

## **IMMUNODIAGNOSTYCZNE METODY WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI BAKTERYJNYCH PATOGENÓW ZIEMNIAKA**

### **IMMUNODIAGNOSTIC METHODS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL PATHOGENS OF POTATO**

mgr inż. Wioleta Stochła, dr inż. Włodzimierz Przewodowski  
dr inż. Agnieszka Przewodowska, mgr inż. Katarzyna Salamońska  
IHAR-PIB, Oddział w Boninie, e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

#### **Streszczenie**

*W Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka IHAR w Boninie opracowano i opatentowano kilka szybkich, prostych testów, m.in. filtracyjny typu Flow – Patent nr PL213858B1, immunofiltracyjny – Patent PL213857B1 i paskowy typu Lateral Flow, do wykrywania kwarantannowych bakterii Cms. Filtracyjny jest przydatny do szybkiej i specyficznej identyfikacji kultur jednorodnych komórek bakteryjnych. Wykorzystano w nim porowatą błonę filtracyjną, zatrzymującą na swojej powierzchni komórki bakteryjne. Komórki bakteryjne są wybarwiane złotem koloidalnym za pomocą poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych na bakterie Cms, znakowanych nanocząsteczkami złota koloidalnego.*

Zaletą jest czułość, odpowiadająca czułości ELISA, i możliwość bezpośredniej obserwacji wyniku gołym okiem. Opracowane rozwiązania umożliwiają zminimalizowanie kosztów testu i zbadanie wielu prób jednocześnie w zaledwie kilkanaście minut. Test immunofiltrycyjny to połączenie immunofiltracji i immunofluorescencji pośredniej, może być stosowany w przypadku silnie zanieczyszczonych prób pozyskiwanych ze środowiska naturalnego. Test paskowy, odpowiadający czułością ELISA i IFAS, może być wykonywany poza laboratorium, nie wymaga skomplikowanego zaplecza ani doświadczenia badawczego i pozwala na uzyskanie specyficznego wyniku w przeciągu kilku minut.

**Słowa kluczowe:** diagnostyka, metody immunologiczne, patogeny bakteryjne, ziemniak

### Abstract

Simple tests to detect quarantine bacteria *Cms*, such as flow-type filter test - Patent No. PL213858B1, immuno-filter test - Patent PL213857B1, and lateral flow test, were developed and patented in the Department of Potato Protection and Seed Science in Bonin. The filter test is useful for rapid and specific identification of homogeneous cultures of bacterial cells. In the first step, the cells are captured on the surface of the porous filter. Next, the cells are stained with *Cms*-specific, rabbit polyclonal antibodies, labeled with colloidal gold. The advantages of this test are the ELISA-like sensitivity and the visual detection with the naked eye. Therefore, developed method minimizes the cost and facilitates high throughput detection of *Cms* in a few minutes. Another approach, immuno-filter test, combines immunofiltration and indirect immunofluorescence. Therefore, it can be used for *Cms* detection in the environmental samples, heavily contaminated with natural microorganisms. Finally, lateral flow test, also corresponding to the sensitivity of ELISA and IFAS, can be performed outside the laboratory, does not require complex facilities or research experience, and allows achieving a specific result in just a few minutes.

**Keywords:** bacterial pathogens, diagnostics, immunological methods, potato

**B**ulwy ziemniaka pozostają przez cały okres wegetacji w stałym kontakcie z glebą zasiedloną przez miliony mikroorganizmów, są więc narażone na różnego rodzaju infekcje. Bardzo duże znaczenie mają zarówno choroby bakteryjne wywołane przez organizmy kwarantannowe, jak i bakterie niepodlegające obowiązkowi zwalczania z urzędu. Spośród tych pierwszych jako istotne w uprawie ziemniaka wymienia się bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* odpowiedzialne za bakteriozę pierścieniową ziemniaka oraz bakterie *Ralstonia solanacearum*, sprawcę choroby zwanej potocznie śluzakiem. Do jednych z najczęściej wymienianych niekwarantannowych bakterii powodujących poważne straty gospodarcze należą bakterie wcześniej klasyfikowane do rodzaju *Erwinia*, natomiast obecnie do rodzajów *Pectobacterium* (*Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovora*, *P. wasabiae*) oraz *Dickeya* (*Dickeya dianthicola* i *D. solani*). Wymienione bakterie powodują choroby licznych gatunków roślin uprawnych i ozdobnych, a w przypadku ziemniaka są czynnikiem sprawczym takich chorób jak czarna nóżka oraz mokra zgnilizna (Waleron i in. 2014, Potrykus i in. 2016).

W diagnostyce bakteryjnych chorób ziemniaka wykorzystuje się wiele różnych metod. Jednymi z najbardziej popularnych, obok licznych metod molekularnych i biologicznych, są metody serologiczne (immunologiczne). Są one stosowane do identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka, wykorzystują przeciwciała (immunoglobuliny) skierowane przeciwko odpowiednim bakteriom chorobotwórczym. Pomimo tego, że techniki diagnostyczne z zastosowaniem przeciwciał zostały wprowadzone do wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka w latach 70. ubiegłego stulecia, nadal cieszą się dużą popularnością w diagnostyce tych chorób ze względu na stosunkowo niską cenę, krótki czas wykonania dużej liczby testów i stosunkowo wysoką czułość (Przewodowski, Barny 2010).

### Zasada działania metod immunologicznych

Cechą wspólną immunologicznych metod diagnostycznych jest wykorzystanie oddziaływania przeciwciał z odpowiadającymi im antygenami i tworzenie odpowiednich kompleksów antygen – przeciwciało (Mierzwa 1985). Przeciwciała jako cząstki biologiczne mają za zadanie ochronę organizmów żywych, zwykle zwierzęcych/ludzkich, przed

licznymi chorobami. Właściwość tę wykorzystano w diagnostyce immunologicznej do opracowania testów umożliwiających wykrywanie patogenów wywołujących określone choroby za pomocą odpowiednio specyficznych, rozpoznających te patogeny przeciwciał.

Opracowanie testu immunologicznego rozpoczyna się zazwyczaj od identyfikacji i opracowania specyficznego dla danej bakterii antygeny. Antygenem (elementem rozpoznawanym przez przeciwciała) mogą być zarówno całe komórki bakteryjne, jak i ich fragmenty lub wyizolowane z nich białka, wielocukry czy też inne substancje. Odpowiednio przygotowany antygen podaje się dożylnie zwierzęciu.

Czułość i specyficzność testów serologicznych jest ściśle związana z jakością przeciwciał użytych w badaniu. W diagnostyce serologicznej wykorzystuje się dwa rodzaje przeciwciał: mono- i poliklonalne.

Przeciwciałami monoklonalnymi określa się zwykle zbiór przeciwciał o jednakowej swoistości i powinowactwie względem danego antygeny (ciała obcego lub części substancji białkowej wywołującej produkcję przeciwciał w organizmie). Są one wytwarzane przez komórki stanowiące jeden klon, czyli wywodzące się od pojedynczej komórki. Cechą wyróżniającą je od przeciwciał poliklonalnych jest ich jednakowa swoistość, siła wiązania z antygenem oraz homogeniczność cząsteczek, z którymi reagują (Skowicki, Lipiński 2016).

Mechanizm powstawania przeciwciał monoklonalnych odkryli w 1975 r. Koehler i Milstein, za co w 1984 r. otrzymali Nagrodę Nobla. Opracowali oni również sposób wytwarzania przeciwciał monoklonalnych. Pierwszy etap polega na połączeniu (fuzji) mysich komórek myeloma z mysimi limfocytami B, wytwarzającymi specyficzne przeciwciała. Na kolejnym etapie dochodzi do fuzji komórek plazmatycznych z komórkami nowotworowymi szpiczaka, selekcji komórek oraz hodowli wybranego klonu wytwarzającego żądane przeciwciała. Dzięki tej metodzie można otrzymać stabilne linie komórek dzielących się nieograniczoną ilość razy, wytwarzających jednocześnie wysoce specyficzne przeciwciała monoklonalne (Zieliński, Płucienniczak 2009).

Przeciwciała poliklonalne uzyskiwane są zazwyczaj w obecności więcej niż jednego klonu komórek, przez co wiążą różne epitopy (fragmenty antygeny wiążące się z przeciwciałem) i wykazują różne powinowactwo względem tego samego antygeny. Są one zazwyczaj mniej specyficzne, ale bardziej czułe w porównaniu z przeciwciałami monoklonalnymi oraz łatwiejsze i tańsze do otrzymania (Stochła, Przewodowski 2014).

Sam proces powstawania przeciwciał poliklonalnych następuje na drodze odpowiedzi immunologicznej po zaszczepieniu zwierzęcia (np. królika) przygotowaną wcześniej mieszaniną immunizacyjną z antygenem i pojawieniu się po pewnym czasie przeciwciał w organizmie (we krwi) zwierzęcia. Czas potrzebny do uzyskania wymaganego stężenia i przeciwciał wysokiej jakości jest uzależniony od właściwości antygeny oraz cech osobniczych zwierzęcia.

Po wykonaniu pełnej serii szczepień sprawdza się, na ile wytworzone przeciwciała są przydatne do opracowania przyszłego testu diagnostycznego. W tym celu izoluje się przeciwciała z surowicy krwi, oddzielając je od pozostałych białek oraz komponentów i substancji znajdujących się w krwi zwierzęcia. Chcąc polepszyć właściwości (ilość i jakość) wytworzonych przeciwciał, wraz z antygenem podczas immunizacji podaje się substancje zwane adiuwantami, których zadaniem jest zwiększenie skuteczności szczepienia poprzez wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej immunizowanego zwierzęcia (Zabłocki 1970).

### Znakowanie przeciwciał a sposób wykrywania

Aby opracować odpowiedni test immunologiczny, konieczne jest zastosowanie odpowiednich cząsteczek – znaczników (markerów), które po połączeniu z przeciwciałem w tzw. koniugaty posłużą następnie do specyficznego wykrywania bakterii patogennych.

W zależności od rodzaju użytego znacznika istnieją różne metody immunologiczne oraz związane z nimi sposoby wykrywania obecności wykrywanych komórek bakteryjnych. I tak przykładowo wyróżniamy **radioimmunoanalizę** (ang. Radioimmunoassay – RIA), w której jako markery wykorzystywane są radioizotopy. Kolejny przykład to **immu-**

**noanaliza enzymatyczna** (ang. Enzyme Immunoassay – EIA), w której przeciwciała znakowane są enzymem. Antygen jest przyłączany do znakowanego enzymem przeciwciała. Po podaniu substratu dla enzymu następuje reakcja enzymatyczna dająca barwny produkt. Reakcja barwna świadczy o obecności mikroorganizmu produkującego antygen oddziałujący z przeciwciałem. Intensywność barwy otrzymanej w wyniku reakcji enzymatycznej może posłużyć nie tylko do oznaczeń jakościowych, ale także ilościowych.

Często stosowaną metodą jest **immunoanaliza fluorescencyjna** (ang. Fluorescence Immunoanalysis – FIA), w której znacznikiem jest specyficzny barwnik fluorescencyjny (Oellerich 1980, Żabicka 2010, Namieśnik 2003). Metody radioimmunologiczne, pomimo ich wysokiej czułości i specyficzności, stosowane są rzadko, z uwagi na problemy związane ze stosowaniem radioaktywnych izotopów (krótki czas aktywności) oraz wysoki koszt wyposażenia analitycznego (Namieśnik 2003). W laboratoriach diagnostycznych najczęściej stosowane są testy immunofluorescencji pośredniej IFAS oraz test immunoenzymatyczny ELISA (Waleron i in. 2010).

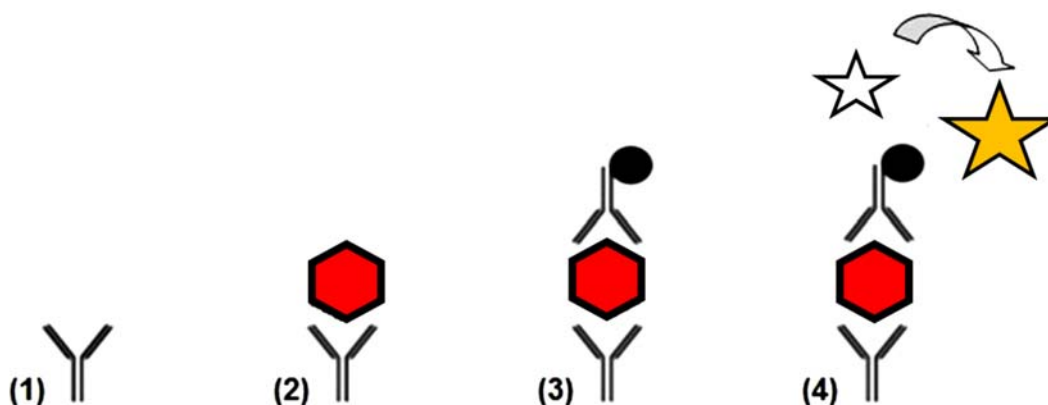
### Metody immunologiczne w diagnostyce bakterii ziemniaka

Jednym z najbardziej popularnych testów diagnostycznych służących do wykrywania i identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka jest **test pośredniej immunofluorescencji – IFAS** (ang. Indirect Fluorescent Antibody Staining). Polega on na unieruchamianiu bakterii na szkiełku mikroskopowym, wykrywaniu komórek bakteryjnych przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko tym bakteriom i na kolejnym etapie – wykrywaniu przyczepionych do bakterii przeciwciał za pomocą innych, drugorzędowych przeciwciał znakowanych dodatkowo barwnikiem fluorescencyjnym. Barwnik ten, wzbudzony światłem UV, emituje światło w zakresie widzialnym, co z kolei umożliwia bezpośrednią obserwację bakterii za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Przewodowski, Barnyk 2010). Pozytywne wyniki testu IFAS wymagają jednak potwier-

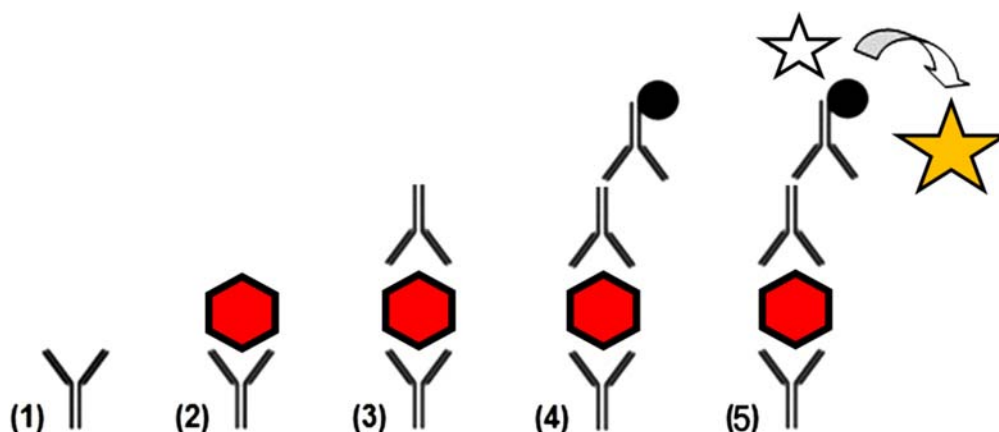
dzenia testami molekularnym PCR oraz biologicznym na obojętnie. Wadą drugiej z metod jest jej czasochłonność. Test może trwać wówczas łącznie nawet 40 dni (Brzozowski 2007).

Częstą alternatywą dla testu immunofluorescencyjnego jest **immunoenzymatyczny test ELISA** (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Jego zaletą jest możliwość badania dużej liczby prób (Alvarez 2004). Test ELISA może być pośredni lub bezpośredni. Pośredni, najczęściej używany w badaniach naukowych, wykorzystuje dwa rodzaje przeciwciał z dwóch gatunków zwierząt (przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe). W teście bezpośrednim antygen jest wykrywany za pomocą tylko jednego przeciwciała – od jednego gatunku zwierzęcia. (Zacharzewska, Treder 2014). W metodzie tej, i jej modyfikacjach, przeciwciała są unieruchamiane na powierzchni stałego nośnika, którym może być np. mikroplątka, kulki szklane lub kulki z tworzyw sztucznych (Namieśnik 2003). Po usunięciu niezwiązanych przeciwciał nakłada się próbę z antygenem (np. bakterie) i inkubuje przez określony czas w stałej, ściśle określonej temperaturze, aby umożliwić utworzenie kompleksu antygen – przeciwciało.

Kolejnym elementem jest wprowadzenie roztworu przeciwciał, połączonych z odpowiednim enzymem (koniugat). W metodzie pośredniej wprowadza się najpierw przeciwciała rozpoznające antygen (przeciwciała pierwszorzędowe), a następnie przeciwciała z innego gatunku zwierzęcia znakowane enzymem, rozpoznające przeciwciała łączące się z antygenem (przeciwciała drugorzędowe). Najczęściej stosowane enzymy to fosfataza alkaliczna, peroksydaza chrzanowa oraz oksydaza glukozowa. Ostatnia faza to dodanie substratu dla enzymu, który w momencie zajścia reakcji zostaje przetworzony na barwny produkt, np. fosfataza alkaliczna z fosforanem p-nitrofenolu jako substratem daje żółtą barwę. ELISA jest więc metodą kolorymetryczną. Zmiana barwy badanej próby mierzona jest spektrofotometrycznie, natomiast intensywność barwy w odniesieniu do próby zerowej (negatywnej) świadczy o ilości antygeny wykrytego w próbce.



Rys. 1. Schemat testu DAS-ELISA. (1) Unieruchamianie specyficznych przeciwciał na podłożu, (2) Przyłączenie antygeny znajdującego się w badanej próbce, (3) Przyłączenie przeciwciał pierwszorzędowych z enzymem (koniugat), (4) Dodanie substratu i jego zamiana przez enzym na barwny produkt reakcji



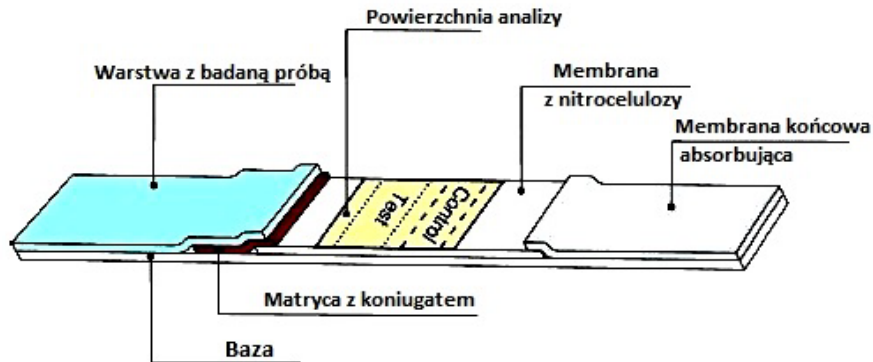
Rys. 2. Schemat testu TAS-ELISA. (1) Unieruchamianie specyficznych przeciwciał na podłożu, (2) Przyłączenie antygeny znajdującego się w badanej próbce, (3) Przyłączenie przeciwciał pierwszorzędowych, (4) Przyłączenie przeciwciał drugorzędowych z enzymem (koniugat), (5) Dodanie substratu i jego zamiana przez enzym na barwny produkt reakcji

Do wykrywania i identyfikacji patogennych bakterii roślinnych (w tym bakterii ziemniaka) najczęściej wykorzystywany jest pośredni **test DAS-ELISA** (ang. Double Antibody Sandwich ELISA) – rys. 1 lub **TAS-ELISA** (ang. Triple Antibody Sandwich ELISA) (Alvarez 2004) – rys. 2.

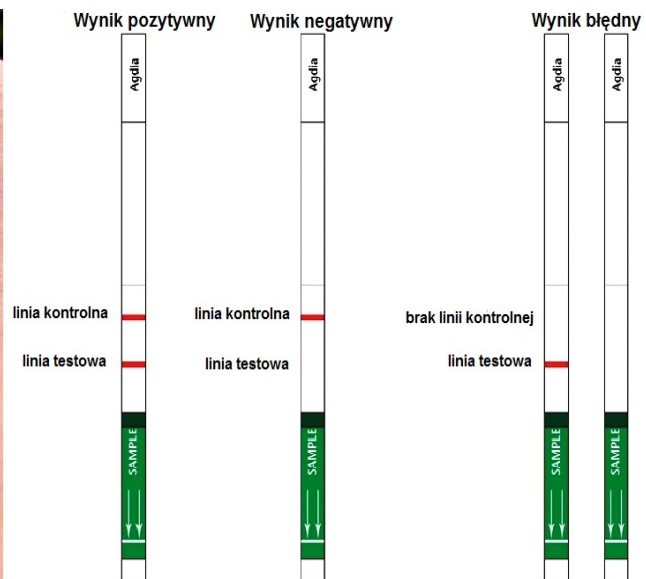
Rozwój nowych technologii, opracowanie nowych materiałów i znaczników spowodowały, że spośród metod immunologicznych coraz częściej doceniane ze względu na szybkość i łatwość użycia są **immuno chromatograficzne testy paskowe typu Lateral Flow** – rys. 3 i 4). Testy te pozwalają na wykrywanie jednej lub więcej bakterii wyizolowanych z ekstraktu na tym samym pasku i

mogą być stosowane nie tylko w laboratorium, lecz również w warunkach polowych (Przewodowski, Barnyk 2010).

Efektom badań prowadzonych w Zakładzie Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie jest opracowanie i opatentowanie kilku szybkich, a jednocześnie prostych testów immunologicznych, m.in. **testu filtracyjnego typu Flow-Through** (Przewodowski, Barnyk 2009; Przewodowski 2013 – Patent nr PL213858B1), **testu immunofiltracyjnego** (Przewodowski 2013 – Patent PL213857B1) oraz **testu paskowego typu Lateral Flow** (Przewodowski, Przewodowska 2015) do wykrywania kwarantannowych bakterii *C. m. subsp. sepedonicus*.



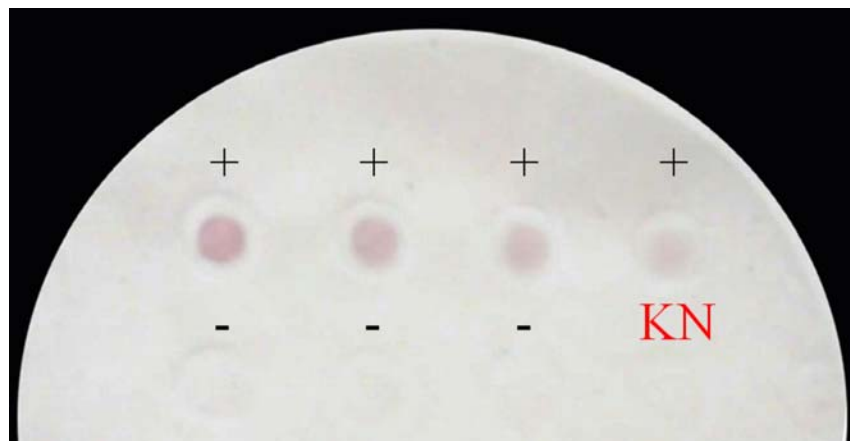
Rys. 3. Schemat konstrukcji testu typu Lateral Flow. Źródło: Safenkova i in. 2016



Rys. 4. Testy paskowe do identyfikacji bakteryjnych patogenów ziemniaka dostępne w sprzedaży. Źródło: Mater. inf. Agdia Plant Pathogen Diagnostics [http://www.atzlab.com/pdf/ImmunoStrip\\_Phyto\\_Diagnostics\\_Lifetech\\_India.pdf](http://www.atzlab.com/pdf/ImmunoStrip_Phyto_Diagnostics_Lifetech_India.pdf)

**Test filtracyjny** cechuje się dużą przydatnością w szybkiej i specyficznej identyfikacji kultur jednorodnych komórek bakteryjnych. Wykorzystano w nim porowatą błonę filtracyjną, zatrzymującą na swojej powierzchni komórki bakteryjne. Test polega na wybarwianiu komórek bakteryjnych złotym koloidalnym za pomocą poliklonalnych przeciwciał króliczych skierowanych na bakterie Cms, znakowanych nanocząsteczkami złota koloidalnego. Przeciwciała anti-Cms skoniugowane (połączone) z koloidem złota specyficznym rozpoznają komórki bakteryjne, tworząc na ich powierzchni barwną otoczkę. Dzięki wykorzystaniu membran o wielkości

porów mniejszej niż komórki bakterii w krótkim czasie (1-2 min) dochodzi do koncentracji bakterii z dużej objętości zawiesiny na małej powierzchni membrany. Zaletą testu jest jego czułość, odpowiadająca czułości metody ELISA, oraz możliwość bezpośredniej obserwacji uzyskanego wyniku tzw. gołym okiem (nieuzbrojonym) – rys. 5. Opracowane rozwiązania pozwalają na zminimalizowanie kosztów testu oraz badanie wielu prób jednocześnie w zaledwie kilkanaście minut, bez konieczności stosowania dodatkowej analizy mikroskopowej (Przewodowski, Barnyk 2009; Przewodowski 2013 – Patent nr PL 213858 B1).



Rys. 5. Widok barwnych punktów na powierzchni membrany ocenianych nieuzbrojonym, tzw. gołym okiem. Wynik dodatni oznaczony „+” świadczy o obecności szukanych komórek bakteryjnych w badanej próbie. Brak barwnych punktów, oznaczonych „-”, świadczy o wyniku negatywnym testu. Jako kontrolę zastosowano zawiesinę bez bakterii traktowaną uprzednio koniugatem złota z przeciwciałami anti-Cms. Źródło: Przewodowski, Barnyk 2009

Kolejną opracowaną metoda to **test immunofiltracyjny** będący połączeniem immunofiltracji oraz metody immunofluorescencji pośredniej, który z powodzeniem może być stosowany w przypadku silnie zanieczyszczonych prób pozyskiwanych ze środowiska naturalnego, jak tkanki roślinne, w których znajduje się wiele zanieczyszczeń chemicznych, biologicznych i mikrobiologicznych. W metodzie tej wykorzystano wysokoporowate błony filtracyjne, na które punktowo naniesiono przeciwciała skierowane na komórki bakterii Cms (Przewodowski 2013). Filtracja ekstraktu z bulw ziemniaka przez taką błonę pozwala wyłapać komórki bakterii Cms przy jednoczesnym usunięciu innych bakterii oraz znajdujących się w ekstrakcie zanieczyszczeń. Wyłapane bakterie znakuje się następnie za pomocą przeciwciał anti-Cms połączonych z barwnikiem fluorescencyjnym i obserwuje pod mikroskopem. Błonę z wyłapanymi bakteriami można też umieścić na półselektywnej pożywce i w ten sposób uzyskać czyste szczepy bakterii Cms. Nowy test pomimo swojej prostoty jest wysoce specyficzny, szybki i funkcjonalny (Przewodowski, Barnyk 2010; Przewodowski 2013 – Patent PL 213857 B1).

**Test paskowy Lateral Flow**, odpowiadający czułością metodom ELISA i IFAS, może być wykonywany poza laboratorium, nie wymaga skomplikowanego zaplecza ani doświadczenia badawczego i pozwala na uzyskanie specyficznego wyniku w przecią-

gu zaledwie kilku minut. Jego czułość odpowiada czułości testu IFAS, ale w przeciwieństwie do testu immunofluorescencyjnego czułość nie zależy tu od stopnia zanieczyszczenia badanej próby (Przewodowski, Przewodowska 2015).

Mimo rozwoju coraz to nowszych rozwiązań diagnostycznych oraz technologicznych testy oparte na metodach immunologicznych są wciąż szeroko stosowane zarówno w celach naukowych, jak i przemysłowych. Są ponadto narzędziem kontroli stosowanym przez laboratoria Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Roślin i Nasiennictwa.

#### Literatura

1. Alvarez A. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. – *Ann. Rev. Phytopath.* 42: 339-366;
2. Brzozowski S. Metody wykrywania i identyfikacji *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka – stan obecny i perspektywy na przyszłość. – *Ziemn. Pol.* 1: 25-30;
3. Mierzwa Z. 1985. Serologia w badaniach chorób wirusowych ziemniaka. [W:] *Biologia ziemniaka*. Red. nauk. W. Gabriel. Wyd. Nauk. Warszawa: 332-344;
4. Namieśnik J. 2003. Trendy w analityce i monitoringu środowiskowym. [W:] *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. Rozdz. 1. Red. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpiniek P. Wyd. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEFAM), Wyd. Chemiczny Polit. Gdańska: 1-32;
5. Oellerich M. 1980. *Enzyme Immunoassays in Clinical Chemistry: Present Status*

- and Trends. – J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18: 197-208; **6. Potrykus M., Golanowska M., Śledź W., Żołędowska S., Motyka A., Kołodziejska A, Butrymowicz J., Łojkowska E. 2016.** Biodiversity of *Dickeya* spp. Isolated from Potato Plants and Water Sources in Temperate Climate. – Plant Dis. 100. 2: 408-417; **7. Przewodowski W. 2013.** Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* z wykorzystaniem membran poliwęglanowych zawierających immobilizowane przeciwciała. Patent polski, PL 213857 B1 18 marca 2013; **8. Przewodowski W. 2013.** Sposób wykrywania obecności bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w analizowanej próbce. Patent polski, PL 213858 B1, 18 marca 2013; **9. Przewodowski W., Barnyk A. 2009.** Szybki test do identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. – Post. Ochr. Rośl. 49(2): 696-700; **10. Przewodowski W., Barnyk A. 2010.** Nowe metody diagnostyczne do wykrywania fitopatogennych bakterii ziemniaka. – Ziemn. Pol. 1: 33-38; **11. Przewodowski W., Przewodowska A. 2015.** New colloidal gold lateral flow strip for rapid detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. [In:] 4th Intern. Conf. on Bio-Sensing Technology, May 10-13, Lisbon, Portugal: Book Abstr.: P2.061; **12. Safenkova I. V., Pankratova G. K., Zaitsev I. A., Yuri Y. Y., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. 2016.** Multiarray on a test strip (MATS): rapid multiplex immunodetection of priori ty potato pathogens. – Anal. Bioanal. Chem. 408: 6009-6017; **13. Skowicki M., Lipiński T. 2016.** Rozwój metod otrzymywania komórek wytwarzających przeciwciała monoklonalne. – Post. Hig. Med. Dośw. 70: 367-379; **14. Stochła W., Przewodowski W. 2014.** Wybrane metody otrzymywania przeciwciał do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. – Ziemn. Pol. 3: 46-49; **15. Waleron M., Skrzypkowska M., Waleron K., Łojkowska E. 2010.** Epidemiologia wybranych podgatunków bakterii *Clavibacter michiganensis* oraz metody ich identyfikacji i zwalczania. – Post. Mikrobiol. 49, 4: 269-284; **16. Zabłocki B. 1970.** Podstawy współczesnej immunologii. PWN Warszawa; **17. Zacharzewska B., Treder K. 2014.** Test ELISA i jego modyfikacje. – Ziemn. Pol. 1: 14-16; **18. Zieliński M., Plucienniczak A. 2009.** Przeciwciała monoklonalne – zastosowanie w medycynie. Biotechnologia 2(85): 113-122; **19. Żabicka D. 2010.** Metody detekcji i identyfikacji bakterii. Narodowy Instytut Leków. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej. Warszawa. [http://ichf.edu.pl/r\\_act/act\\_pl/fund\\_strukt/KSP/zabicka.pdf](http://ichf.edu.pl/r_act/act_pl/fund_strukt/KSP/zabicka.pdf)