

Product Information: AgriStrip

***Spongospora subterranea* (Sss)**

Sss AgriStrip - a rapid assay for the detection of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss), and diagnosis of powdery scab on potato tuber

Intended use

The rapid assay Sss AgriStrip for *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* detection is produced by BIOREBA and has been validated in cooperation with the Swiss Federal Institute of Technology (SFIT/ETH), and the Swiss College of Agriculture (SHL). This project was supported by the Innovation Promotion Agency (CTI) of the Swiss government.

The rapid assay enables confirmation of the presence of the powdery scab pathogen in suspicious samples; in particular to distinguish powdery scab from very similar symptoms of common scab caused by *Streptomyces* sp. (Fig. 2). Hence, it is a valuable tool for the disease assessment in seed certification as part of a sustainable disease management of powdery scab.

In this context, the Sss AgriStrip plays an important part in the implementation of the postulated preventive control concept: „Clean seed in clean soil“ described in Merz U. and R.E. Falloon, 2009. Review: Powdery scab of potato - Increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Research* 52 (1), 17-37.

Test principle

The rapid assay Sss AgriStrip is a lateral-flow immunochromatographic test based on an antigen-antibody reaction that is initiated by inserting the strip into the sample extract. The sample liquid migrates upwards and red colored lines will become visible within a few minutes.

Both test and control lines become visible with positive extracts (containing Sss), whereas negative samples produce only the upper control line (Fig. 1). Intense coloration is reached within 10-15 min and the result can be registered.

Dried test strips can be kept as permanent records.

Specificity and sensitivity

The monoclonal antibodies used in this test were made against resting spores of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss) from potato tubers. All

isolates of Sss of several origins (France, Germany, Israel, Japan, New Zealand, Peru, USA, Scotland, and Switzerland) tested so far were detected. The sensitivity of the Sss AgriStrip is very similar to the DAS-ELISA format and allows the reliable detection of the pathogen in smallest scab lesions.

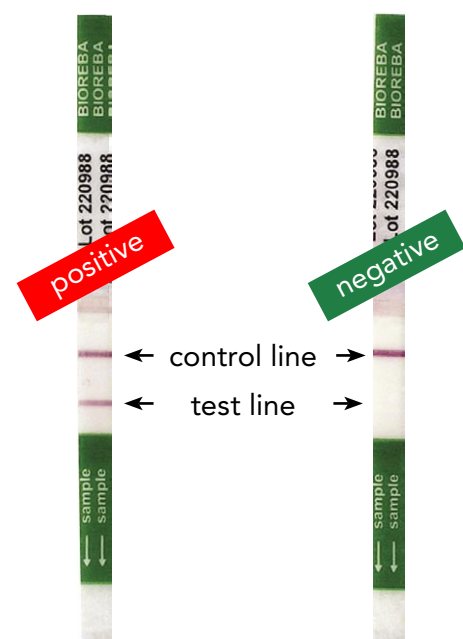
Cross-reaction has been observed with resting spores of the related *Spongospora subterranea* f. sp. *nasturtii* which infects watercress but none with other related fungi such as *Plasmodiophora brassicae*. No cross-reaction was observed with *Streptomyces* sp. (the causal agent of common scab). Hence this assay is also suitable for distinguishing lesions on potatoes caused by Sss from those caused by *Streptomyces* sp., *Rhizoctonia solani* and other fungi.

The reactivity is limited to resting spores on potato tuber or in melanized „old“ root galls. Other stages of Sss such as zoospores and zoosporangia in roots do not and developing resting spores in „young“ root galls may not react.

In contrast to the DAS-ELISA format, resting spores can not be tested in soil samples with this AgriStrip due to nonspecific interaction of soil particles with the lateral flow test.

Please read the notes on page 3 before starting the assay.

Fig. 1 Test strip



Test procedure

Sampling and extraction

Wash the tubers and cut with a sharp and disinfected knife small pieces (1-2 cm², weight approx. 0.2 g) of tuber peel (Fig. 3a) containing scab symptoms (Fig. 2a + 2b).

Place this sample in an extraction bag and add 4 ml of extraction buffer A with a disposable pipette*.

Homogenize the tissue thoroughly with the hand-held homogenizer on a flat surface (Fig. 3b).

Transfer 4 drops (approx. 150 µl) of this extract into a disposable cuvette with a disposable pipette* (Fig. 3c).

Test

Place a strip with the end marked «sample» into the extract (Fig. 3d). Observe the coloration of the lines that is completed after 15 min and can then be evaluated. Avoid any wetting of the strip above the sample mark with plant extract.

To prevent any confusion, label extraction bags, cuvettes and strips with a permanent marker.

Analysis of results

- 1) Both, a clearly visible test and control line are obtained with extracts containing high number of sporeballs as shown in Fig. 1. This means the test is **positive**.
 - 2) A test line which appears weaker than the control line is obtained with extracts containing less sporeballs. This means the test is **positive**.
 - 3) The test is **negative**, if the control line but no test line appears after 15 min. This means that no Sss sporeballs are in the extract or in a number below the detection limit.
 - 4) If neither test nor control line become visible, the test is **invalid** and should be repeated with a fresh strip.
 - 5) Rarely, a faint test line might become visible after 20 – 30 min. Repeat the test in this case with a new extract or send the sample to a laboratory for verification with another method.
- Dried test strips can be kept as permanent records, even though the coloration of bands is stronger when the strips are still wet.



Fig. 2a. Symptoms of common scab

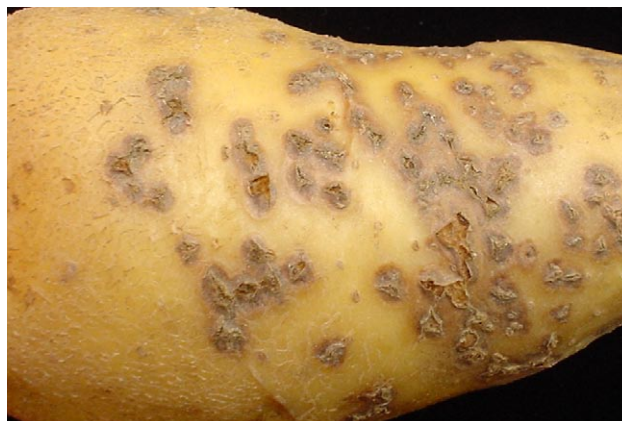
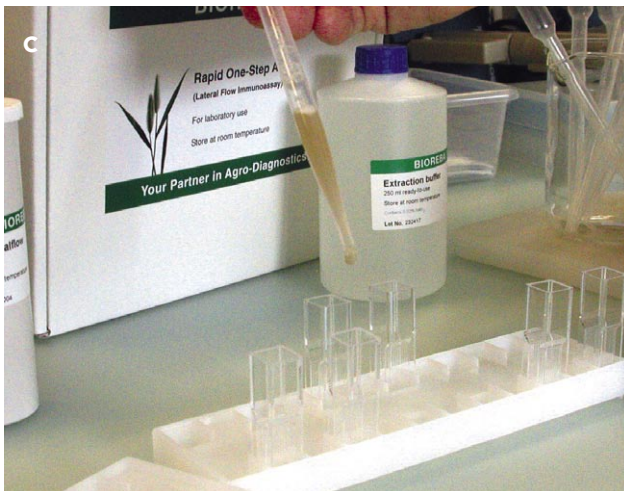


Fig. 2b. Symptoms of powdery scab

* Use of the disposable pipettes

Do not accidentally contaminate the extraction buffer. Please make sure that the disposable pipettes are immediately disinfected and disposed of, after having been in contact with samples. Use always a **fresh pipette** from the pouch for dosing extraction buffer.

Fig. 3. AgriStrip Test procedure



Notes

- 1) Store the strips and the extraction buffer at 4°C. However, limited exposure to ambient temperature (10–30°C), such as during transport and use in the field, does not affect the quality. Keep the packaging of the strips (containing desiccant bags) always hermetically closed. Absorbed moisture can lead to poor results or even complete failure of the test.
- 2) Strips must be used before the expiration date indicated on the label of the packaging.
- 3) Use the Sss AgriStrip always with the Extraction buffer A supplied with the strips. Other buffers might fail.
- 4) It is recommended to run the test at 15–25°C. At temperatures below 15°C, the speed of color development of test and control lines slows down.
- 5) The extraction buffer contains sodium azide as preservative. Keep out of reach of children and do not ingest.

Hygiene measures

To avoid spread of the pathogen, all disposables (extraction bags, pipettes, and cuvettes) must be properly disinfected. This can be done by submerging for at least 60 min in a freshly prepared 0.1 % bleach solution (sodium hypochlorite). After that, this material can be disposed of together with the tuber residues of the samples according to local regulations. Please contact local phytosanitary authorities for specific recommendations.

Sss AgriStrip



Fig. 4. Sss AgriStrip Complete kit
(Art. No. 153081)

Content of the Complete kit

- 25 strips packed with desiccant bags
- 100 ml AgriStrip Extraction buffer A
- 25 disposable pipettes
- 25 extraction bags
- 25 disposable cuvettes
- 1 cuvette rack
- Note: the homogenizer hand model is optional and not included in the Complete kit.

Ordering Information

Product	Art. No.	Assays
Sss AgriStrip Complete kit	111181	25
Sss AgriStrip Single strips*	111182	25
Sss AgriStrip Single strips*	111183	100
* incl. AgriStrip Extraction buffer A, ready-to-use		

Optional Products	Art. No.	Size
Cuvette rack, holds 12 cuvettes	2166	1
Cuvettes, disposable	2534	100
Pipettes, disposable	2292	500
Extraction bags «Universal»	430100a	100
Homogenizer hand model	400010	1

Disclaimer

This BIOREBA product is guaranteed to meet the specifications mentioned in this product information. No further warranties are given. Should this product fail for reasons other than inappropriate handling or misuse, BIOREBA AG will replace the product free of charge or refund the purchase price.

BIOREBA AG shall not be liable for any direct or indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

Produktinformation: AgriStrip

Spongospora subterranea (Sss)

Sss AgriStrip - der Schnelltest für den Nachweis von *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss), dem Erreger des Pulverschorfs der Kartoffel

Verwendung

Der Schnelltest Sss AgriStrip für den Nachweis von *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* wird von BIOREBA AG hergestellt und wurde in Zusammenarbeit mit der Eidgenössisch Technischen Hochschule (ETH) und der Schweizerischen Hochschule für Landwirtschaft (SHL) validiert. Dieses Projekt wurde von der Förderagentur für Innovation (KTI) unterstützt.

Der Schnelltest ermöglicht die Bestätigung des Pulverschorferregers in verdächtigen Proben; insbesondere in Fällen wo die Symptome des Pulverschorfs kaum von denjenigen des durch *Streptomyces* sp. verursachten gewöhnlichen Schorfs zu unterscheiden sind (Fig. 2a/2b). Der Test ist deshalb von grossem Wert für eine sichere Beurteilung des Vorkommens der Krankheit bei der Saatgut-Zertifizierung. Diese ist ein wichtiger Bestandteil des postulierten Konzeptes einer nachhaltigen, präventiven Bekämpfungsstrategie des Pulverschorfs: **„Gesundes Saatgut in gesunden Boden“**, beschrieben in Merz U. and R.E. Falloon, 2009. Review: Powdery scab of potato - Increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. Potato Research 52 (1), 17-37.

Testprinzip

Der Sss AgriStrip ist ein immunochromatographischer „lateral-flow“ Test, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, welche beim Eintauchen des Streifens in den Probenextrakt in Gang gesetzt wird. Dabei wandert die Flüssigkeit nach oben und innerhalb weniger Minuten werden rotgefärbte Linien sichtbar.

Bei positiven Extrakten (welche Sss enthalten) werden sowohl Test- wie auch Kontrolllinie sichtbar, während sich bei negativen Extrakten nur die Kontrolllinie entwickelt (Fig. 1). Nach 10-15 Min. wird die maximale Farbintensität erreicht und der Test kann ausgewertet werden. Getrocknete Teststreifen können archiviert werden.

Eigenschaften und Empfindlichkeit

Die für den Sss AgriStrip verwendeten monoklonalen Antikörper wurden gegen Dauersporen

von *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss) hergestellt. Alle bisher getesteten Sss-Isolate verschiedenster Herkunft (Deutschland, Frankreich, Israel, Japan, Neuseeland, Peru, Schottland, Schweiz, USA) wurden erkannt.

Kreuzreaktionen traten mit Dauersporen des auf Kresse vorkommenden *Spongospora subterranea* f. sp. *nasturtii* (Ssn) auf, nicht aber mit anderen verwandten Arten wie *Plasmodiophora brassicae*.

Absolut keine Kreuzreaktion wurde mit *Rhizoctonia solani* und *Streptomyces* sp. festgestellt, welche dem Pulverschorf sehr ähnlich aussehende Symptome an der Kartoffelknolle verursachen (Fig. 2a/2b).

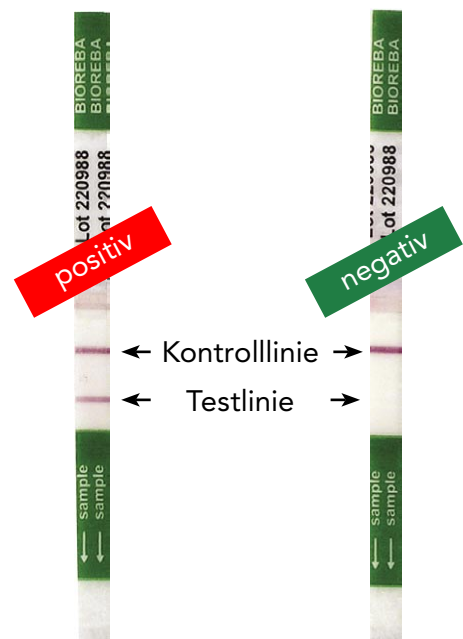
Die Spezifität ist limitiert auf Dauersporen auf Kartoffelschale oder in melanisierten, „alten“ Wurzelgallen. Andere Stadien von Sss, wie Zoosporen und Zoosporangien in Wurzeln werden nicht erkannt. Ebenfalls nicht erkannt werden sich entwickelnde Dauersporen in „jungen“ Wurzelgallen.

Die Empfindlichkeit entspricht annähernd derjenigen des DAS-ELISA-Formates und ermöglicht die sichere Identifikation des Pathogens auch in kleinsten Schorfflecken.

Im Gegensatz zum DAS-ELISA-Format können Bodenproben mit diesem AgriStrip jedoch wegen unspezifischen Interaktionen mit Bodenpartikeln nicht untersucht werden.

Vor der Testdurchführung beachten Sie bitte die Bemerkungen auf Seite 3.

Fig. 1 Teststreifen



Testdurchführung

Probennahme und Extraktion

Die Knollen waschen und mit einem scharfen, desinfizierten Messer ein kleines Stück Kartoffelschale (1-2 cm², Gewicht: ca. 0.2 g) möglichst dünn abschneiden (Fig. 3a). Dieses Stück soll verdächtige Symptome aufweisen (Fig. 2a/2b).

Das abgeschnittene Schalenstückchen in einen Extraktionsbeutel legen und mit einer Einwegpipette* 4 ml Extraktionspuffer A dazugeben.

Die Probe auf einer flachen Unterlage mit dem Handhomogenisator gründlich homogenisieren (Fig. 3b).

Mit einer Einwegpipette* 4 Tropfen (ca. 150 µl) von diesem Extrakt in eine Plastikkuvette geben (Fig. 3c).

Test

Entnehmen Sie der Verpackung einen Teststreifen und stellen Sie diesen mit dem mit «sample» markierten Ende in den Extrakt (Abb. 3d). Beobachten Sie die Farbentwicklung der Linien, welche nach 15 min das Maximum erreicht hat und ausgewertet werden kann. Der Teststreifen darf oberhalb der «sample»-Markierung nicht in Kontakt mit dem Extrakt kommen.

Um Verwechslungen vorzubeugen, beschriften Sie mit einem wasserfesten Filzstift die Extraktionsbeutel, Küvetten und Teststreifen mit einem Probencode.

Auswertung

- 1) Der Test ist **positiv**, wenn sowohl Test- wie auch Kontrolllinie stark eingefärbt werden (vgl. Abb. 1), d.h. wenn die Proben eine grosse Anzahl Sporenballen enthalten.
- 2) Der Test ist **positiv**, wenn die Testlinie schwächer eingefärbt wird als die Kontrolllinie. Dies ist typisch für Proben mit geringer Sporenbalkenkonzentration.
- 3) Der Test ist **negativ**, wenn nur die Kontrolllinie sichtbar wird. Dann sind Sporenballen in der Probe gar nicht oder in nicht nachweisbarer Menge vorhanden.
- 4) Der Test ist **ungültig**, wenn weder Test- noch Kontrolllinie sichtbar werden. Der Test sollte mit einem frischen Teststreifen wiederholt werden.



Fig. 2a. Symptome gewöhnlicher Schorf

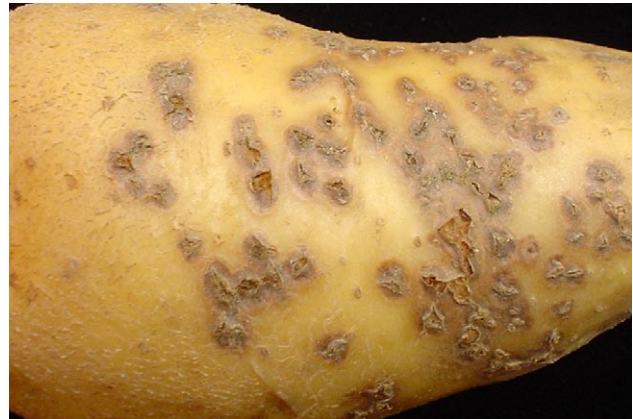


Fig. 2b. Symptome Pulverschorf

5) In seltenen Fällen wird eine schwache Testlinie erst nach 30 min Entwicklungszeit sichtbar. Wiederholen Sie dann den Test mit einer neuen Probe, oder senden Sie die Probe an ein Labor zur genaueren Überprüfung mit anderen Methoden.

Die Streifen können nach dem Test in getrocknetem Zustand zur Dokumentation aufbewahrt werden.

* Gebrauch der Einwegpipetten

Bitten achten Sie darauf, dass mit positiven Proben kontaminierte Einwegpipetten unverzüglich desinfiziert und entsorgt werden und nicht den Extraktionspuffer aus Versehen kontaminieren können. Nehmen Sie immer eine **frische Pipette** aus dem mitgelieferten Beutel für die Dosierung des Extraktionspuffers..

Fig. 3. Testdurchführung



Bemerkungen

- 1) Die Teststreifen und den Puffer bei 4°C lagern. Für den Transport und während des Gebrauchs im Feld, können die Teststreifen und der Puffer jedoch ohne Qualitätsverlust einer Umgebungstemperatur von 10 - 30°C ausgesetzt werden. Die Teststreifen immer gut verschlossen im Originalbehälter mit dem Trockenmittel aufbewahren. Absorption von Feuchtigkeit kann die Qualität der Ergebnisse mindern bis hin zur völligen Unbrauchbarkeit der Tests.
- 2) Verwendung bis Ende des Haltbarkeitsdatums auf der Verpackung.
- 3) Achtung! Diesen AgriStrip-Test unbedingt mit dem mitgelieferten Extraktionspuffer A verwenden!
- 4) Es wird empfohlen, den Test bei einer Temperatur von 15 – 25°C durchzuführen. Bei Temperaturen unter 15°C verzögert sich die Geschwindigkeit der Farbentwicklung der Linien und der Test kann erst nach 20 - 40 min ausgewertet werden.

- 5) Der Extraktionspuffer enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Ausser Reichweite von Kindern aufbewahren und nicht einnehmen.

Hygienemassnahmen

Um eine Verschleppung des Erregers auszuschliessen, müssen alle verwendeten und kontaminierten Verbrauchsmaterialien (Extraktionsbeutel, Pipetten und Küvetten) in einer frisch zubereiteten 0.1 %-igen Javelwasserlösung (Natriumhypochlorit) während mind. 60 min eingetaucht werden. Anschliessend können sie zusammen mit den Knollenabfällen der Kehrlichtverbrennung zugeführt werden.

Sss AgriStrip



Abb. Sss AgriStrip Complete kit
(Art. No. 111181)

Inhalt des Complete kit

- 25 Teststreifen in Röhrchen mit Trockenmittel
- 100 ml gebrauchsfertiger AgriStrip-Extraktionspuffer A
- 25 Einwegpipetten
- 25 Extraktionsbeutel «Universal»
- 25 Einwegküvetten
- 1 Küvettenhalter
- NB: der Handhomogenisator ist nicht im Complete kit enthalten.

Bestellinformationen

Produkt	Art. Nr.	Anzahl Tests
Sss AgriStrip Complete kit	111181	25
Sss AgriStrip Teststreifen*	111182	25
Sss AgriStrip Teststreifen*	111183	100

* inkl. gebrauchsfertiger AgriStrip Extraction buffer A

Weitere Produkte	Art. Nr.	Einheit
Küvettenhalter für 12 Küvetten	2166	1
Einwegküvetten	2534	100
Einwegpipetten	2292	500
Extraktionsbeutel «Universal»	430100a	100
Handhomogenisator	400010	1

Haftungsausschluss

BIOREBA AG garantiert das gute Funktionieren der Tests gemäss den Spezifikationen bei korrekter Anwendung. Ersatzansprüche sind auf den Ersatz des Produktes beschränkt. Für allfällige

Schäden, welche mit der Anwendung dieses Tests direkt oder indirekt in Zusammenhang stehen, lehnt BIOREBA AG jedoch jede Haftung ab.

Information produit: AgriStrip

Spongospora subterranea (Sss)

AgriStrip - test rapide *in situ* pour la détection de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* (Sss), l'agent de la gale poudreuse de la pomme de terre.

Principe du test

Le test rapide AgriStrip, développé et produit par BIOREBA, est basé sur une réaction immunologique après migration de l'échantillon sur une membrane, sur laquelle ont été prédisposés des anticorps spécifiques permettant la détection de l'agent pathogène.

Lorsque la bandelette est mise en contact avec l'extrait végétal, celui-ci migre vers le haut en dissolvant un complexe d'anticorps et de particules d'or. Si l'antigène recherché est présent (agent pathogène que l'on cherche à détecter), il va se lier à l'anticorps spécifique lors de la migration, puis s'accrocher à un deuxième anticorps fixé un peu plus haut sur la membrane (ligne test). Le surplus des particules d'or libres vont continuer à migrer et se fixer un peu plus haut sur la ligne appelée „ligne control”. Ainsi les deux lignes „control” et „test” seront colorées dans le cas d'un échantillon positif, alors que seule la ligne „control” sera visible dans le cas d'un échantillon négatif (ne contenant pas l'agent pathogène recherché); fig. 1.

Les lignes se colorent au bout d'1 à 2 minutes et ont une intensité maximale au bout de 10 à 15 minutes. Une fois séchées la coloration n'évoluent plus et les membranes peuvent être conservées.

Spécificité et sensibilité

Les anticorps utilisés sont des monoclonaux fabriqués à partir de souches de Sss sur tubercules de pomme de terre. Tous les isolats connus de Sss provenant de nombreux pays (France, Allemagne, Ecosse, Pérou, USA, Israël, Japon, Nelle Zélande et Suisse) ont été détectés positivement par AgriStrip.

Le test fonctionne lorsque les spores de Sss sont en phases de latence. Les autres états du champignon, zoospore et zoosporange, ne sont pas détectables.

Aucunes réactions croisées n'a été observées avec des champignons associés comme *Plasmodiophora brassicae* ou *Streptomyces* sp. (l'agent de la gale commune). Ainsi ce test rapide utilisable „au champ” permet de distinguer les lésions causées par Sss de celles causées par d'autres agents pathogènes comme *Streptomyces* sp. et *Rhizoctonia solani*.

Des réactions croisées ont été observées avec des spores de *Spongospora subterranea* f. sp. *nasturtii* qui infecte le cresson.

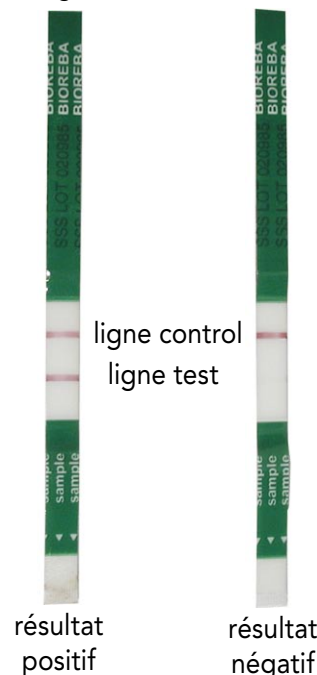
Sss AgriStrip permet de confirmer la présence de spores de Sss sur des tubercules présentant des symptômes de lésions.

Mode opératoire

Prendre le nombre de bandelettes correspondant au nombre d'échantillons à tester. Bien refermer le tube contenant les autres bandelettes.

- 1) Couper une partie du tubercule au niveau des symptômes (environ 0.2 g).
- 2) Déposer l'échantillon dans le sachet de broyage et ajouter 4ml de tampon d'extraction avec la pipette, puis broyer l'échantillon sur une surface plane avec le broyeur à billes (livré séparément).
- 3) Déposer 4 gouttes (approx. 120µl) de l'extrait broyé dans une des cuvettes fournies, et tremper l'extrémité d'une bandelette échantillon („sample”).
- 4) Attendre 1-2 minutes pour voir l'apparition de bandes violacées (intensité max au bout de 10-15 min).

Fig. 1: bandelettes



Interprétation des résultats

- 1) Si les lignes "test" et "control" présentent des colorations nettes et identiques au bout de 2 minutes (cf. fig. 1), l'échantillon contient un nombre important de spores.
- 2) Si l'intensité de la coloration de la ligne "test" est plus faible que celle de la ligne "control", cela signifie que l'échantillon contient un faible nombre de spores. La vitesse de coloration de la ligne "test" est corrélée à la concentration en spores dans l'échantillon.
- 3) Si seule la ligne "control" est colorée, cela signifie que l'échantillon analysé ne contient pas de spores. Même si la ligne "test" se colore très faiblement au bout de 10 - 12 minutes, l'échantillon doit être considéré comme négatif (réactions aspécifiques).
- 4) Si la ligne "control" n'est pas colorée, le test n'est pas valide et doit être recommencé avec une bandelette récente.

Note:

- 1) Les bandelettes et le tampon d'extraction se conservent au frais (4 - 6°C). Cependant, lors du transport ou de l'usage au champ, l'exposition des bandelettes et du tampon à température ambiante (10 - 30°C) n'affecte pas leur qualité. Bien refermer hermétiquement le flacon en s'assurant de la présence du sachet absorbeur d'humidité. Un excès d'humidité peut nuire à la qualité du résultat.
- 2) La date limite d'utilisation est mentionnée sur le flacon.
- 3) Ce test AgriStrip doit être utilisé avec le tampon d'extraction A fourni dans le kit.

Fig. 2: Kit complet AgriStrip (Art. No. 111181)



Composition du kit complet:

- 25 bandelettes dans un flacon hermétique.
- 100ml de tampon d'extraction A prêt à l'emploi
- 25 pipettes jetables
- 25 sachets de broyage
- 25 cuvettes et portoir

NB: le broyeur manuel (Art No: 400010) n'est pas inclus dans le kit.

Référence de commande

Produits	no. art.	tests
Sss AgriStrip kit complet	111181	25
Sss AgriStrip bandelettes seules*	111182	25
Sss AgriStrip bandelettes seules*	111183	100

* inclus: AgriStrip tampon d'extraction A, prêt à l'emploi

Produits additionnels	no. art.	unités
cuvettes jetables	2534	100
portoir pour 12 cuvettes	2166	1
pipettes jetables	2292	500
sachets de broyage	430100a	100
broyeur manuel	400010	1