



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **427988**

(22) Data zgłoszenia: **30.11.2018**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/689 (2018.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(54) **Zestaw do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter sepedonicus*,
starter, immunosorbent bakterii, sposób identyfikacji *Clavibacter sepedonicus*,
zastosowanie starterów, zastosowanie immobilizowanych przeciwciał IgG anty-Cms**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

01.06.2020 BUP 12/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI
ROŚLIN – PAŃSTWOWY INSTYTUT
BADAWCZY, Radzików, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI, Bonin, PL
AGNIESZKA PRZEWODOWSKA, Bonin, PL
MARTA JANKOWSKA, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Aleksandra
Twardowska-Czerwińska**

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są zestaw do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter sepedonicus*, starter, immunosorbent bakterii, sposób identyfikacji *Clavibacter sepedonicus*, zastosowanie starterów, zastosowanie immobilizowanych przeciwciał IgG anty-Cms, do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Bardziej szczegółowo rozwiązanie dotyczy opracowania testu diagnostycznego do wykrywania sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, kwarantannowej bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms).

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka, wywoływana przez *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) jest jednym z najważniejszych patogenów ziemniaka. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* to Gram-dodatnie bakterie stanowiące formy pałeczkowate oraz kuliste (OEPP/EPPO, 2006), które wspólnie z rodzajem *Rathayibacter* tworzą grupę fitopatogenicznych corynebakterii o wspólnym pochodzeniu filogenetycznym (Lee i in. 1997). Kolonie większości szczepów hodowanych na pożywkach agarowych są mukoidalne, jakkolwiek zdarzają się również szczepy pośrednie i niemukoidalne (Bishop i in. 1988, Baer i Gudmestad 1993).

Jednym z najbardziej skutecznych sposobów ograniczenia, czy też eliminacji bakterii Cms jest ich wczesne wykrycie. Detekcja potrzebna jest zarówno w procesie produkcji, obróbki, jak i dystrybucji materiału roślinnego. Stąd właściwe metody detekcji powinny być odpowiednio czułe i specyficzne, jak również proste, szybkie, wiarygodne i powtarzalne (Waleron i in. 2003).

Zgodnie z przyjętymi wymogami fitosanitarnymi, prawidłowa diagnostyka sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wymaga stosowania przynajmniej dwóch testów laboratoryjnych opartych na różnych zasadach biologicznych łącznie z testem patogeniczności (OEPP/EPPO, 2006). W zależności od ekspresji objawów bakteriozy pierścieniowej ziemniaka stosuje się odpowiednie schematy postępowania zawierające testy fizjologiczne, biochemiczne, serologiczne, molekularne i inne (Dyrektywa Komisji WE 2006/56).

Testy fizjologiczne i biochemiczne stosowane do rutynowej kontroli, pozwalają określić właściwości fenotypowe Cms. Zgodnie z Dyrektywą Komisji WE, testy te powinny być przeprowadzane przy użyciu izolatów bakterii uzyskanych w procesie pasażowania na agarze odżywczym z glukozą. Natomiast porównania morfologiczne powinny być przeprowadzane na kulturach uzyskanych po wzroście na agarze odżywczym z glukozą w obecności znanej kontroli Cms (Dyrektywa Komisji WE 2006/56).

W przypadku roślin wykazujących wyraźne symptomy choroby stosuje się izolację bakterii na pożywkach półselektywnych NCP-88 (De la Cruz i in. 1992) oraz MTNA (Jansing i Rudolph 1998), natomiast do rutynowych hodowli czystych kultur bakterii Cms wykorzystuje się ogólne podłoża wzrostowe, jak agar odżywczy (NA), agar odżywczy z glukozą (NDA), agar drożdżowo-peptonowo-glukozowy (YPGA) oraz pożywkę mineralną z glukozą i wyciągiem drożdżowym (YGM) (De Boer i Copeman 1980, Dyrektywa Komisji WE 2006/56). Jednym z głównych problemów związanych z detekcją i identyfikacją bakterii Cms jest wolne tempo wzrostu tego patogenu. Przy bezpośrednim posiewie ekstraktów na pożywkę uniwersalną, obce bakterie saprofityczne, charakteryzujące się znacznie szybszym tempem wzrostu, porastają całą jej powierzchnię, często uniemożliwiając skuteczną izolację czystych szczepów Cms (OEPP/EPPO, 2006). Izolacja patogenu na pożywkach półselektywnych zawierających w swym składzie antybiotyki takie jak: siarczan polimyksyny B, kwas nalidyksylowy i cykloheksymid (NCP-88) oraz trimetoprim, kwas nalidyksylowy i amfoterycynę B (MTNA), pozwala znacznie zmniejszyć ilość obcych bakterii. Najlepsze efekty izolacji na podłożu półselektywnym można uzyskać po uprzedniej inokulacji roślin oberżyny ekstraktem z komórkami patogenu. Rośliny oberżyny są dobrym środowiskiem dla selektywnego namnażania sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka (OEPP/EPPO 2006).

Test patogeniczności na młodych siewkach oberżyny inokulowanej trzydniową kulturą testowanego izolatu, stosowany jest jako ostateczny test dla potwierdzenia infekcji latentnej oraz oceny wirulencji kultur zidentyfikowanych jako Cms. Test ten cechuje stosunkowo niska czułość (10^6 CFU/ml) oraz duża czasochłonność – ok. 40 dni. Dla skrócenia czasu testu biologicznego jako roślinę indykatorową stosuje się również tytoń. Wadą tego testu jest niestety mniejsza czułość (10^8 – 10^9 CFU/ml) (OEPP/EPPO 2006).

Jako jedną z metod identyfikacji bakterii Cms przez długi czas stosowano barwienie Grama wymazów z wydzieliny wiązek naczyniowych z łodygi i bulwy (Glick i in. 1944, Slack 1987). Jednakże jednoznaczna diagnoza tą metodą jest trudna ze względu na możliwość występowania innych Gram-dodatnich bakterii, jak *Clostridium* ssp. *Bacillus* ssp., a także saprofitycznych bakterii z rodzaju *Corynebacterium* (Crowley i De Boer 1982).

W niektórych pracowniach stosowano również aglutynacyjny test lateksowy pozwalający wykryć 10^7 komórek w 1 ml (Slack i in. 1979). Test odwróconej pasywnej hemoaglutynacji (RPH) z krwinkami owcy opłaszczonymi przeciwciałami anti-Cms z surowicy królika lub żółtka jaja kury, pozwala na wykrywanie w czasie ok. 90 minut obecności Cms w stężeniu 6×10^6 komórek w 1 ml (Kohm i Eggers-Schumacher 1995).

Wykrywanie sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka metodami serologicznymi nadal stwarza znaczne trudności ze względu na zróżnicowanie morfologiczne form bakterii Cms (Mills i Russell 2003). Powszechnie stosowanymi metodami serologicznymi w detekcji Cms są test pośredniej immunofluorescencji – IF (Slack i in. 1979, De Boer i Copeman 1980) oraz test immunoenzymatyczny – ELISA (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Drennan i in. 1993, De Boer i in. 1994, 2005). Jakkolwiek test ELISA niedopuszczony przez EPPO jako test przesiewowy, cieszy się znacznie większym powodzeniem w krajach Ameryki Północnej. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych MAb 9A1 w teście IF zapewnia wysoką specyficzność (De Boer i Wieczorek 1984) i wykrywalność bakterii Cms w granicach 10^4 komórek bakterii w 1 ml ekstraktu z tkanki ziemniaka (Baer i Gudmestad 1993). Często dla zwiększenia czułości metod serologicznych stosuje się również tańsze, ale mniej specyficzne przeciwciała poliklonalne. Niestety wadą takiego rozwiązania są występujące często fałszywie pozytywne wyniki wskutek reakcji krzyżowych z innymi bakteriami (Crowley i De Boer 1982) oraz niewykrywanie niemukoidalnych szczepów bakterii Cms (Baer i Gudmestad 1993). Zasadniczym wykrywanym antygenem nie są komórki bakterii Cms, lecz rozpuszczalne egzopolisacharydy, których ilość w stosunku do liczby komórek może być zmienna (Lewosz 1997). Obie metody IF i ELISA pozwalają wykrywać bakterie Cms w bulwach i łodygach ziemniaka, przy czym metoda immunofluorescencyjna wykazuje większą czułość i specyficzność dla bulw, natomiast metoda ELISA pozwala z większą czułością wykrywać komórki Cms w łodygach ziemniaka (De Boer i in. 1994).

We współczesnej diagnostyce wykorzystuje się tradycyjne, posiadające wiele zalet, dobrze sprawdzone metody detekcji mikroorganizmów. Zwykle są one czasochłonne i wymagają stosowania specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego. Wyklucza to przeprowadzenie testu w warunkach polowych, gdzie wymagany jest niemal natychmiastowy wynik pomiaru, a próbka powinna być zanalizowana najlepiej w miejscu jej pobrania (Łoś i Węgrzyn, 2005). Ponieważ jak dotąd najskuteczniejszym sposobem ograniczającym rozprzestrzenianie się patogenów bakteryjnych jest ich wczesne wykrycie, toteż warunki takie muszą być spełniane w coraz to większej liczbie procedur.

W opisie patentowym PL213855 (opubl. 2009-03-30) ujawniono zestaw do wykrywania albo przeżyciowego izolowania bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce, który charakteryzuje się tym, że zawiera zasadniczo ziarnisty immunosorbent posiadający powierzchnię aktywowaną chemicznie ze złotem koloidalnym i immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec wybranego antygenu bakteryjnego. Ujawniono zastosowanie zestawu do wykrywania albo przeżyciowego izolowania wybranych bakterii.

Znany jest sposób chemicznej polimeryzacji aniliny (Stejskal i in. 1999) oraz sposób jej modyfikacji przy pomocy aldehydu glutarowego (Fernandes i in. 2003) polegające na tym, że tworzenie polimeru aniliny zachodzi poprzez oksydatywną polimeryzację aniliny. W tym celu sporządzano 0,002–2 M roztwór aniliny w 0,01–5 N HCl, do którego dodawano 0,01–2 M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ w stosunku objętościowym 10:1 (obj./obj.) i po dokładnym wymieszaniu pozostawiano na 2–25 minut w temperaturze pokojowej. Następnie наносzono 1–50 μl krople na powierzchnię membran poliwęglanowych i inkubowano 10–120 minut w temperaturze pokojowej. Po godzinie trzykrotnie przepłukiwano 2 $\times$ dest. H_2O , dwukrotnie 0,1 N NaOH, dwukrotnie 0,1 N HCl i pięciokrotnie 2 $\times$ dest. H_2O , następnie suszono ok. 30 minut w temperaturze pokojowej.

W opisie patentowym PL213856 (opubl. 2009-03-30) opisano zestaw inkubacyjny do wykrywania albo przeżyciowego izolowania wybranych bakterii, w szczególności *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, który charakteryzuje się tym, że zawiera płytki posiadające powierzchnię aktywowaną aniliną modyfikowaną aldehydem glutarowym z immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec wybranego antygenu bakteryjnego. Ujawniono zastosowanie zestawu do wykrywania albo przeżyciowego izolowania wybranych bakterii.

W opisie patentowym PL213857 (opubl. 2009-03-30) ujawniono sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* z wykorzystaniem membran poliwęglanowych zawierających immobilizowane przeciwciała. W sposobie według wynalazku analizowaną próbkę zawieszają w roztworze buforowym, uzyskany roztwór kontaktuje się z i odfiltrowuje się na filtrze pokrytym przeciwciałami specyficznymi wobec antygenu powierzchniowego pochodzącego z wykrywanej

bakterii i ustala się obecność bakterii na filtrze, która świadczy o obecności bakterii w analizowanej próbce, przy czym do filtrowania wykorzystuje się aktywowane membrany poliwęglanowe modyfikowane aldehydem glutarowym zawierające immobilizowane przeciwciała.

W opisie patentowym PL213858 (opubl. 2009-03-30) przedstawiono sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, w analizowanej próbce. W rozwiązaniu ujawniono szybki i łatwy do przeprowadzenia test filtracyjny do wykrywania obecności bakterii, pozwalający na uzyskanie widzianego „gołym okiem” trwałego sygnału barwnego świadczącego o obecności bakterii.

W opisie patentowym PL210395 (opubl. 2009-03-30) ujawniono test immunologiczny na obecność bakterii. Opisano zastosowanie powierzchniowego antygenu bakteryjnego otrzymanego z komórek bakterii poprzez przemywanie bakterii roztworem buforowym wybranym spośród roztworu buforowego glicyna-HCl lub roztworu buforowego glicyna-NaOH do uzyskiwania przeciwciał do testów immunologicznych do wykrywania komórek bakterii.

W opisie patentowym EP2205735 (opubl. 2009-03-19) ujawniono test immunologiczny na obecność bakterii wykorzystujący przeciwciała otrzymane określonymi metodami, w szczególności do wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

W zgłoszeniu patentowym CN102382882A (opubl. 2012-03-21) ujawniono zestaw do szybkiego wykrywania metodą LAMP i sposób wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *nebraskensis*. Rozwiązanie dotyczy zestawu do szybkiego wykrywania metodą LAMP oraz sposobu wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *nebraskensis*. Zestaw zawiera wzorcowy roztwór reakcyjny do wstępnego traktowania i roztwór reakcyjny I do izotermicznej amplifikacji. Sposób wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *nebraskensis* obejmuje ekstrakcję DNA bakterii, wzorcowe traktowanie wstępne, wykrywanie LAMP oraz kwasów nukleinowych. Sposób odznacza się prostotą, szybkością, silną swoistością, wysoką czułością oraz niskim kosztem.

W zgłoszeniu patentowym CN102140512A (opubl. 2011-08-03) opisano zestaw do wykrywania metodą LAMP oraz sposób wykrywania patogenicznego *aeromonas hydrophila*. Rozwiązanie dotyczy zestawu do wykrywania metodą LAMP patogenicznego *aeromonas hydrophila*, odznaczającego się wygodnym zastosowaniem i szybkością wykrywania. Zestaw do wykrywania metodą LAMP zawiera odczynnik ekstrahujący DNA bakterii oraz odczynnik do reakcji LAMP, gdzie odczynnik do reakcji zawiera primery FIP o sekwencji GTTCCCCCATCAGATCCGTGGTTTACGCCACCCAGTTTCTTG oraz BIP o sekwencji TCCGGCCTGTATACCTGTATCAGGTTAAACCAGGGTGTCATCGCT, F3 o sekwencji TGATGGCCACGAGACATCCA i B3 o sekwencji TGCTTGATCCCCTTGCTACT. Sposób wykrywania metodą LAMP patogenicznego *aeromonas hydrophila* obejmuje następujące etapy: (1) ekstrakcję DNA; (2) amplifikację LAMP patogenicznego *aeromonas hydrophila* oraz (3) wykrywanie barwieniem. Rozwiązanie jest dostosowane do wykrywania patogenicznego *aeromonas hydrophila*.

W zgłoszeniu patentowym CN106282319A (opubl. 2017-01-04) opisano zestaw do wykrywania bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy fluorescencyjną metodą LAMP w czasie rzeczywistym i sposób zastosowania. Rozwiązanie ujawnia zestaw do wykrywania bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy fluorescencyjną metodą LAMP w czasie rzeczywistym i sposób zastosowania. Zestaw odznacza się tym, że jest on złożony z roztworu zestawu primerów do LAMP dla bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy, roztworu reakcyjnego do wstępnego mieszania, dodatkowo i negatywnej próbki bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy; zestaw primerów odznacza się tym, że jest formowany poprzez zaprojektowania 16SrDNA konserwowanych domen bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy włączając w to parę wewnętrznych primerów (FIP i BIP) oraz parę zewnętrznych primerów (F3 i B3), a zestaw primerów może być stosowany w bezpośrednim sposobie wizualnym fluorescencji, sposobie wizualnym fluorescencji napromieniowania ultrafioletowego, w sposobie elektroforezy żelowej, w sposobie wykrywania fluorescencyjnego w czasie rzeczywistym, w sposobie wykrywania mętności w czasie rzeczywistym i w zminiaturyzowanym sposobie całkowitej analizy. Zastosowanie sposobu z zestawu odznacza się tym, że wykrywanie bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy w czasie rzeczywistym można przeprowadzić w systemie LAMP. Dostarcza się sposób szybkiego, jakościowego i ilościowego wykrywania bakteryjnego wędnięcia Goss'a i śnieci liści kukurydzy, a zestaw odznacza się swoistością, łatwością, wygodą i szybkością stosowania i zdolnością do bycia zastosowanym przy wykrywaniu w czasie rzeczywistym na miejscu.

W zgłoszeniu patentowym CN103773853A (opubl. 2014-05-07) opisano sposób wykrywania *Pseudomonas syringae* w pomidorach w oparciu o technologię LAMP. Rozwiązanie dostarcza sposób wykrywania *Pseudomonas syringae* w pomidorach w oparciu o technologię LAMP. Sposób wykrywa-

nia obejmuje następujące etapy: projektowanie i syntetyzowanie primera LAMP; ekstrakcję wzorcowego DNA; ustanowienie sytemu LAMP; przeprowadzenie LAMP, gdzie temperatura reakcji w metodzie LAMP wynosi około 63°C, a amplifikację kończy się w 90 min reakcji; primery obejmują zewnętrzny primer oraz wewnętrzny primer. Sposób jest prosty i wygodny w obsłudze, tani oraz bardzo czuły; swoistość wykrywania wynosi powyżej 99% a sposób ma wysoką swoistość i nie powoduje zanieczyszczenia.

W zgłoszeniu patentowym CN102534015A (opubl. 2012-07-04) ujawniono grupę primerów LAMP do wykrywania *Candidatus liberibacter asiaticus* (Cma) (gatunki azjatyckie). Rozwiązanie ujawnia grupę primerów LAMP do wykrywania Cma. Grupa primerów obejmuje parę zewnętrznych primerów i parę wewnętrznych primerów. Rozwiązanie ujawnia ponadto sposób stosowany do wykrywania *Candidatus liberibacter asiaticus* stosując grupę primerów. Primer jest stosowany do wykrywania *Candidatus liberibacter asiaticus* stosując metodę LAMP, ma wysoką swoistość i czułość, może szybko, wygodnie i wydajnie wykrywać *Candidatus liberibacter asiaticus* (gatunki azjatyckie) i może szybko i dokładnie spełniać wymogi wykrywania *Candidatus liberibacter asiaticus*.

W zgłoszeniu patentowym RU2642313C1 (opubl. 2016-12-14) opisano zestaw primerów i sposób do wykrywania bakterii *Dickeyasolani*. Grupa obiektów, włączając w to sposób wykrywania *Dickeyasolani* za pomocą LAMP oraz zestaw primerów do wykrywania *Dickeyasolani* za pomocą LAMP. W jednej z wersji, rozwiązanie w reakcji amplifikacji docelowej sekwencji genu stosuje się zestaw oligonukleotydowych primerów, obejmujący: primer FIP o sekwencji nukleotydowej SEQ ID NO: 7 lub jego homolog, primer BIP o sekwencji nukleotydowej SEQ ID NO: 8 lub jego homolog, primer F3 o sekwencji nukleotydowej SEQ ID NO: 9 lub jego homolog, primer B3 o sekwencji nukleotydowej SEQ ID NO: 10 lub jego homolog; homologi primerów FIP, BIP, F3 i B3 mają homologię nie mniejszą niż 95% w porównaniu z odpowiadającymi markerami nukleotydowymi sekwencji SEQ ID NO: 7, 8, 9 i 10, pod warunkiem, że takie homologiczne primery mogą hybrydyzować z docelowym genem infB kodującym czynnik inicjacji translacji IF-2.

W zgłoszeniu patentowym CN105219871A (opubl. 2016-01-06) ujawniono grupę primerów do wykrywania LAMP, zestaw i sposób do wykrywania bakteryjnego raka pomidora w oparciu o geny cytC. Rozwiązanie dotyczy grupy primerów do wykrywania za pomocą LAMP, zestawu i sposoby dla genów cytC przy bakteryjnym raku pomidora. Grupa primerów do wykrywania obejmuje pięć swoistych primerów o sekwencjach nukleotydowych reprezentowanych odpowiednio przez SEQ ID NO: 1–5. Zestaw do wykrywania obejmuje roztwór primerów do wykrywania, polimerazę DNA o aktywności zamiany łańcucha, roztwór buforu reakcyjnego 10*, roztwór DTP i czynnik rozwijający kolor. Sposób wykrywania obejmuje etapy amplifikacji matrycy DNA próbki w 63–65°C za pomocą swoistych primerów i polimerazy DNA o aktywności zamiany łańcucha i określania czy próbka zawiera bakteryjny rak pomidora poprzez obserwację zmiany koloru czynnika rozwijającego kolor. Nie są wymagane specjalne przyrządy, a grupa primerów do wykrywania LAMP, zestaw do wykrywania i sposób wykrywania odznaczają się szybkością, dużą wydajnością, prostotą i wygodą obsługi, silną swoistością, wysoką czułością i tym podobnymi i można je stosować w wykrywaniu w terenie.

W zgłoszeniu patentowym CN105200145A (opubl. 2015-12-30) opisano grupę primerów do LAMP szybko wykrywającą patogen raka pomidora, zestaw i sposób wykrywania. Rozwiązanie ujawnia grupę primerów LAMP genu TomA dla patogenu raka pomidora, zestaw i sposób wykrywania. Grupa primerów składa się z 6 swoistych primerów, a sekwencje nukleotydowe grupy primerów są przedstawione jako SEQ ID NO: 1–6. Zestaw do wykrywania obejmuje roztwór primerów do wykrywania, polimerazę DNA o aktywności przemieszczenia łańcucha, bufor reakcyjny 10*, roztwór DTP i czynnik tworzący barwnik. Sposób wykrywania obejmuje zastosowanie swoistych primerów i polimerazy DNA o aktywności przemieszczenia łańcucha do przeprowadzenia amplifikacji na próbce matrycowego DNA w 63–65°C i określania czy próbka zawiera patogen raka pomidora poprzez obserwację zmiany koloru czynnika tworzącego barwnik. Według schematu technicznego, niewymagane są szczególne przyrządy, a grupa primerów, zestaw i sposób wykrywania odznacza się szybkością i wydajnością, prostotą obsługi, wysoką swoistością i czułością i są odpowiednie do wykrywania w terenie.

W zgłoszeniu patentowym US5710002A (opubl. 1998-01-20) opisano sposób wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms). Rozwiązanie dostarcza wyizolowane kwasy nukleinowe zawierające sekwencje nukleotydowe unikalne dla Cms, korzystnie unikalne dla chromosomu Cms. Tak wyizolowane kwasy nukleinowe mogą być wytworzone przez hybrydyzację eliminacyjną jak opisano bardziej szczegółowo poniżej. Korzystnie, wyizolowane kwasy nukleinowe według rozwią-

zania zawierają co najmniej 15 sąsiadujących nukleotydów unikatowej sekwencji nukleotydowej Cms lub komplementarnej do niej sekwencji nukleotydowej. Kwasy nukleinowe według rozwiązania mogą ponadto zawierać znacznik do wykrywania, korzystnie znacznik nieradioaktywny. Dostarczono również rekombinowany wektor zawierający takie wyizolowane kwasy nukleinowe i transformowane komórki gospodarza zawierające taki wektor. Rozwiązanie dostarcza również sposoby wykrywania obecności komórki Cms w próbce biologicznej obejmujące etapy: (1) dostarczenia próbki biologicznej; (2) kontaktowania próbki biologicznej z co najmniej jednym wyizolowanym kwasem nukleinowym zawierającym sekwencję nukleotydową unikalną dla Cms w warunkach umożliwiających hybrydyzację izolowanego kwasu nukleinowego z komplementarną cząsteczką DNA, tym samym tworząc hybrydę kwasu nukleinowego i (3) wykrywanie hybrydy kwasu nukleinowego. Korzystnie, wyizolowany kwas nukleinowy zawiera ponadto znacznik a etap wykrywania hybrydy kwasu nukleinowego obejmuje wykrywanie obecności znacznika. Taki sposób wykrywania korzystnie wykorzystuje parę primerów, każdy primer zawiera wyizolowaną sekwencję nukleotydową unikatową dla Cms. Takie primery można stosować w reakcji amplifikacji DNA, np. PCR, tym samym wytwarzając produkt amplifikacji; wykrywanie obecności produktu amplifikacji wskazuje na obecność Cms w próbce.

Pomimo istniejących do tej pory rozwiązań istnieje ciągła potrzeba opracowania testu diagnostycznego do wykrywania kwarantannowej bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms), sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. Zalecane obecnie testy detekcji bakterii Cms bazują na koncentracji komórek bakteryjnych przy wykorzystaniu siły odśrodkowej oraz filtracji mechanicznej odpowiednio poprzez wirowanie ekstraktu roślinnego zawierającego komórki bakterii oraz zagęszczanie przy pomocy filtra antybakteryjnego. Istnieją również sposoby zagęszczania na aktywowanych magnetycznie mikrosferach krzemionkowych pokrytych odpowiednimi przeciwciałami (test LUMINEX) tudzież utrwalenie niewielkiej porcji zawiesiny na szkiełkach mikroskopowych – test IF (OEPP/EPPO 2006). Uzyskanie ww. sposobami żywych komórek bakterii Cms, które można użyć do dalszej analizy jest bardzo trudne. Z uwagi na status organizmu jako kwarantannowego, jego zanieczyszczenie gospo-polityczne jest bardzo istotne. Patogen stwarza poważne trudności z diagnostyką, w związku z czym nie ma obecnie metody, która byłaby sama w sobie w 100% wiarygodna i polecana przez EPPO (ang. Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin) jako niezawodna. Oznacza to, że istnieje nadal zapotrzebowanie na szybkie, czułe i bezpośrednie metody detekcji, które będą jednocześnie specyficzne i niedrogie, a które umożliwią bieżącą kontrolę.

Celem wynalazku było opracowanie zestawu immuno-molekularnego do wykrywania bakterii Cms w trudnych do identyfikacji próbach środowiskowych typu tkanki roślinne (liście, bulwy ziemniaka), gleba, woda, itp. Test według wynalazku opiera się o nowe zastosowanie nowej jakości IgG anti-Cms, opracowanie i wykorzystanie w teście nowego immunopodłoża (immunokoncentratora) do wyłapywania komórek bakterii Cms z wyżej wymienionych prób oraz opracowanie sekwencji starterów do reakcji LAMP (ang. *Loop – mediated isothermal amplification*) pozwalających na wysoce specyficzne wykrywanie Cms techniką LAMP oraz innymi technikami molekularnymi, jak PCR i Real-Time oraz immunologicznymi, jak test IFAS i przyżyciowymi, jak test patogeniczności (BIOTEST).

Realizacja tak określonego celu i rozwiązanie opisanych w stanie techniki problemów związanych z opracowaniem prezentowanego zestawu immuno-molekularnego do wykrywania bakterii Cms w trudnych do identyfikacji próbach środowiskowych, zostały osiągnięte w niniejszym wynalazku. Nieoczekiwanie okazało się, że opracowanie i wykorzystanie w teście nowego immunopodłoża (immunokoncentratora) do wyłapywania komórek bakterii Cms oraz opracowanie sekwencji starterów do reakcji LAMP umożliwiło wysoce specyficzne wykrywanie Cms techniką LAMP.

Poddawane zgodnej z wynalazkiem modyfikacji chemicznej oraz immunoaktywacji powierzchni elementu roboczego – immunokoncentratora, mogą być wytworzone z różnego rodzaju materiałów (z polistyrenu, polietylenu, poliwęglanu i szkła). Wynalazek pozwolił na uzyskanie funkcjonalnego podłoża o nowych właściwościach zdolnego do aktywacji przeciwciałami (np. skierowanymi na nowego rodzaju antygen – komórki bakteryjne pozbawione śluzów bakteryjnych do wykorzystania w detekcji bakterii Cms).

Przedmiotem wynalazku jest zestaw do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) w analizowanej próbce charakteryzujący się tym, że zawiera immunosorbent z immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec badanego antygenu bakteryjnego, startery, przy czym próbka analizowana jest przy zastosowaniu metody LAMP, Biotestu, metody IFAS, PCR i/lub Real-Time PCR, i że obejmuje startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.

Korzystnie, gdy immobilizowane przeciwciała specyficzne wobec badanego antygeny bakteryjnego stanowią IgG anty-Cms.

Korzystnie, gdy IgG anty-Cms są wybrane spośród przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms.

Korzystnie, gdy IgG anty-Cms są uzyskane poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygeny bakteryjnego.

Korzystnie, gdy antygen bakteryjny otrzymany jest z komórek bakterii poprzez przemywanie bakterii roztworem buforowym wybranym spośród roztworu buforowego glicyna-HCl lub roztworu buforowego glicyna-NaOH.

Korzystnie, gdy przeciwciała są wyznakowane znacznikiem, przy czym znacznik jest wybrany spośród: barwnika fluorescencyjnego lub fluorochromu.

Korzystnie, gdy immunosorbent posiada powierzchnię aktywowaną chemicznie polimerem aniliny modyfikowanym aldehydem glutarowym lub powierzchnia aktywowana chemicznie polimerem aniliny nie jest poddana dalszej modyfikacji chemicznej.

Korzystnie, gdy immunosorbent ma postać patyczka i/lub rurki zakończonej stożkowo, prostopadłościanu zakończonego ostrosłupem i/lub postać walca zakończonego stożkiem, umieszczonego w zamkniętym lub otwartym naczyniu, z materiału wybranego spośród: polistyrenu, polietylenu, poliwęglanu, szkła lub ich pochodnych.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.

Korzystnie, gdy zestaw służy do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii.

Korzystnie, gdy ma zastosowanie w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest starter charakteryzujący się tym, że obejmuje startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.

Korzystnie, gdy starter służy do specyficznego wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Korzystnie, gdy starter ma zastosowanie w reakcji LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.

Kolejnym przedmiotem według wynalazku jest immunosorbent bakterii, charakteryzujący się tym, że obejmuje immunosorbent z immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec badanego antygeny bakteryjnego, który stanowią IgG anty-Cms.

Korzystnie, gdy immunosorbent ma postać patyczka i/lub rurki zakończonej stożkowo, prostopadłościanu zakończonego ostrosłupem i/lub postać walca zakończonego stożkiem, umieszczonego w zamkniętym lub otwartym naczyniu, z materiału wybranego spośród: polistyrenu, polietylenu, poliwęglanu, szkła lub ich pochodnych, i że ma zastosowanie do *Clavibacter sepedonicus* (Cs), i że posiada powierzchnię aktywowaną chemicznie polimerem aniliny modyfikowanym aldehydem glutarowym lub powierzchnia aktywowana chemicznie polimerem aniliny nie jest poddana dalszej modyfikacji chemicznej.

Korzystnie, gdy immunosorbent bakterii zawiera dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.

Korzystnie, gdy immunosorbent bakterii ma zastosowanie w metodzie LAMP, Bioteście, metodzie IFAS, PCR i/lub Real-Time PCR.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji *Clavibacter sepedonicus* (Cs), charakteryzujący się tym, że obejmuje następujące etapy: 1) immunokoncentrację na podłożach ze specyficznym IgG anty-Cms; 2) ekstrakcję DNA; 3) amplifikację LAMP i, że stosuje się startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.

Korzystnie, gdy stosuje się przeciwciała specyficzne wobec bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygeny bakteryjnego otrzymanego z komórek bakterii.

Korzystnie, gdy komórki bakterii przemywa się roztworem buforowym wybranym spośród roztworu buforowego glicyna-HCl lub roztworu buforowego glicyna-NaOH.

Korzystnie, gdy stosuje się przeciwciała wyznakowane znacznikiem, przy czym znacznik jest wybrany spośród: barwnika fluorescencyjnego lub fluorochromu.

Korzystnie, gdy stosuje się dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, korzystnie wybrane spośród pożywek selektywnych, półselektywnych lub mineralnych.

Korzystnie, gdy poza reakcją LAMP wykorzystuje się PCR i/lub Real-Time PCR.

Korzystnie, gdy etap immunokoncentracji i/lub wyłapywania *Clavibacter sepedonicus* (Cs), obejmuje immunokoncentrację na podłożach ze specyficznym IgG anty-Cms.

Korzystnie, gdy immunokoncentrację i/lub wyłapywanie *Clavibacter sepedonicus* (Cs) przeprowadza się z zanieczyszczonych prób środowiskowych.

Korzystnie, gdy immunokoncentrację *Clavibacter sepedonicus* (Cs) przeprowadza się z czystych zawiesin bakteryjnych uzyskanych poprzez namnożenie na podłożach mikrobiologicznych.

Korzystnie, gdy podłoża mikrobiologiczne zawierają dodatkowo składniki pokarmowe dla namnażanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie starterów opisanych sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6 do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Korzystnie, gdy do analizy próbki stosuje się metodę wybraną spośród: metody LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.

Korzystnie, gdy zastosowanie jest w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter sepedonicus* (Cs) wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie immobilizowanych przeciwciał IgG anty-Cms do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.

Korzystnie, gdy IgG anty-Cms są wybrane spośród przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms.

Korzystnie, gdy IgG anty-Cms są uzyskane poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygeny bakteryjnego.

Korzystnie, gdy do analizy próbki stosuje się metodę wybraną spośród: metody LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.

Korzystnie, gdy zastosowanie jest do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii.

Korzystnie, gdy zastosowanie jest w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter sepedonicus* (Cs) wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.

W celu lepszego zrozumienia poniżej zaprezentowano przykładowe realizacje zdefiniowanego powyżej wynalazku.

Przykłady

P r z y k ł a d 1

Aktywacja podłoża w sposób przypadkowy

Do testu wykorzystano podłoże z poliwęglanu aktywowane chemicznie jak poniżej. W celu aktywacji podłoża, na jego powierzchni prowadzono polimeryzację aniliny dobierając warunki pozwalające na powtarzalne i równomierne pokrycie badanej powierzchni polimerem.

Anilinę polimeryzowano zarówno miejscowo na określonym obszarze matrycy, jak i na powierzchni całego podłoża. Aby uzyskać odpowiednie grupy funkcyjne zdolne do przyłączania przeciwciał, powierzchnię wytworzonego polimeru aniliny modyfikowano chemicznie aldehydem glutarowym.

W tym celu sporządzano 0,02 M roztwór aniliny w 0,1 N HCl, do którego dodawano 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ w stosunku objętościowym od 10:1 (obj./obj.) i po dokładnym wymieszaniu umieszczano pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji trzykrotnie przepłukiwano 2 × dest. H_2O , dwukrotnie 0,1 N NaOH, dwukrotnie 0,1 N HCl i pięciokrotnie 2 × dest. H_2O .

Polianilinę równoważono buforem 1×PBS pH 7,4. Następnie inkubowano 30 minut z 5% roztworem aldehydu glutarowego w 1×PBS pH 7,4, po czym trzykrotnie płukano tym buforem bez aldehydu glutarowego, suszono i przechowywano w 4°C do czasu aktywacji przeciwciałami skierowanymi na bakterie Cms.

IgG unieruchamiano kowalencyjnie na powierzchni polianiliny w sposób przypadkowy. W tym celu podłoże modyfikowane chemicznie polianiliną i aldehydem glutarowym, immobilizowano 50 µl roztworu przeciwciał anty-Cms o stężeniu 1 mg/ml w roztworze 1×PBS pH 7,4 z 20% glicerolem. Podłoże inkubowano 120 minut w 37°C, trzykrotnie przemywano ww. buforem bez IgG i trzykrotnie 50 mM buforem boranowym pH 8,0. Następnie nanoszono po 50 µl 10% roztworu NaCNBH_4 w 50 mM buforem boranowym pH 8,0, umieszczano na 15 minut pod dygestorium i trzykrotnie przemywano buforem

1×PBS pH 7,4. Aktywowane powierzchnie inkubowano następnie 60 minut w 37°C z buforem do blokowania (5% albumina wołowa w buforze 1×PBS pH 7,4), po czym trzykrotnie przemywano buforem TBST pH 7,2 z detergentem 0,5% Tween 20 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4.

Przykład 2

Aktywacja podłoża w sposób przypadkowy

Do testu wykorzystano podłoże z polistyrenu aktywowane chemicznie jak poniżej. W celu aktywacji podłoża, na jego powierzchni prowadzono polimeryzację aniliny dobierając warunki pozwalające na powtarzalne i równomierne pokrycie badanej powierzchni polimerem. Anilinę polimeryzowano zarówno miejscowo na określonym obszarze matrycy, jak i na powierzchni całego podłoża analogicznie jak w przykładzie 1.

W tym celu sporządzano 0,02 M roztwór aniliny w 0,1 N HCl, do którego dodawano 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ w stosunku objętościowym od 10:1 (obj./obj.) i po dokładnym wymieszaniu umieszczano pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji trzykrotnie przepłukiwano 2 × dest. H_2O , dwukrotnie 0,1 N NaOH, dwukrotnie 0,1 N HCl i pięciokrotnie 2 × dest. H_2O .

Polianilinę równoważono buforem 1×PBS pH 7,4. Następnie inkubowano 30 minut z 5% roztworem aldehydu glutarowego w 1×PBS pH 7,4, po czym trzykrotnie płukano tym buforem bez aldehydu glutarowego, suszono i przechowywano w 4°C do czasu aktywacji przeciwciałami skierowanymi na bakterie Cms.

IgG unieruchamiano kowalencyjnie na powierzchni polianiliny w sposób przypadkowy. W tym celu podłoże modyfikowane chemicznie polianiliną i aldehydem glutarowym, immobilizowano 50 µl roztworu przeciwciał anti-Cms o stężeniu 1 mg/ml w roztworze 1×PBS pH 7,4 z 20% glicerolem. Podłoże inkubowano 120 minut w 37°C, trzykrotnie przemywano ww. buforem bez IgG i trzykrotnie 50 mM buforze boranowym pH 8,0. Następnie nanoszono po 50 µl 10% roztworu NaCNBH_4 w 50 mM buforze boranowym pH 8,0, umieszczano na 15 minut pod dygestorium i trzykrotnie przemywano buforem 1×PBS pH 7,4. Aktywowane powierzchnie inkubowano następnie 60 minut w 37°C z buforem do blokowania (5% albumina wołowa w buforze 1×PBS pH 7,4), po czym trzykrotnie przemywano buforem TBST pH 7,2 z detergentem 0,5% Tween 20 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4.

Przykład 3

Aktywacja podłoża w sposób ukierunkowany

Do testu wykorzystano podłoże z polietylenu aktywowane chemicznie jak poniżej. W celu aktywacji podłoża, na jego powierzchni prowadzono polimeryzację aniliny dobierając warunki pozwalające na powtarzalne i równomierne pokrycie badanej powierzchni polimerem. Anilinę polimeryzowano zarówno miejscowo na określonym obszarze matrycy, jak i na powierzchni całego podłoża analogicznie jak w przykładzie 1.

W tym celu sporządzano 0,02 M roztwór aniliny w 0,1 N HCl, do którego dodawano 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ w stosunku objętościowym od 10:1 (obj./obj.) i po dokładnym wymieszaniu umieszczano pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji trzykrotnie przepłukiwano 2 × dest. H_2O , dwukrotnie 0,1 N NaOH, dwukrotnie 0,1 N HCl i pięciokrotnie 2 × dest. H_2O .

Polimer aniliny równoważono buforem 1×PBS pH 7,4 i przechowywano w 4°C do czasu aktywacji przeciwciałami skierowanymi na bakterie Cms.

IgG unieruchamiano kowalencyjnie na powierzchni polianiliny w sposób ukierunkowany, stosując przeciwciała uprzednio poddane procesowi oksydacji oraz polianilinę niemodyfikowaną chemicznie. Do opłaszczania powierzchni polimeru stosowano roztwór oksydowanych przeciwciał anti-Cms o stężeniu 1 mg/ml w 50 mM buforze węglanowym pH 8,0 z 25% glicerolem. Po naniesieniu przeciwciał, podłoże inkubowano 120 minut w 37°C i trzykrotnie przemywano buforem boranowym pH 8,0. Następnie nanoszono po 50 µl 10% roztworu NaCNBH_4 w buforze boranowym pH 8,0, umieszczano na 15 minut pod dygestorium i trzykrotnie przemywano buforem boranowym pH 8,0 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4. Aktywowane powierzchnie inkubowano następnie 60 minut w 37°C z buforem do blokowania (5% albumina wołowa w buforze 1×PBS pH 7,4), po czym trzykrotnie przemywano buforem TBST pH 7,2 z detergentem 0,5% Tween 20 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4.

Przykład 4

Aktywacja podłoża w sposób ukierunkowany

Do testu wykorzystano podłoże ze szkła aktywowane chemicznie jak poniżej. W celu aktywacji podłoża, na jego powierzchni prowadzono polimeryzację aniliny dobierając warunki pozwalające

na powtarzalne i równomierne pokrycie badanej powierzchni polimerem. Anilinę polimeryzowano zarówno miejscowo na określonym obszarze matrycy, jak i na powierzchni całego podłoża analogicznie jak w przykładzie 1.

W tym celu sporządzano 0,02 M roztwór aniliny w 0,1 N HCl, do którego dodawano 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ w stosunku objętościowym od 10:1 (obj./obj.) i po dokładnym wymieszaniu umieszczano pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji trzykrotnie przepłukiwano $2 \times$ dest. H_2O , dwukrotnie 0,1 N NaOH, dwukrotnie 0,1 N HCl i pięciokrotnie $2 \times$ dest. H_2O .

Polimer aniliny równoważono buforem 1×PBS pH 7,4 i przechowywano w 4°C do czasu aktywacji przeciwciałami skierowanymi na bakterie *Cms*.

IgG unieruchamiano kowalencyjnie na powierzchni polianiliny w sposób ukierunkowany, stosując przeciwciała uprzednio poddane procesowi oksydacji oraz polianilinę niemodyfikowaną chemicznie. Do opłaszczania powierzchni polimeru stosowano roztwór oksydowanych przeciwciał anti-*Cms* o stężeniu 1 mg/ml w 50 mM buforze węglanowym pH 8,0 z 25% glicerolem. Po naniesieniu przeciwciał, podłoże inkubowano 120 minut w 37°C i trzykrotnie przemywano buforem boranowym pH 8,0. Następnie наносono po 50 μl 10% roztworu NaCNBH_4 w buforze boranowym pH 8,0, umieszczano na 15 minut pod dygestorium i trzykrotnie przemywano buforem boranowym pH 8,0 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4. Aktywowane powierzchnie inkubowano następnie 60 minut w 37°C z buforem do blokowania (5% albumina wołowa w buforze 1×PBS pH 7,4), po czym trzykrotnie przemywano buforem TBST pH 7,2 z detergentem 0,5% Tween 20 i trzykrotnie buforem 1×PBS pH 7,4.

Przykład 5

Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – BIOTEST

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt z liści roślin ziemniaka umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 1 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie *Cms* oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek *Cms* na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii *Cms*. Po inkubacji 5–8 dni w temperaturze pokojowej, uzyskane kolonie bakteryjne zbliżone morfologicznie do kolonii bakterii *Cms* identyfikowano pod kątem wirulencji w bioteście z bakłażanem.

Dla każdej z wyselekcjonowanych kolonii sporządzono wodne zawiesiny bakteryjne, które doprowadzono do koncentracji ok. 10^8 jtk/ml. Każdą z nich inokulowano 5 młodych siewek bakłażana odmiany Black Beauty znajdujących się w stadium 2–3 liścienia. W czasie inkubacji 3–4 tygodni w temperaturze ok. 24°C obserwowano objawy chorobowe występujące na liściach roślin.

Przeprowadzony biotest pozwolił stwierdzić stopień zjadliwości (wirulencji) uzyskanego izolatu bakterii *Cms*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono od 40 do 60% stopień porażenia powierzchni liści badanych roślin bakłażana, co świadczy o silnej zjadliwości badanego izolatu *Cms*.

Przykład 6

Test z ekstraktem z bulw ziemniaka – BIOTEST

Sporządzono ekstrakt z bulw ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 1 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie *Cms* oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek *Cms* na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii *Cms*. Po inkubacji 5–8 dni w temp. pokojowej, uzyskane kolonie bakteryjne zbliżone morfologicznie do kolonii bakterii *Cms* identyfikowano pod kątem wirulencji w bioteście z bakłażanem.

Badanie przeprowadzono analogicznie jak w przykładzie 5.

Przeprowadzony biotest pozwolił stwierdzić stopień zjadliwości (wirulencji) uzyskanego izolatu bakterii *Cms*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono od 20 do 40% stopień porażenia powierzchni liści badanych roślin bakłażana, co świadczy o średniej do silnej zjadliwości badanego izolatu *Cms*.

Przykład 7

Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – BIOIFAS

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt z liści roślin ziemniaka umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 1 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie *Cms* oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek *Cms* na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii *Cms*. Po inkubacji 5–8 dni w temp. pokojowej, uzyskane kolonie bakteryjne zbliżone morfologicznie do kolonii bakterii *Cms* identyfikowano testem immunofluorescencyjnym w obecności referencyjnego szczepu *Cms* jako odnośnej kontroli pozytywnej.

W tym celu z każdej kolonii pobrano eżę komórki bakterii i umieszczając w oddzielnych probówkach sporządzono wodne zawiesiny bakteryjne. Z każdej próbówki pobrano pipetą 3 × 10 µl objętości i nanoszono na wielopunktowe szkiełka mikroskopowe. Preparaty utrwalano następnie przez podgrzewanie w temperaturze 40°C i opalanie nad palnikiem gazowym.

Szkiełka z utrwalonymi bakteriami umieszczono na wilgotnym papierze, a następnie każde okienko pokrywano 20 µl roztworu przeciwciał IgG anti-*Cms* w 20 mm buforze fosforanowym. Szkiełka inkubowano następnie pod przykryciem przez 60 minut w temperaturze 37°C.

Następnie preparaty delikatnie przepłukiwano 50 mm buforem fosforanowym, osuszano w temperaturze pokojowej i ponownie umieszczano na wilgotnym papierze pokrywając okienka 20 µl objętością roztworu koniugatu przeciwciał znakowanych indokarbocyaniną, skierowanych na IgG pierwszorzędowe. Płytki inkubowano pod przykryciem przez 60 minut w temperaturze 37°C.

Preparaty ponownie przepłukiwano jw., osuszano w temperaturze pokojowej, po czym na każde okienko nanoszono po 20 µl 0,1 M buforu fosforanowo-glicerynowego zapobiegającego odbarwianiu, nakrywano szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano z użyciem immersji olejowej przy wykorzystaniu mikroskopu epifluorescencyjnego. Średnią liczbę typowych fluoryzujących komórek w polu widzenia wyznaczano zgodnie z wzorem podanym w załączniku 4 Dyrektywy Komisji WE 2006/56.

Przeprowadzony test IF pozwolił potwierdzić obecność *Cms* w badanej próbce.

Średnia liczba typowych dla *Cms*, fluoryzujących komórek bakteryjnych obliczona na podstawie 20 powtórzeń obserwowanych w polu widzenia mikroskopu epifluorescencyjnego wynosiła w zależności od badanej próby od 20 do powyżej 500.

Przykład 8

Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – Immuno-IFAS

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 2 i inkubowano 3 godziny w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie *Cms* oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5. Uzyskane komórki bakterii *Cms* identyfikowano testem immunofluorescencyjnym w obecności referencyjnego szczepu *Cms* jako odnośnej kontroli pozytywnej.

W tym celu z uzyskanej zawiesiny ze zmywu bakterii pobrano pipetą 3 × 10 µl objętości i nanoszono na wielopunktowe szkiełka mikroskopowe. Test przeprowadzono analogicznie jak w przykładzie 7.

Przeprowadzony test IF pozwolił potwierdzić obecność *Cms* w badanej próbce.

Średnia liczba typowych dla *Cms*, fluoryzujących komórek bakteryjnych obliczona na podstawie 20 powtórzeń obserwowanych w polu widzenia mikroskopu epifluorescencyjnego wynosiła w zależności od badanej próby od 1 do 20.

Przykład 9**Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – BIO-LAMP**

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 1 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odplukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie *Cms* oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek *Cms* na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii *Cms*.

Po inkubacji 5–8 dni w temp. pokojowej, bakterie z uzyskanych kolonii bakteryjnych zbliżonych morfologicznie do kolonii bakterii *Cms* poddano izolacji DNA bakteryjnego, a następnie identyfikowano testem LAMP w obecności DNA referencyjnego szczepu *Cms* jako odnośnej kontroli pozytywnej.

Test LAMP wykonano z użyciem 3 par starterów opracowanych w ramach wynalazku odpowiednio F3-CelA (SEQ. ID 1)/B3-CelA (SEQ. ID 2), FIP_CelA (SEQ. ID 3)/BIP_CelA (SEQ. ID 4) oraz LoopF_CelA (SEQ. ID 5)/LoopB_CelA (SEQ. ID 6), specyficznych wobec fragmentu genu *celA*. Amplifikację badanego DNA bakteryjnego prowadzono w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej, którą przygotowano z 15 µl premixu do reakcji LAMP zawierającego polimerazę *GspSSD* oraz odpowiednie odczynniki do wykonania reakcji LAMP, 2,5 µl mieszaniny ww. starterów, 2,5 µl molekularnie czystej wody oraz 5 µl badanego roztworu DNA. Jako kontrolę negatywną zamiast badanego DNA do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 µl DNA wyizolowanego z soku liści zdrowych roślin ziemniaka, natomiast jako kontrolę pozytywną 5 µl DNA referencyjnego szczepu *Cms*. Następnie próbki umieszczono w urządzeniu Genie II do przeprowadzania reakcji LAMP i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 65°C. Wynik testu LAMP oceniano w czasie rzeczywistym na podstawie krzywych amplifikacji oraz krzywych topnienia po zakończonej reakcji LAMP.

Przeprowadzony test LAMP pozwolił potwierdzić obecność *Cms* w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, wynik pozytywny uzyskano w czasie od 6 do 15 minut i wynosił od ok. 60 do 80.000 jednostek dla barwnika fluoresceiny (FITC), natomiast dla prób ujemnych nie uzyskano wyniku pozytywnego nawet po 60 minutach reakcji LAMP. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej wynik dodatni o ekstynkcji 55.000 dla FITC uzyskano w czasie ok. 10 minut.

Przykład 10**Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – Immuno-LAMP**

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 3 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odplukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie oceniano testem LAMP po uprzedniej desorpcji komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5. Bakterie *Cms* poddano izolacji DNA bakteryjnego, a następnie identyfikowano testem LAMP w obecności DNA referencyjnego szczepu *Cms* jako odnośnej kontroli pozytywnej.

Test LAMP wykonano z użyciem 3 par starterów opracowanych w ramach wynalazku analogicznie jak w przykładzie 9. Amplifikację w warunkach izotermicznych prowadzono w temperaturze 65°C w czasie 60 minut w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej.

Przeprowadzony test LAMP pozwolił potwierdzić obecność *Cms* w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, wynik pozytywny uzyskano w czasie od 8 do 35 minut i wynosił od ok. 25 do 70.000 jednostek dla barwnika fluoresceiny (FITC), natomiast dla prób ujemnych nie uzyskano wyniku pozytywnego nawet po 60 minutach reakcji LAMP. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej wynik dodatni o ekstynkcji 55.000 dla FITC uzyskano w czasie ok. 10 minut.

Przykład 11**Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – Immuno-Real-Time PCR**

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanego o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym

zgodnie z przykładem 3 i inkubowano 3 godziny w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie oceniano testem Real-Time PCR po uprzedniej desorpcji komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5. Bakterie Cms poddano izolacji DNA bakteryjnego, a następnie identyfikowano testem Real-Time PCR w obecności DNA referencyjnego szczepu Cms jako odnośnej kontroli pozytywnej.

Test PCR wykonano z użyciem starterów F3-CelA (SEQ. ID 1) i B3-CelA (SEQ. ID 2) specyficznych wobec fragmentu genu *celA*. Amplifikację badanego DNA bakteryjnego prowadzono w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej, którą przygotowano z 12,5 µl 2× stężonego roztworu polimerazy iTaq DNA polimerazy, 1 µl ww. starterów (każdy po 0,5 µl), 5,5 µl molekularnie czystej wody oraz 5 µl badanego roztworu DNA. Jako kontrolę negatywną zamiast badanego DNA do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 µl DNA wyizolowanego z soku liści zdrowych roślin ziemniaka, natomiast jako kontrolę pozytywną 5 µl DNA referencyjnego szczepu Cms. Następnie próbówki umieszczono w termocyklerze Real-Time PCR i prowadzono proces amplifikacji w czasie 70 cykli. Wynik testu PCR oceniano w czasie rzeczywistym na podstawie analizy obserwowanych krzywych amplifikacji, jak również na podstawie krzywych topnienia po zakończonej reakcji amplifikacji.

Przeprowadzony test Real-Time PCR pozwolił potwierdzić obecność Cms w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, wynik pozytywny uzyskano w czasie od 20 do 45 cykli i wynosił od ok. 100 do 260 RFU, natomiast dla prób ujemnych nie uzyskano wyniku pozytywnego nawet przy prowadzeniu reakcji amplifikacji w czasie 70 cykli. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej wynik dodatni o ekstynkcji 150 RFU uzyskano w czasie ok. 25 cykli.

Przykład 12

Test z ekstraktem z liści roślin ziemniaka – Immuno-PCR

Sporządzono ekstrakt z liści roślin ziemniaka podejrzanych o porażenie bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4. Zbuforowany ekstrakt umieszczono w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 3 i inkubowano 3 godziny w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie oceniano testem PCR po uprzedniej desorpcji komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5. Bakterie Cms poddano izolacji DNA bakteryjnego, a następnie identyfikowano klasycznym testem PCR w obecności DNA referencyjnego szczepu Cms jako odnośnej kontroli pozytywnej. Test PCR wykonano z użyciem starterów F3-CelA (SEQ. ID 1) i B3-CelA (SEQ. ID 2) specyficznych wobec fragmentu genu *celA*. Amplifikację badanego DNA bakteryjnego prowadzono w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej, którą przygotowano z 12,5 µl 2× stężonego roztworu polimerazy Nova-Red, 1 µl ww. starterów (każdy po 0,5 µl), 5,5 µl molekularnie czystej wody oraz 5 µl badanego roztworu DNA. Jako kontrolę negatywną zamiast badanego DNA do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 µl DNA wyizolowanego z soku liści zdrowych roślin ziemniaka, natomiast jako kontrolę pozytywną 5 µl DNA referencyjnego szczepu Cms. Następnie próbówki umieszczono w termocyklerze PCR i prowadzono proces amplifikacji. Wynik testu PCR oceniano na podstawie analizy obrazu elektroforetycznego amplifikowanych prób.

Przeprowadzony test PCR pozwolił potwierdzić obecność Cms w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, uzyskano średnio widoczny do wyraźnego prążka świadczącego o amplifikacji szukanego fragmentu DNA, natomiast dla prób ujemnych nie zaobserwowano obecności prążka. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej uzyskano bardzo wyraźny prążek. Dla kontroli negatywnej nie zaobserwowano obecności charakterystycznego prążka w żelu elektroforetycznym.

Przykład 13

Test z ekstraktem z bulw ziemniaka – BIOLAMP

Sporządzono ekstrakt z bulw ziemniaka podejrzanych o porażenie latentne bakteriozą pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4, uzyskując w ten sposób zbuforowany ekstrakt z bulw ziemniaka. Uzyskaną mieszaninę umieszczano w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 1 i inkubowano 1 godzinę w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie

zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek Cms na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii Cms. Po inkubacji 5–8 dni w temp. pokojowej, uzyskane kolonie bakteryjne zbliżone morfologicznie do kolonii bakterii Cms identyfikowano testem LAMP w obecności DNA referencyjnego szczepu Cms jako odnośnej kontroli pozytywnej.

Test LAMP wykonano z użyciem 3 par starterów opracowanych w ramach wynalazku analogicznie jak w przykładzie 9. Amplifikację w warunkach izotermicznych prowadzono w temperaturze 65°C w czasie 30–60 minut w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej.

Test LAMP wykonano z użyciem 3 par starterów opracowanych w ramach wynalazku analogicznie jak w przykładzie 9. Amplifikację w warunkach izotermicznych prowadzono w temperaturze 65°C w czasie 60 minut w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej.

Przeprowadzony test LAMP pozwolił potwierdzić obecność Cms w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, wynik pozytywny uzyskano w czasie od 7 do 18 minut i wynosił od ok. 55 do 82.000 jednostek dla barwnika fluoresceiny (FITC), natomiast dla prób ujemnych nie uzyskano wyniku pozytywnego nawet po 60 minutach reakcji LAMP. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej wynik dodatni o ekstynkcji 55.000 dla FITC uzyskano w czasie ok. 10 minut.

Przykład 14

Test z ekstraktem z gleby – BIOLAMP

Sporządzono roztwór wodny z gleby pobranej z pola, na którym uprzednio wykryto w bulwach ziemniaka bakteriozę pierścieniową ziemniaka, do którego w stosunku 1:1 (obj./obj.) dodano bufor 1×PBS pH 7,4, uzyskując w ten sposób zbuforowany ekstrakt z gleby. Uzyskaną mieszaninę umieszczano w przygotowanym uprzednio naczyniu z immunoaktywnym podłożem otrzymanym zgodnie z przykładem 4 i inkubowano 3 godziny w temp. 37°C. Nadmiar niezwiązanych bakterii oraz znajdujące się w ekstrakcie zanieczyszczenia odpłukiwano trzykrotnie buforem – 1×PBS pH 7,4 z 0,05% Tween 20, natomiast immunopułapkowane bakterie oceniano przyżyciowo poprzez zmywanie komórek bakterii z powierzchni immunopodłoża przy użyciu 0,25 M roztworu glicyna-HCl pH 2,5 i następnie wykonano posiew zdesorbowanych komórek Cms na podłożu MTNA, półselektywnym dla komórek bakterii Cms. Po inkubacji 5–8 dni w temp. pokojowej, uzyskane kolonie bakteryjne zbliżone morfologicznie do kolonii bakterii Cms identyfikowano testem LAMP w obecności DNA referencyjnego szczepu Cms jako odnośnej kontroli pozytywnej.

Test LAMP wykonano z użyciem 3 par starterów opracowanych w ramach wynalazku analogicznie jak w przykładzie 9. Amplifikację w warunkach izotermicznych prowadzono w temperaturze 65°C w czasie 60 minut w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej.

Przeprowadzony test LAMP pozwolił potwierdzić obecność Cms w badanej próbce.

W przypadku prób dodatnich, wynik pozytywny uzyskano w czasie od 7 do 20 minut i wynosił od ok. 40 do 78.000 jednostek dla barwnika fluoresceiny (FITC), natomiast dla prób ujemnych nie uzyskano wyniku pozytywnego nawet po 60 minutach reakcji LAMP. Dla porównania dla odnośnej kontroli pozytywnej wynik dodatni o ekstynkcji 55.000 dla FITC uzyskano w czasie ok. 10 minut.

Wykaz sekwencji

Startery amplifikujące fragment genu CelsA

SEQ. ID	NAZWA	Sekwencja
SEQ. ID 1	F3_CelsA	AGCGTAAGGATGTCCACT
SEQ. ID 2	B3_CelsA	CCAGCAGGTCATTCCTTG
SEQ. ID 3	FIP_CelsA	CAAGACAGTCTTCTCCGACCGGGGTCATACATTTTCAGGCAT
SEQ. ID 4	BIP_CelsA	ATCGCATCGCATCGCATCTCAGAAGCCGATCATCTTACAA
SEQ. ID 5	LoopF_CelsA	CATGAATCCGCACGCATC
SEQ. ID 6	LoopB_CelsA	CCGCATTCCGTCTCTCAG

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) w analizowanej próbce, **znamienny tym**, że zawiera immunosorbent z immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec badanego antygeny bakteryjnego, startery, przy czym próbka analizowana jest przy zastosowaniu metody LAMP, Biotestu, metody IFAS, PCR i/lub Real-Time PCR, i że obejmuje startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.
2. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że immobilizowane przeciwciała specyficzne wobec badanego antygeny bakteryjnego stanowią IgG anty-Cms.
3. Zestaw według zastrz. 2, **znamienny tym**, że IgG anty-Cms są wybrane spośród przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms.
4. Zestaw według zastrz. 2, **znamienny tym**, że IgG anty-Cms są uzyskane poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygeny bakteryjnego.
5. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że antygen bakteryjny otrzymany jest z komórek bakterii poprzez przemywanie bakterii roztworem buforowym wybranym spośród roztworu buforowego glicyna-HCl lub roztworu buforowego glicyna-NaOH.
6. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przeciwciała są wyznakowane znacznikiem, przy czym znacznik jest wybrany spośród: barwnika fluorescencyjnego lub fluorochromu.
7. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że immunosorbent posiada powierzchnię aktywowaną chemicznie polimerem aniliny modyfikowanym aldehydem glutarowym lub powierzchnia aktywowana chemicznie polimerem aniliny nie jest poddana dalszej modyfikacji chemicznej.
8. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że immunosorbent ma postać patyczka i/lub rurki zakończonej stożkowo, prostopadłościanu zakończonego ostrosłupem i/lub postać walca zakończonego stożkiem, umieszczonego w zamkniętym lub otwartym naczyniu, z materiału wybranego spośród: polistyrenu, polietylenu, poliwęglanu, szkła lub ich pochodnych.
9. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zawiera dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.
10. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że służy do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii.
11. Zestaw według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ma zastosowanie w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.
12. Starter **znamienny tym**, że obejmuje startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.
13. Starter według zastrz. 12, **znamienny tym**, że służy do specyficznego wykrywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.
14. Starter według zastrz. 12, **znamienny tym**, że ma zastosowanie w reakcji LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.
15. Immunosorbent bakterii, **znamienny tym**, że obejmuje immunosorbent z immobilizowanymi przeciwciałami specyficznymi wobec badanego antygeny bakteryjnego, który stanowią IgG anty-Cms.
16. Immunosorbent bakterii według zastrz. 15, **znamienny tym**, że ma postać patyczka i/lub rurki zakończonej stożkowo, prostopadłościanu zakończonego ostrosłupem i/lub postać walca zakończonego stożkiem, umieszczonego w zamkniętym lub otwartym naczyniu, z materiału wybranego spośród: polistyrenu, polietylenu, poliwęglanu, szkła lub ich pochodnych, i że ma zastosowanie do *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, i że posiada powierzchnię aktywowaną chemicznie polimerem aniliny modyfikowanym aldehydem glutarowym lub powierzchnia aktywowana chemicznie polimerem aniliny nie jest poddana dalszej modyfikacji chemicznej.
17. Immunosorbent bakterii według zastrz. 15, **znamienny tym**, że zawiera dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.
18. Immunosorbent bakterii według zastrz. 15, **znamienny tym**, że ma zastosowanie w metodzie LAMP, Biotescie, metodzie IFAS, PCR i/lub Real-Time PCR.

19. Sposób identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy: 1) immunokoncentrację na podłożach ze specyficznym IgG anty-Cms; 2) ekstrakcję DNA; 3) amplifikację LAMP i, że stosuje się startery opisane sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6.
20. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się przeciwciała specyficzne wobec bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygenu bakteryjnego otrzymanego z komórek bakterii.
21. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że komórki bakterii przemywa się roztworem buforowym wybranym spośród roztworu buforowego glicyna-HCl lub roztworu buforowego glicyna-NaOH.
22. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się przeciwciała wyznakowane znacznikiem, przy czym znacznik jest wybrany spośród: barwnika fluorescencyjnego lub fluorochromu.
23. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się dodatkowo składniki pokarmowe dla immobilizowanych komórek bakteryjnych, korzystnie wybrane spośród pożywek selektywnych, półselektywnych lub mineralnych.
24. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że poza reakcją LAMP wykorzystuje się PCR i/lub Real-Time PCR.
25. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że etap immunokoncentracji i/lub wyłapywania *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, obejmuje immunokoncentrację na podłożach ze specyficznym IgG anty-Cms.
26. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że immunokoncentrację i/lub wyłapywanie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* przeprowadza się z zanieczyszczonych prób środowiskowych.
27. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że immunokoncentrację *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* przeprowadza się z czystych zawiesin bakteryjnych uzyskanych poprzez namnożenie na podłożach mikrobiologicznych.
28. Sposób według zastrz. 27, **znamienny tym**, że podłoża mikrobiologiczne zawierają dodatkowo składniki pokarmowe dla namnażanych komórek bakteryjnych, wybrane spośród składników pokarmowych obejmujących pożywki selektywne, półselektywne lub mineralne.
29. Zastosowanie starterów opisanych sekwencjami SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 i/lub SEQ ID No. 6 do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.
30. Zastosowanie według zastrz. 29, w którym do analizy próbki stosuje się metodę wybraną spośród: metody LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.
31. Zastosowanie według zastrz. 29, w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.
32. Zastosowanie immobilizowanych przeciwciał IgG anty-Cms do wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*.
33. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym IgG anty-Cms są wybrane spośród przeciwciał skierowanych na komórki bakterii Cms.
34. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym IgG anty-Cms są uzyskane poprzez prowadzenie immunizacji z wykorzystaniem antygenu bakteryjnego.
35. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym do analizy próbki stosuje się metodę wybraną spośród: metody LAMP, PCR i/lub Real-Time PCR.
36. Zastosowanie według zastrz. 32, do wykrywania albo przyżyciowego izolowania wybranych bakterii.
37. Zastosowanie według zastrz. 32, w diagnostyce i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* wywołującej bakteriozę pierścieniową ziemniaka.