

(19)



Octrooiiraad
Nederland

(11)

Publikatienummer: **9402018**

(12) **A TERINZAGELEGGING**

(21)

Aanvraagnummer: **9402018**

(22)

Indieningsdatum: **01.12.94**

(51)

Int.Cl.⁶:
**G01N 33/53, G01N 33/543,
G01N 33/569, G01N 33/577**

(30)

Voorrang:
02.12.93 ES 9302526

(43)

Ter inzage gelegd:
03.07.95 I.E. 95/13

(71)

Aanvrager(s):
**Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia
Agraria y Alimentaria te Madrid en Instituto
Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) te
Moncada, Spanje**

(72)

Uitvinder(s):
**Mariano Cambra te Masias, Spanje. Teresa
Gorris te Faura, Spanje. Milagros Lopez te
Masias, Spanje. Benito Alarcon te Rafelbunol,
Spanje**

(74)

Gemachtigde:
**Ir. J.J.H. Van kan c.s.
Algemeen Octrooibureau
Postbus 645
5600 AP Eindhoven**

(54)

**Werkwijze voor een gevoelige en specifieke detectie van Erwinia carotovora atroseptic subsp. door
'ELISA-verrijking**

(57)

Bij de onderhavige werkwijze worden eerst de antigenen van de pathogene bacterie Erwinia carotovora antroseptic subsp. (Eca) met behulp van monoklonale en polyklonale antilichamen onoplosbaar gemaakt in microplaten. Vervolgens wordt aan dezelfde microplaat een te onderzoeken monster en een selectief middel voor erwinia's (D-PEM) toegevoegd en wordt er gedurende 24-48 uren bij 25°C geïncubeerd onder anaerobe omstandigheden. De reactie wordt aangetoond met behulp van gebiotinyleerde Eca (4G4)-specifieke monoklonale antilichamen, gevolgd door toevoeging van streptoavidine gemerkt met een enzym of rechtstreeks met 4G4-antilichamen gemerkt met een enzym. De hydrolyse van het enzymatische substraat leidt tot het vormen van een gekleurd product dat fotocolorimetrisch wordt gemeten. Door parallele monsters in met D-PEM verrijkte of niet-verrijkte microplaten te bereiden, wordt het mogelijk de aanwezigheid en hoeveelheid van levende Eca-cellen te bepalen die in staat zijn in aardappelwortels of om het even welk ander plantaardig materiaal ziekte te veroorzaken.

Korte aanduiding: Werkwijze voor een gevoelige en specifieke detectie van *Erwinia carotovora atroseptic* subsp. door "ELISA-verrijking".

5 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de detectie, diagnose en kwantitatieve bepaling van *Erwinia carotovora atroseptic* subsp. (Eca).

De werkwijze is gebaseerd op de "in situ"-verrijking of verhoging van het aantal bacteriële cellen in een plantaardig monster, voor een zeer gevoelige detectie, kwantitatieve bepaling en identificering van antigenen van fytopathogene bacteriën van de soort *Erwinia carotovora atroseptic* subsp. (Eca) in wortels en ander plantaardig materiaal. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van Eca-specifieke monoklonale antilichamen 4G4 door de gemodificeerde immuno-enzymatische techniek ELISA-DAS (dubbele sandwich van antilichamen), of van polyklonale antilichamen afkomstig van antisera verkregen uitgaande van met glutaraaldehyde gefixeerde cellen. Deze antilichamen bedekken de plaat en maken de in het plantaardige monster aanwezige Eca-antigenen onoplosbaar, welke antigenen "in situ" worden vermenigvuldigd of verrijkt (in de kleine microplaat-vakjes voor titratie of cultuur) door toevoeging van het selectieve middel (D-PEM) en incubatie bij 25 °C onder anaerobe omstandigheden. De aan de antilichamen van de bedekte microplaat gefixeerde bacteriële antigenen worden gedetecteerd door de specifieke monoklonale antilichamen 4G4 die zijn gemerkt met een enzym (peroxydase of alkalisch fosfatase) of met biotine, en die vervolgens worden aangetoond met gemerkt streptoavidine met één van de twee hierboven vermelde enzymen.

De uiteindelijke toediening van een geschikt enzymatisch substraat voor de merkerenzymen leidt tot vorming van een gekleurd produkt dat spectrofotometrisch wordt gemeten. De waarden van de optische dichtheid of absorptie zijn evenredig met de hoeveelheid enzym die uiteindelijk wordt gefixeerd of onoplosbaar gemaakt in de microplaat, en dit laat toe het het in het onderzochte plantaardige monster aanwezige aantal cellen per milliliter te berekenen, wanneer de met verrijkte microplaten verkregen resultaten worden vergeleken met de resultaten van niet-verrijkte microplaten.

De gevoeligheid van de ELISA-werkwijze zonder verrijking bedraagt 10^6 - 10^5 CFU/ml, en na verrijking of versterking met D-PEM is het mogelijk 100 CFU/ml te detecteren, hetgeen overeenkomt met 10 oorspron-

kelijk levende bacteriële cellen die in het aangebrachte plantaardige monster aanwezig zijn. Deze kwantitatieve bepalingen zijn belangrijk voor het nemen van een beslissing met betrekking tot de bestemming van een batch aardappelwortels tijdens de sanitaire selectie of certificatie. Derhalve
 5 wordt een specifieke werkwijze beschreven voor de detectie van Eca onder toepassing van de monoklonale antilichamen 4G4, die uitstekend kan worden toegepast om in een zeer korte tijd, met een grote gevoeligheid en tegen lage kosten een groot aantal monsters te onderzoeken, en die zeer geschikt is voor routine-onderzoek van plantaardige monsters.

10 De gevoelige en specifieke detectie van *Erwinia carotovora* atroseptic subsp. (Eca) in zaai-aardappels en in andere groenten is een essentieel vereiste voor de produktie van zaden, wortels en vermenigvuldigingsmateriaal met sanitaire waarborg, waardoor een renderende oogst mogelijk wordt.

15 De mondiale verliezen door Eca bij talrijke groenten en in het bijzonder bij de aardappel (de belangrijkste groente van ons land en van andere landen, en de basis van de voedingsgewoonten in talrijke gebieden), zijn zeer hoog. Om deze reden zijn aanzienlijke inspanningen verricht om te komen tot de uiteindelijke samenstelling van werkwijzen
 20 voor een vroegtijdige diagnose, waardoor eliminatie van geïnfecteerde "zaai"-aardappel-batches mogelijk wordt.

Het enten en in cultuur brengen van Eca in CVP (dit betekent kristalviolet-pectaat), dat selectief is voor peptinolytische erwinia's, is beschreven door Cuppels en Kelman (*Phytopathol.*, 64, 468-475; 1974) en de werkzaamheid voor de detectie en karakterisatie van erwinias werd volgens het door Perómbelon en Hyman (*J. Appl. Bacteriol.*, 60, 61-66; 1986) beschreven onderzoek verbeterd door incubatie bij verschillende temperaturen. Door deze werkwijze wordt het probleem van de afzondering van erwinia's opgelost en biedt de mogelijkheid te differentiëren tussen
 25 Eca. E.C. subsp. *carotovora* (Ecc) en *E. chrysanthemi* (Ech). Nochtans kan de afzondering in een dergelijk cultuurmiddel niet altijd worden toegepast voor het onderzoek van zaai-aardappelen, nadat Janse en Spit (*J. Phytopathol.*, 125, 265-268, 1989) hebben aangetoond dat niet alle op die wijze afgezonderde bacteriële soorten volgens deze werkwijze van elkaar konden
 30 worden onderscheiden.
 35

Andere werkwijzen zijn toegepast om een onderscheid te maken tussen de drie bovenvermelde bacteriële soorten, die in staat zijn rotting van aardappelen of een soortgelijke ziekte te veroorzaken

in deze of andere groenten. Deze werkwijzen worden nagegaan door middel van biochemische testen (Cothier en Sivasithamparan (Plant Bacterial Disease, Academic Press; 1983), onderzoek van vetzuren (De Boer en Sasser, Can J. Microbiol., 32, 796-800; 1986) en onderzoek van iso-enzymen (George e.a., Fallen Leaf Lake Conf.; 1987). Maar de grote beperking van deze systemen is dat het nodig is te beschikken over een zuivere cultuur van het micro-organisme. Om deze reden kunnen ze niet worden toegepast als routine-procedure voor de processen van de sanitaire selectie of certificatie van een groot aantal batches van zaai-aardappelen. Op dit ogenblik werken verschillende groepen en wetenschappelijke teams aan de detectie en differentiatie van erwinia's, op basis van de vermenigvuldiging door de polymerase(PCR)-kettingreactie, met of zonder voorafgaand immunologisch vangen (immunocapture), en volgens de werkwijze op basis van het "polymorfisme van de lengte van restrictiefragmenten", maar geen van beide werkwijzen is reeds toegepast op detectie van Eca en de routine-differentiatie bij groenten die economisch belangrijk zijn.

In de landen die zaai-aardappelen produceren (in hoofdzaak in Europa en in Noord-Amerika) worden de serologische technieken toegepast als een systeem voor routine-diagnose voor het onderzoek van monsters. De serologische werkwijzen bieden als voordelen snelheid, lage kosten, eenvoudigheid en de mogelijkheid van de toepassing op grote schaal, niettegenstaande het feit dat toepassing van polyklonale antilichamen van antiserum enkele nadelen heeft. Van de belangrijkste problemen in verband met de toepassing van deze antilichamen, impliceert de gebrekkige specificiteit het frequent optreden van kruisreacties met bacteriële stammen van saprofytische flora, naast de logische variatie van het gedrag van de verschillende antiserum-batches verkregen van verschillende proefdieren of na verschillende immunisaties. Om deze reden is in verschillende landen gekozen voor produktie van monoklonale antilichamen op basis van het werk van Köhler en Milstein, 1987 (Nature, 256, 495-497).

Het enige Eca-specifieke monoklonale antilichaam dat tot dusver op voldoende wijze is gekarakteriseerd is in 1987 verkregen door De Boer en Mc Naughton (Phytopathol., 77, 828.832). Dit monoklonale antilichaam, 4F6 genoemd, is niet in staat Eca te herkennen door ELISA-DAS, en reageert bovendien met een lagere affiniteit dan de polyklonale antilichamen van andere werkwijzen, zoals beschreven door de onderzoekers die de antilichamen verkregen hebben. Bijgevolg zijn de immuno-enzymatische werkwijzen met polyklonale antilichamen tot dusver de enige die worden

toegepast sinds ze in 1978 zijn in gebruik genomen (Vruggink, Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathog. Bact., 307-310), ondanks het feit dat ze specificiteitsproblemen vertonen, omdat de specifieke monoklonale antilichamen met hoge affiniteit voor de Eca-antigenen niet beschikbaar
 5 zijn. Het detectievermogen van een gebruikelijke ELISA-methode met polyklonale antilichamen bedraagt 10^6 - 10^5 cellen per ml (López, e.a., Bull. OEPP, 17, 113-117, 1987), een detectielimiet die niet voldoende laag is om eliminatie van alle batches geïnfecteerde monsters toe te laten. Deze batches zijn in staat rotting van aardappelwortels en cultuurplanten te
 10 veroorzaken.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding wordt gekenmerkt doordat de volgende drie stappen of fasen worden uitgevoerd:

a) onoplosbaar maken van antigenen van het Eca-pathogeen, onder toepassing van monoklonale antilichamen 4G4 of polyklonale
 15 antilichamen, in de kleine vakjes van een microplaat zoals toegepast bij immuno-enzymatische technieken, waarbij de hoeveelheid levende bacteriën die in het monster aanwezig zijn "in situ" wordt vergroot of vermenigvuldigd door toevoeging van een selectief middel (D-PEM) en incubatie gedurende 24-48 uren bij 25-27 °C, en de in het monster aanwezige antigenen
 20 vóór de verrijking en de nieuwe vermenigvuldigde antigenen onoplosbaar worden gemaakt in dezelfde microplaat;

b) aantonen van de reactie door toevoeging van Eca-specifieke monoklonale antilichamen (4G4-IgG₃) gemerkt met biotine-ester en vervolgens met streptoavidine geconjugeerd met een enzym of met
 25 monoklonale antilichamen 4G4 die rechtstreeks zijn gemerkt met een enzym;

c) spectrofotometrisch aflezen bij de golflengte die geschikt is volgens het merkerenzym en de kleur van het eindproduct na hydrolyse van het substraat;

gevolgd door vergelijken van de resultaten volgens de
 30 conventionele werkwijze (zonder verrijking) en de werkwijze met verrijking, waarbij de detectielimieten van de conventionele werkwijze 10^5 - 10^6 CFU/ml bedragen en die van de verrijkte werkwijze 10^3 CFU/ml, en het nemen van beslissingen in functie van de contaminatiegraad, waarbij een dosis lager dan 10^2 CFU/ml als tolereerbaar wordt beschouwd.

35 De werkwijze voor gevoelige en specifieke detectie van Eca is gebaseerd op toepassing van specifieke monoklonale antilichamen met hoge affiniteit (4G4), volgens een gemodificeerde ELISA-DAS-techniek, om versterking en vermenigvuldiging van het aantal bacteriële Eca-cellen

in hetzelfde monstervakje van de microplaat te verkrijgen. De werkwijze voor de diagnose omvat de volgende stappen of fasen die worden uitgevoerd in dezelfde microplaat:

1) Bedekken of sensibiliseren van de bij immuno-
 5 enzymatische technieken gebruikelijke microplaten met 200 μ l van een oplossing van 1 μ g/ml carbonaatbuffer pH 9,8, met immunoglobulinen afkomstig van een antiserum verkregen uit met glutaaraldehyde gefixeerde cellen, of dezelfde dosis van het monoklonale antilichaam 4G4 met isotype IgG₃, K. Na incubatie gedurende 4-5 uren bij 37 °C of gedurende 16 uren
 10 bij 4 °C wordt gewassen met gebufferd fysiologisch water, pH 7,2-7,4 (AFT) (1/2-verdunning in gedestilleerd water) met 0,05 % Tween-20.

2) Toevoegen van 100 μ l van een uit elkaar gerukt of
 aan inweking onderworpen plantaardig monster, of van een extract van de
 huid van aardappelwortels in AFT-buffer, pH 7,2-7,4, waaraan tot 0,2 %
 15 natriumdiëthylthiocarbamaat (DIECA) is toegevoegd. Toevoeging van 100 μ l van het selectieve middel voor erwinia's D-PEM (dubbel polypectaat). Dit middel bestaat uit: MgSO₄, 0,64 g; (NH₄)₂SO₄, 2,16 g en K₂HPO₄, 2,16 g, ieder afzonderlijk verdund in 300 ml water. Vervolgens worden de eerste
 20 twee oplossingen gemengd en wordt de derde oplossing en gedestilleerd water toegevoegd tot een 1 liter. Uiteindelijk wordt 3,4 g natriumpolypec-
 taat (Bullmer), opgelost in 5 ml ethanol, toegevoegd. De pH wordt op 7,2 gebracht en het middel wordt gedurende 15 minuten gesteriliseerd
 bij 120 °C.

De incubatie wordt uitgevoerd onder anaerobe
 25 omstandigheden en gedurende 24 - 48 uren bij 25 °C. Tijdens deze werkwijze wordt selectieve stijging van de in monster aanwezige erwinia's mogelijk gemaakt. Bovendien wordt de Eca-groei bevorderd door de incubatietempera-
 tuur. De Eca-antigenen zullen aan de microplaat gefixeerd blijven door middel van het antilichaam waarmee de plaat tevoren is bedekt of gecoat,
 30 en derhalve zullen ze onoplosbaar blijven.

Indien het wenselijk is een kwantitatieve bepaling uit
 te voeren, kan deze worden uitgevoerd in een parallelle test (zonder
 verrijking) met een incubatie onder aerobe omstandigheden gedurende 16
 uren bij 4 °C.

35 Wasbehandeling zoals bij Stap 1.

3) Toevoegen van monoklonale antilichamen 4G4 (IgG₃,K)
 die specifiek zijn voor Eca, gemerkt met biotine of met een enzym

(alkalisch fosfatase of peroxydase). Incubatie bij 37 °C gedurende 2-3 uren.

Tijdens deze fase zullen de monoklonale antilichamen 4G4 specifiek reageren met de Eca-antigenen en niet met de andere erwinia's die in het monster zouden kunnen voorkomen of met andere bacteriën of saprofytische micro-organismen.

Wasbehandeling zoals bij Stap 1.

4) Toevoegen van het specifieke substraat voor het merkerenzym van de in Stap 3 gebruikte monoklonale antilichamen. In het geval dat gebiotinileerde antilichamen 4G4 werden gebruikt, zou toevoeging van geconjugeerd streptoavidine kunnen worden gemaakt met een van de aangegeven enzymen, met een incubatie gedurende 30 minuten bij 20 - 25 °C en een wasbehandeling, om het substraat nadien toe te voegen.

Wanneer een gekleurd produkt is verkregen, zullen in dezelfde microplaten spectrofotometrische metingen worden uitgevoerd bij 405 nm (voor het alkalische fosfatase) of bij 450 nm (voor het peroxydase), en de resultaten zullen worden vergeleken met interne controles van de microplaat (een oplossing van 10^7 Ecc-cellen/ml) en met de met platen volgens de gebruikelijke ELISA-DAS-techniek (zonder verrijking met D-PEM) verkregen resultaten.

5) Analyse van de resultaten:

A) Indien de conventionele ELISA-DAS-werkwijze positief is (ten minste het dubbele van de optische dichtheid verkregen met de controle van 10^7 CFU/ml Ecc), wordt het bestaan van 10^5 - 10^6 CFU/ml Eca verondersteld. De ELISA-DAS-"verrijking" zal ook positief zijn.

B) Indien de conventionele ELISA-DAS-werkwijze negatief was en de ELISA-DAS-"verrijking" een positief resultaat gaf, wordt verondersteld dat het initiële monster minder dan 10^5 CFU/ml, maar meer dan 10^1 - 10^2 CFU/ml Eca bevatte.

C) Indien de ELISA-DAS-verrijking negatief was, wordt het niet-voorkomen van Eca of het voorkomen van leefbare populaties van minder dan 10 CFU/ml verondersteld, welke populaties lager zijn dan nodig om de ziekte te veroorzaken.

Na de gedetailleerde beschrijving van de specifieke vorm van een toepassing van de werkwijze voor de kwantitatieve detectie en diagnose (identificering) van *Erwinia carotovora* atroseptic subsp., worden de fundamentele aspecten van de werkwijze en enkele voorbeelden

van de kwantitatieve diagnose van Eca in plantaardig materiaal hierna gedetailleerd beschreven:

1) Toepassing van het monoklonale antilichaam 4G4 met isotype IgG₃,K, afkomstig van de fusie van lymfocyten van met Eca-stam 1001 (SCRI) geïmmuniseerde Balb/C-muizen, en myelomacellen, welke oudercellen of hybridoma's in vloeibare stikstof zijn opgeslagen in het Instituut van Valencia voor Agrarisch Onderzoek, Departement Plantbescherming en Biotechnologie, Laboratorium voor Virologie en Immunologie; Postbus 46113 Moncada (Valencia), welk Autonoom Lichaam behoort tot het Algemeen Bureau voor Agrarische Innovatie en Promotie van Landbouw en Visserijen van de Autonome Gemeenschap van Valencia.

2) Toepassing van het Eca-specifieke antilichaam 4G4 na meervoudige tests met betrekking tot de selectiviteit of specificiteit, met vergelijking van verschillende stammen van Eca, Ecc, Ech en andere fytopathogene bacteriën en saprofytische aardappel flora.

3) Toepassing van het monoklonale antilichaam 4G4, gebiotinyld met biotine-ester, in een variabele dosis van 0,05 tot 0,2 µg immunoglobuline per ml AFT-buffer, pH 7,2-7,4, toegevoegd aan 1 % van niet-geïmmuniseerd normaal konijneserum.

4) Toepassing van streptoavidine gemerkt met alkalisch fosfatase of met peroxydase in een dosis van 0,2 eenheden.

5) Bereiding en toepassing van een selectief middel voor erwinia's, D-PEM genoemd, zoals hierboven gedetailleerd beschreven. Toevoeging van eenzelfde volume aan het monster.

6) Bereiding van het monster door toevoeging van uit elkaar gerukte weefsels of van de wortelhuid van aardappels in AFT, toegevoegd aan 0,2 % DIECA, om oxydaties te voorkomen die de gevoelige levende Eca-cellen zouden vernietigen. Incubatie onder anaerobe omstandigheden (5-8 % CO₂), gedurende 24-48 uren, bij een temperatuur van 25-27 °C.

Hierna volgen beschrijvingen en toelichtingen met resultaten van twee voorbeelden van de analyse van batches van aardappelwortels van verschillende variëteiten met commercieel belang en verschillende oorsprong, om de gevoeligheid van de beschreven werkwijze aan te tonen en om het niet-plaatsvinden van interacties met andere micro-organismen van de aardappelcultuur, die volgens de cultuurgebieden in Spanje of in vreemde landen kunnen verschillen, te bevestigen.

9402018

Voorbeeld 1: Analyse van batches van aardappelwortels, kunstmatig geënt met toenemende Eca-doses.

De controles van Ecc en van niet-geënte aardappels geven volgens conventionele ELISA-DAS en volgens ELISA-DAS met verrijking
5 optische dichtheidswaarden van respectievelijk 0,420 en 0,433.

	Batch	Eca-dosis (CFU/ml) ELISA-DAS	Resultaten conventionele ELISA-DAS	Resultaten met verrijking
10	1	$3,0 \times 10^8$	2,101 (+)	2,500 (+)
	2	$6,2 \times 10^7$	1,103 (+)	3,231 (+)
	3	$3,0 \times 10^5$	1,939 (+)	3,181 (+)
	4	$3,0 \times 10^4$	0,731 (+)	2,302 (+)
15	5	$7,0 \times 10^3$	0,490 (-)	2,734 (+)
	6	$3,1 \times 10^2$	0,431 (-)	2,563 (+)
	7	$2,4 \times 10^2$	0,501 (-)	1,983 (+)

Voorbeeld 2: Batches van aardappelwortels, onder
20 natuurlijke omstandigheden in cultuur gebracht.

1) Batches van 50 kg zaaiaardappelen van de volgende variëteiten en afkomst werden onderzocht volgens de werkwijze voor diagnose en kwantitatieve bepaling van de aanwezigheid van Eca. Van elke batch werden 10 aardappelwortels genomen die samen werden onderzocht.

	<u>Variëteit</u>	<u>Oorsprong</u>
25	Concorde	Nederland
	Kondor	Nederland
	Agria	Nederland
	Edzina	Nederland
30	Desirée	Nederland
	Norelia	Frankrijk
	Saturna	Frankrijk
	Floreal	Frankrijk
	Rooster	Ierland
35	Cosmos	Schotland (Verenigd Koninkrijk)
	Red Pontiac	Spanje

2) Een werkwijze zoals gedetailleerd beschreven in de beschrijving van de uitvinding en uitgevoerd onder de hierboven vermelde specifieke omstandigheden.

3) De volgende resultaten, uitgedrukt als optische dichtheid (OD) bij 405 nm, werden verkregen waaruit de Eca-concentratie in CFU/ml wordt afgeleid, en waarbij het gebruik als Eca-vrij gecertificeerde zaai-aardappels wordt aanbevolen of niet.

OD bij 405 nm bij ELISA

	Variëteit	Conventioneel	Met verrijking	CFU/ml	Mogelijke certificatie
10					
	Concorde	1,255	2,930	$> 10^5$	neen
	Kondor	0,320	1,799	$10^5 - 10^2$	
	Agria	0,254	2,824	$10^5 - 10^2$	neen
15	Edzina	0,401	0,394	$< 10^2$	ja
	Desirée	0,266	2,557	$10^5 - 10^2$	neen
	Norelia	0,314	2,444	$10^5 - 10^2$	neen
	Saturna	0,270	0,310	$< 10^2$	ja
	Floreal	1,743	2,882	$> 10^5$	neen
20	Rooster	0,331	2,574	$10^5 - 10^2$	neen
	Cosmos	0,356	2,723	$10^5 - 10^2$	neen
	Negatieve Eca-controle				
	Red Pontiac	0,203	0,221	$< 10^2$	--
	Positieve Eca-controle				
25	Red Pontiac	1,005	0,442	$> 10^5$	--

9402018

CONCLUSIES.

1. Werkwijze voor de detectie, diagnose en kwantitatieve bepaling van *Erwinia carotovora* atroseptic subsp. (Eca), met het kenmerk,
 5 dat de volgende drie stappen of fasen worden uitgevoerd:

a) onoplosbaar maken van antigenen van het Eca-pathogeen, onder toepassing van monoklonale antilichamen 4G4 of polyklonale antilichamen, in de kleine vakjes van een microplaat zoals toegepast bij immuno-enzymatische technieken, waarbij de hoeveelheid levende bacteriën
 10 die in het monster aanwezig zijn "in situ" wordt vergroot of vermenigvuldigd door toevoeging van een selectief middel (D-PEM) en incubatie gedurende 24-48 uren bij 25-27 °C, en de in het monster aanwezige antigenen vóór de verrijking en de nieuwe vermenigvuldigde antigenen onoplosbaar worden gemaakt in dezelfde microplaat;

b) aantonen van de reactie door toevoeging van Eca-specifieke monoklonale antilichamen (4G4-IgG₃) gemerkt met biotine-ester en vervolgens met streptoavidine geconjugeerd met een enzym of met monoklonale antilichamen 4G4 die rechtstreeks zijn gemerkt met een enzym;

c) spectrofotometrisch aflezen bij de golflengte die
 20 geschikt is volgens het merkerenzym en de kleur van het eindproduct na hydrolyse van het substraat;

gevolgd door vergelijken van de resultaten volgens de conventionele werkwijze (zonder verrijking) en de werkwijze met verrijking, waarbij de detectielimieten van de conventionele werkwijze 10^5 - 10^6 CFU/ml
 25 bedragen en die van de verrijkte werkwijze 10^3 CFU/ml, en het nemen van beslissingen in functie van de contaminatiegraad, waarbij een dosis lager dan 10^2 CFU/ml als tolereerbaar wordt beschouwd.

2. Werkwijze voor routinematige detectie en kwantitatieve diagnose van Eca van plantaardige monsters van aardappelwortels of
 30 andere organen of weefsels van dezelfde cultuur of van andere culturen die gevoelig zijn voor de bacteriën die zachte rotting veroorzaken met het kenmerk, dat de werkwijze volgens conclusie 1 wordt toegepast.

3. Toepassing van monoklonaal antilichaam 4G4 (IgG₃,K) IVIA dat specifiek is voor Eca, al of niet gemerkt met biotine, enzymen
 35 en andere stoffen, om te worden gebruikt bij serologische technieken voor detectie en diagnose van deze fytopathogene bacterie.

Octrooiaanvraag nr. 9402018 - Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria

Nieuwe tekst voor conclusie 1, deel (b)

b) aantonen van de reactie door ELISA-DAS of ELISA-DASI
onder toepassing van geconjugeerde of niet-geconjugeerde Eca-specifieke
4G4-monoklonale antilichamen,