nr. 16, AGES)
Stand: 25.3.2014

Blütenstadium:

- geöffnete, nicht zu alte Blüten (Blütenblätter sind noch dran)

Probezeitpunkt:

- Nicht unmittelbar nach Pflanzenschutzmittelbehandlungen beproben! Wenn doch, dann bitte dokumentieren (Datum, Wirkstoff(e), Konzentration)
- Wenn möglich nachmittags beproben. Weil *E. amylovora* wahrscheinlich eher tagsüber (Flugaktivität d. Bienen) auf die aufgeblühten Blüten verteilt wird, und die Chance am Nachmittag etwas nachzuweisen damit höher ist. Die Bakterienvermehrung wird auch eher bei wärmeren Bedingungen tagsüber stattfinden. Falls in der Früh beprobt wird, dann eher jene Blüten sammeln, die vermutlich auch schon am Vortag geöffnet waren und ganz frisch geöffnete Blüten meiden.

Lagerung der bereitgestellten Probenflaschen:

- kühlt, nur nach Bedarf bei Raumtemperatur, allerdings nicht länger als 1 Tag

Blütensammlung:

- Je Probe 100 Einzelblüten (verteilt über Pflanze und Baum) mit Einmalhandschuhen in die bereitgestellte 1 l Plastikflasche geben. (enthält 200 ml CS2-Puffer)
- 5 min kräftig wieder fest schütteln.
- Aliquote ohne Blütenbestandteile für die Blue^{Ea}LAMP bzw. Rückstellproben entnehmen.
- Optional: Wenn möglich die Pflanzenschutzmittel-Applikationen (Datum, Wirkstoff(e), Konzentration) dokumentieren, die in der Zeit zwischen Knospenaustrieb und Probenahme durchgeführt wurden.

Rückfragen:
Christian Gosch, Technische Universität Wien
(+43) 0654 9121759
(+43) 01 58801 166654
christian.gosch@tuwien.ac.at

1000 µl CS₂-Puffer (für 1 Liter halbkonzentrierte Standardkonzentration)
http://www.ages.at/ages/medien/medien/ages_lamp_cs2_puffer
22 g NaCl
2 g KCl
0,1 g KH₂PO₄, 0,05 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,1 g KH₂PO₄
0,1 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
pH 8,0
mit Sterilsteriliser sterilisieren (mit 200 µl Ethanol-Puffer, nur steriltags pH 8,0)
40000000

Sample collection

Blue^{Ea}LAMP

Protokoll zum Nachweis von *E. amylovora*

Stand: 23.1.2014

Von der TU Wien bereitgestellte Komponenten:

- 1 Heizblock inkl. Styropor-Deckel (Isolierung nach oben)
- 2 Pipetten mit Einmalspitzen
- PROBENGEFÄSSE
- POSITIVKONTROLLEN
- Reaktionsgefäßständer
- 1 Pkg. Einmalhandschuhe
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße + Lagerungsbox

Vorbemerkungen:

- Begriffsdefinition:
 - PROBE: Waschwasser von Blüten (vgl. Protokoll v. AGES)
 - PROBENGEFÄSS: Reaktionsgefäße durchnummeriert. Flüssigkeit ist violett gefärbt. In diese Reaktionsgefäße werden dann je 2 µl Probe gegeben.
 - POSITIVKONTROLLE: Reaktionsgefäß inklusive abgetötete *E. amylovora*-Bakterien. Flüssigkeit ist violett gefärbt. Nur wenn sich diese POSITIVKONTROLLE nach der Temperatur-Inkubation blau färbt, ist der Test auswertbar.
- Als Hilfestellung für die Auswertung sind folgende beiden Reaktionsgefäße enthalten:
 - VERGLEICHSPROBE (+) **roter Deckel**. Beispiel für eine positive Reaktion; die Flüssigkeit ist blau gefärbt.
 - VERGLEICHSPROBE (-) **blauer Deckel**. Beispiel für eine negative Reaktion; die Flüssigkeit bleibt violett.

Lagerung der PROBENGEFÄSSE und POSITIVKONTROLLEN gefahren!

- PROBENGEFÄSSE bzw. POSITIVKONTROLLEN nicht stürzenumlegen (Flüssigkeit mit möglicherweise in den Deckel und muss dann wieder runtergeschüttelt werden).
- Bite Probenart für jedes nummerierte PROBENGEFÄSS in einer Liste dokumentieren (z.B. Datum, Standort, Sammelmethode [Einzelblüten, mehrere Blüten]). Besonderheiten, Sonstiges etc.
- Für jeden Testdurchgang werden 1 bis mehrere PROBENGEFÄSSE (je nach Probenanzahl) und 1 POSITIVKONTROLLE verwendet. Nach dem Testdurchgang (Inkubation bei 63 °C) wird kontrolliert, ob sich die POSITIVKONTROLLE blau gefärbt hat – nur dann ist der Test auswertbar.

Blue^{Ea}LAMP

Blue ^{Ea}LAMP – fields samples 2010 - 2011

227 samples

qPCR: 28 positive samples (1 – 4.120.000 cfu/μl)

Blue ^{Ea}LAMP (1 μl/25 μl assay; blinded experiment):

- 24 positive samples

- 3 samples below ^{Ea}LAMP detection limit of approx. 20-25 cfu/rxn

- 1 sample close (167 cfu) to detection limit

- no false-positive samples

Blue^{Ea}LAMP – fields samples 2013

Provincial Chamber of Agriculture of Tyrol (Klemens Böck)

Initial colour shift with some samples occurred when 10 µl sample in 50 µl reaction volume were used. Initial colour shift most likely because of plant protectants which were applied to the orchard and washed from flowers during sampling.



No colour shift occurred, when 2 µl sample in 50 µl reaction volume were used!

Blue^{Ea}LAMP – fields samples 2013

Performed at the Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES)

Sample No.	PCR	Blue EaLAMP	qPCR	Agri Strip	cfu/μl	cfu/μl
704/13	+	+	+	+	24.188	241.880
705/13	+	+	+	+	1.805	18.050
706/13	+	+	+	(+)	1.116	11.160
707/13	+	+	+	+	4.284	42.840
708/13	+	+	+	+	2.719	27.190
722/13	-	-	-	-	0	0
723/13	-	-	-	-	0	0
724/13	-	-	-	-	0	0
725/13	-	-	-	-	0	0
726/13	-	-	-	-	0	0
727/13	-	-	-	-	0	0
748/13	+	+	+	+	6.964	69.640
750/13	+	+	+	(+)	808	8.080
658/13	+	+	+	(+)	1.933	19.330
659/13	+	-	+	+	1.281	12.810
661/13	+	+	+	+	8.378	83.780
642/13	+	(+)	+	+	6.095	60.950
635/13	+	(+)	+	+	9.703	97.030
330/13	((+))	+	+	-	332	3.320
Dilution	1	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10

Blue^{Ea}LAMP – fields samples 2012 - 2013

- 78 samples
- blinded experiment
- 2 µl sample volume were used per 50 µl reaction
- detection limit: approx. 20-25 cfu/µl

RESULTS

- No initial colour shift was observed
- 1 false negative
- 1 false positive (“likely positive”)
- very low bacterial titres

Sample No.	TU No.	year	Blue EaLAMP (TU Vienna)	qPCR (AGES)	
			HNB (colour) and Agarose Gel (+/-)	cfu/µl	
35	1	2012	-	1,28	
60	2	2012	-	1	
67	3	2012	-	1	
91	13	2012	-	1	
278	23	2012	-	1	
314	24	2012	-	1	
538	25	2012	-	1,18	
685	26	2012	-	1,9	
701	27	2012	+	57,3	
722	28	2012	-	4,82	
723	29	2012	+	13,3	
724	30	2012	+	11	
725	31	2012	+	13,4	
726	32	2012	-	1,54	
729	33	2012	(+) maybe positive	1	
732	34	2012	-	1,9	
772	35	2012	+	15,9	
773	36	2012	+	14,4	
780	37	2012	-	12,1	false negative
789	38	2012	+	2,94	
801	39	2012	-	3,8	
B212/13	48	2013	-	1	
B213/13	49	2013	(+) likely positive	15,7	
B214/13	50	2013	-	2,45	
B215/13	51	2013	-	3,07	
B216/13	52	2013	(+) likely positive	-	false positive
B267/13	68	2013	-	2,58	
B268/13	69	2013	-	1,51	
B348/13	73	2013	-	2,17	

Blue^{Ea}LAMP – fields samples 2014

- Provincial Chamber of Agriculture of Tyrol (15 rxn)
 - No Blue^{Ea}LAMP positive samples
 - According to qPCR (Stefan Kunz, Konstanz): Positive samples had bacterial titre < 2 bacteria/μl (Detection limit of Blue^{Ea}LAMP = 20-25 cfu/μl)
- Versuchsstation für Obst- und Weinbau Haidegg (50 rxn)
- Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau, Germany (50 rxn)

No detailed results available to date.

Blue ^{Ea}LAMP – Summary and Outlook

- Handling of the Blue ^{Ea}LAMP Kit in the field seems practicable.
- Stepwise integration into prognosis models envisaged
 1. Parallel evaluation of the method compared to e.g. qPCR
 2. Minor/Major decision-support for spray applications
- DNA extraction buffers (containing e.g. Tween or Triton) could interfere with violet/blue detection system. Evaluate before usage.
- Spray applications could interfere with Blue ^{Ea}LAMP when 10 μ l sample volume in 50 μ l rxn volume is used (flower monitoring).
- No interference with 2 μ l sample in 50 μ l rxn volume (flower monitoring).
- No interference when bee monitoring is used.

Blue ^{Ea}LAMP – Summary and Outlook

- Storage of Blue ^{Ea}LAMP kit at -20°C over pome fruit bloom.
- Semi-quantitative determination of bacterial titer via scaled colour plate difficult and not applicable to date.



Thank you for your attention!

Contact:

Vienna University of Technology
WG Plant Biochemistry (Prof. Karl Stich)
WG Phytochemistry (PD Dr. Heidi Halbwirth)
Getreidemarkt 9-166/5, 1060 Vienna, Austria
www.vt.tuwien.ac.at
kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at