اعتمدت لجنة المعايير بالنيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية هذا بروتوكول التشخيص في أغسطس/آب 2016.
هذا الملحق جزء مُلزم من المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27.

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27

بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح

بروتوكول التشخيص 13: *بكتيريا أميلوفورا الإيروينية* ***Erwinia amylovora***

اعتُمد في 2016؛ نُشر في 2018

بيان المحتويات

-1 معلومات عن الآفة ... 3
-2 المعلومات التصنيفية ... 3
-3 الكشف ... 4
1-3 الكشف في النباتات الحاملة للأعراض 4
1-1-3 الأعراض 4
2-1-3 أخذ العينات وإعدادها 5
3-1-3 العزل 6
1-3-1-3 العزل من عينات حاملة للأعراض 6
2-3-1-3 التخصيب-العزل 7
4-1-3 الكشف المصلي 8
1-4-1-3 التخصيب بواسطة فحص DASI-ELISA 8
2-4-1-3 دمغ الأنسجة المباشر – إليزا 9
3-4-1-3 التألق المناعي 9
4-4-1-3 المقايسة المناعية بالانسياب الجانبي 10
5-1-3 الكشف الجزيئي 10
1-5-1-3 الشواهد للاختبارات الجزيئية 10
3-5-1-3 تضخيم الحمض النووي بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز 12
4-5-1-3 اعتبارات عامة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز 15
5-5-1-3 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي 16
6-5-1-3 تفسير النتائج من التفاعل المتسلسل للبوليميراز 17
7-5-1-3 التضخيم المتساوي الحرارة بوساطة الحلقة LAMP 18
2-3 الكشف في النباتات غير الحاملة للأعراض 19
1-2-3 أخذ العينات وتجهيزها 19
2-2-3 اختبارات المسح 20
-4 تحديد الهوية ... 21
1-4 تحديد الهوية التغذوي والأنزيمي 21
1-1-4 تحديد الهوية عن طريق الخصائص الكيميائية-الحيوية 22
1-1-1-4 تحديد الخصائص التغذوية والأنزيمية 22
2-1-1-4 التحديد المؤتمت للهوية 23

3-1-1-4 تحديد الخصائص عن طريق الأحماض الدهنية 23
2-4 التحديد المصلي للهوية 23
1-2-4 التلاصق Agglutination 23
2-2-4 التألق المناعي 23
3-2-4 الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا) 23
4-2-4 المقايسة المناعية بالانسياب الجانبي 24
3-4 تحديد الهوية بالطرق الجزيئية 24
1-3-4 التفاعل المتسلسل للبوليميراز 24
2-3-4 الماكرو- اقتطاع بالرحلان الكهربائي الهلامي في حقل نبضي pulsed field gel electrophoresis 25
4-4 تقنيات القدرة الإمراضية 25
-5 السجلات 26
-6 جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية 26
-7 شكر وتقدير 26
-8 المراجع 27
-9 الأشكال 31

1- معلومات عن الآفة

تعتبر بكتيريا *أميلوفورا الإيروينية* *Erwinia amylovora* العامل المسبب لمرض اللفحة النارية الذي يؤثر في معظم الأنواع من فصيلة التفاحيات Maloideae لعائلة الورديات Rosaceae (Spiraeoideae). وهي أول بكتيريا وصفت كعامل مسبب للأمراض النباتية (Burrill، 1883). تعد أمريكا الشمالية الموطن الأصلي لهذه الآفة، و قد اكتشفت خارج أمريكا الشمالية أول مرة في نيوزيلندا عام 1920. وورد ذكر مرض اللفحة النارية في إنجلترا عام 1957، ومنذ ذلك الحين اكتشفت هذه البكتيريا في معظم مناطق أوروبا التي تُزرع فيها العوائل المُعرّضة للإصابة بها. وهي توجد الآن في أكثر من 40 بلداً، ولم يبلّغ عن أي ظهور لها في أمريكا الجنوبية ومعظم بلدان أفريقيا وآسيا (باستثناء البلدان المحيطة بالبحر الأبيض المتوسط)، وقد استؤصلت في أستراليا بعد إبلاغ واحد عن اكتشافها هناك (van der Zwet، 2004). وتشكل هذه البكتريا خطراً على صناعة الفاكهة التفاحية في جميع هذه البلدان (Bonn وvan der Zwet، 2004). ويمكن الاطلاع على تفاصيل توزيعها الجغرافي في نظام استرجاع البيانات في مركز الحجر الصحي التابع لمنظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط، بلا تاريخ).

أما أهم النباتات العائلة لهذه البكتريا من الناحيتين الاقتصادية والوبائية على حد سواء، فهي أجناس كاينوميليس Chaenomeles وشبيهات الزعرور *Cotoneaster* والزعرور *Crataegus* والسفرجليات *Cydonia* والأكدنيا *Eriobotrya* والتفاح *Malus* *والزعرور البستاني* *Mespilus* وشوك النار *Pyracantha* *و*الكمثرى *Pyrus* والغبيراء *Sorbus* وسترانفيزا *Stranvaesia* (Bradbury، 1986). وتختلف سلالات هذه البكتيريا المعزولة من العليق (التوت الشوكي) *Rubus* sp. في الولايات المتحدة، عن السلالات من عوائل أخرى (Starr وآخرون، 1951؛ Powney وآخرون، 2011ب).

ويرجّح أنّ مرض اللفحة النارية هو المرض البكتيري الأكثر خطورة الذي يصيب أنواع الكمثرى الشائعة *Pyrus communis* وأصناف التفاح المزروع *Malus domestica* في العديد من البلدان. تظهر الأوبئة الناتجة عن هذا المرض بشكل متفرق، وهي تعتمد على عدد من العوامل، بما في ذلك الظروف البيئية الملائمة ووجود مستوى كافٍ من اللقاح في البستان ومدى قابلية العائل للتأثر بالآفة. وينتشر المرض بسهولة عن طريق الطيور أو الحشرات أو المطر أو الرياح (Thomson، 2000). ويتبع تطور أعراضه التطور الموسمي لنمو النبات العائل، فهو يبدأ في فصل الربيع مع إنتاج اللقاح الأولي من البكتريا البائتة في التقرحات خلال فصل الشتاء (Thomson، 2000). التي تتسبب بإصابة الزهرات ويستمر في الصيف مصيباً البراعم والثمار وينتهي في فصل الشتاء بتطور التقرحات طوال فترة سبات العائل (van der Zwet وBeer، 1995؛ Thomson، 2000).

2- المعلومات التصنيفية

الاسم: *Erwinia amylovora* (Burrill, 1883) Winslow *et al.*، 1920

المرادفات: *Micrococcus amylovorus* Burrill, 1883, *Bacillus amylovorus* (Burrill, 1883) Trevisan, 1889, "*Bacterium amylovorus*" [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897, *Erwinia amylovora* f.sp. *rubi* (Starr *et al.*, 1951)

الوضع التصنيفي: Proteobacteria، التقسيم الفرعي Y، Enterobacteriales ، Enterobacteriaceae

الاسم الشائع: اللفحة النارية (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط، 2013)

3- الكشف

يمكن تشخيص مرض اللفحة النارية باستخدام العزل والاختبارات المصلية والجزيئية. ويوصى بالفحوص المبينة أدناه بعد أن تكون قد قُيّمت في اختبار أو أكثر من اختبارات الحلقة التالية: في عام 2003، في إطار مشروع "بروتوكولات التشخيص للكائنات الحية الضارة للنباتات" (DIAGPRO) الذي شمل عشرة مختبرات (López وآخرون، 2006)؛ وفي عام 2009، في إطار مشروع أوروبي لـ"تنسيق بحوث الصحة النباتية" شمل خمسة مختبرات (Dreo وآخرون، 2009)؛ وفي عام 2010، في 14 مختبراً من جميع أنحاء العالم (López وآخرون، 2010). والاختبارات المشار إليها في الشكلين 1 و2 هي متطلبات الحد الأدنى للتشخيص، إلا أنه قد يلزم إجراء اختبارات إضافية قد تطلبها المنظمة القطرية لوقاية النباتات، خاصة بالنسبة لأول إبلاغ عن الآفة في بلد ما. مثلاً، قد تيسّر الاختبارات المصلية التشخيص الظنّي للمواد النباتية الحاملة للأعراض استناداً إلى الكشف عن بروتين محدد، ومع ذلك، ينبغي أن يستخدم للكشف اختبار إضافي يستند إلى مبدأ بيولوجي مختلف. وينبغي للاختبارات جميعها أن تتضمن شواهد إيجابية وشواهد سلبية.

يرد في بروتوكول التشخيص هذا وصف للطرق (بما في ذلك الإشارة إلى الأسماء التجارية) كما هي منشورة، إذ أن هذه الطرق حددت المستوى الأصلي للحساسية والتخصص و/أو القابلية للتكرار. ولا يعني استخدام أسماء كواشف كيمائية أو أجهزة في بروتوكولات التشخيص المصادقة عليها ضمناً ولا استبعاد بعض آخر قد يكون مناسباً أيضاً. ويمكن تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لتتوافق مع معايير المختبرات المفردة، شريطة أن يتم التحقق من صحتها تحققاً كافيا.

3-1 الكشف في النباتات الحاملة للأعراض

يُشار إلى اختبارات المسح الموصى بها في المخطط الانسيابي الوارد في الشكل 1.

3-1-1 الأعراض

تكون أعراض اللفحة النارية على العوائل الأكثر شيوعاً مثل *P. communis* (الكمثرى) و *M. domestica* (التفاح) و*Cydonia* spp. (السفرجل) و *Eriobotrya Japonica* (أكدنيا) و *Cotoneaster* spp. (شبيهات الزعرور) و *Pyracantha* spp. (شوك النار) و *Crataegus* spp. (الزعرور)، متشابهةً ويمكن تمييزها بسهولة. أما اسم المرض نفسه فيصف سماته الرئيسية أي: ظهور أغصان وزهرات وأوراق منخورة المظهر يطغى عليها اللون البني كما لو أنها أحرقت بالنار. والأعراض المعتادة هي أوراق لونها بني إلى أسود على الأغصان المصابة وإنتاج إفرازات وانحناء الأغصان الطرفية على هيئة "عصى الراعي". وينتج المرض، تبعاً للجزء المصاب من النبات، لفحات على الزهرات أو البراعم أو الغصينات أو الأوراق أو الثمار أو الأطراف أو الجذوع أو القمم أو الجذور (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1995).

في أشجار التفاح والكمثرى، تظهر الأعراض الأولى عادة في مطلع الربيع عندما يرتفع متوسط الحرارة عن 15 درجة مئوية خلال الطقس الرطب. وتصبح الزهرات المصابة مشبّعة بالماء ثم تذبل وتنكمش ويتحوّل لونها برتقالياً أو بنياً إلى أسود. وقد تبدو السويقات أيضاً مشبّعة بالماء، ويصبح لونها أخضر داكناً وفي النهاية بنياً أو أسود، فتنزّ أحياناً قطرات من إفرازات بكتيرية لزجة. وتذبل الأوراق المصابة وتنكمش، وتتحول دابرات الثمار بأكملها إلى اللون البني في التفاح، والبني الداكن إلى الأسود في الكمثرى، لكنها تظل معلّقة على الشجر لبعض الوقت. وعند الإصابة، يتحول لون الثميرات اليانعة إلى البني، لكنها أيضاً تبقى معلقة على الشجر. وتبدو

تمزقات الفاكهة غير الناضجة زيتية أو مشبّعة بالماء ويصبح لونها بنياً إلى أسود، وفي أحيان كثيرة تنز قطرات من إفرازات بكتيرية، وتظهر في أحيان كثيرة شرائط بنية مميزة مائلة إلى الاحمرار في الأنسجة تحت القشرة عندما يقشّر اللحاء من الأطراف أو الغصينات المصابة (van der Zwet and Keil, 1979; Thomson, 2000). وتتشكل تقرحات بنية إلى سوداء غائرة قليلاً في قشرة غصينات أو أغصان أو جذوع الأشجار المصابة. وتتحدد هذه التقرحات في وقت لاحق بظهور شقوق قرب الحواف بين الأنسجة المريضة والأنسجة السليمة (Thomson, 2000).

وقد يطرأ التباس ما بين أعراض اللفحة النارية وأعراض تشبه اللفحة – خاصة في الزهرات والبراعم – ناجمة عن بكتيريا وفطريات أخرى مُمرضة أو أضرار حَشَرية أو اضطرابات فيزيولوجية. وتشمل أنواع البكتيريا الأخرى التي تسبب أعراضاً تشبه أعراض مرض اللفحة النارية: بكتيريا الكمثرى الإيروينية *Erwinia pyrifoliae*، التي تسبب اللفحة البكتيرية لأغصان الكمثرى الإجاصية الأوراق *Pyrus pyrifolia* (Kim وآخرون، 1999) ؛ والبكتيريا الإيروينية *Erwinia piriflorinigrans* التي عثر عليها في زهر الكمثرى النخري في إسبانيا(López وآخرون، 2001)؛ والبكتيريا الإيروينية *Erwinia uzenensis* التي وصفت مؤخراً في اليابان (Matsuura وآخرون، 2012)؛ وأنواع بكتيريا إيروينية.*Erwinia* spp أخرى أبلغ عنها في اليابان تسبب لفحة بكتيرية في الأغصان (Tanii وآخرون، 1981؛ Kim وآخرون، 2001أ، 2001ب؛ Palacio-Bielsa وآخرون، 2012)؛ التي تسبب لفحة في الزهرات. ولذا فإن التوصل إلى تشخيص نهائي للفحة النارية ينبغي أن يكون على الدوام من خلال التحليل المخبري.

3-1-2 أخذ العينات وإعدادها

ينبغي تحليل المادة النباتية بأسرع ما يمكن بُعيد جمعها، ولكن يمكن تخزينها على حرارة تتراوح بين 4 و8 درجات مئوية لمدة تصل إلى أسبوع واحد حتى يحين وقت تجهيزها. وينبغي اتخاذ الاحتياطات اللازمة لاجتناب انتقال التلوث عند جمع العينات وأثناء النقل والتجهيز، خاصة عند عزل البكتيريا أو استخلاص الحمض النووي.

وتنبغي معالجة العينات تبعاً لإجراء عام يكون صحيحاً للعزل وللاختبارات المصلية ولتحليل التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وكما يشير Gorris وآخرون (1990)، يتطلب تحقيق تخصيب ناجح استخدام محلول دارئ للنقع مضاد للتأكسد ومعدّ حديثاً (يتألف من بولي فينيل البيروليدون-10، 20 غراماً؛ مانيتول، 10 غرامات؛ حمض الأسكوربيك، 1.76 غرام؛ وغلوتياتون مخفف، 3 غرامات؛ ومحلول ملحي منظم بالفوسفات، 10 ميليمولار، لتر واحد؛ بدرجة حموضة (pH) 7.2؛ معقّم بواسطة الترشيح). يمكن تجهيز العينات أيضاً في مياه مقطّرة معقّمة أو في محلول ملحي منظم بالفوسفات بدرجة حموضة 7.2 (كلوريد الصوديوم، 8 غرامات؛ كلوريد البوتاسيوم، 0.2 غرام؛ وفوسفات هيدروجين الصوديوم $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$، 2.9 غرام؛ وفوسفات هيدروجين البوتاسيوم 0.2 غرام؛ وماء مقطر، لتر واحد)، لكن ذلك يكون لغايات العزل المباشر أو التألق المناعي أو التفاعل المتسلسل للبوليميراز.

وينبغي اختيار أجزاء النباتات بعناية (الزهرات أو البراعم أو الغصينات أو الأوراق أو الثمار) التي تحمل الأعراض الأكثر نموذجية، مع إفرازات بكتيرية إذا أمكن. ويتم اختيار المواد المعدة للتجهيز من الحافة الأمامية للتمزقات الناجمة عن المرض. ويقطّع نسيج النبات إلى قطع تزن تقريباً 0.1–1.0 غرام تسحق من ثمّ سحقاً طفيفاً في محلول دارئ للنقع مضاد للتأكسد أو في محلول ملحي منظم بالفوسفات أو في مياه مقطرة معقّمة (كما هو موضح في الفقرة السابقة) بنسبة 1:50 (وزن/حجم)، وتترك لمدة خمس دقائق على الأقل، فتوضع على الجليد لبضع دقائق. وتنقل ثلاث عينات (كل منها 1 مليلتر) من كل منقوع إلى أنابيب معقّمة للطرد المركزي، ويخزن أنبوب واحد منها على حرارة تبلغ 20 درجة مئوية تحت الصفر لتحليله لاحقاً بواسطة التفاعل المتسلسل

للبوليميراز، وتعدّل محتويات أنبوب آخر بـ 30 في المائة من الغليسرين وتُخزن على حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر للاختبار التأكيدي، إذا كانت هناك حاجة له. ويحتفظ بالأنبوب الثالث على الجليد للقيام بالتخصيب قبل الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا) أو التفاعل المتسلسل للبوليميراز والعزل على أوساط انتقائية (الشكل 1). وإذا كانت هناك حاجة إلى إجراء اختبار للتألق المناعي (بمعنى أن تحليل التألق المناعي اختياري)، تعدّ الشرائح وتثّبت في اليوم نفسه الذي تنقع فيه العينات. وينبغي إجراء تحليل التفاعل المتسلسل للبوليميراز في أقرب وقت مناسب، باستخدام العينة المنقوعة المخزنة على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر.

3-1-3 العزل

3-1-3-1 العزل من عينات حاملة للأعراض

ينصح عامة ببسط العينات على ثلاثة أوساط مختلفة لتحقيق أقصى قدر ممكن من احتمال استخلاص بكتيريا *E. amylovora*، خاصة عندما لا تكون العينات في حالة جيدة. ويمكن أن يكون كل وسط أكثر أو أقل كفاءة تبعاً لمقدار الكائنات الحية الدقيقة وتكوينها في العينة. وقد جرى في اختبارين اثنين للحلقة، التحقق من صلاحية ثلاثة أوساط (CCT وKing's B والليفان) وحقق وسط الليفان الأداء الأفضل.

عندما تكون الأعراض متقدمة جداً أو حين لا تكون الظروف البيئية اللاحقة للإصابة مؤاتية لتكاثر بكتيريا *E. amylovora*، قد يكون عدد خلايا البكتيريا القابلة للاستزراع منخفضاً جداً. وقد يؤدي العزل في هذه الظروف إلى صفائح عليها عدد قليل من الخلايا المُمرضة، كما قد تكتظ ببكتيريا رمّامة ومناهضة. وفي حال الاشتباه بهذه الحالات، يتوجب إعادة اختبار العينة و/أو تخصيبها قبل عزلها. وقد وُصفت طريقة "الحث على الحالة الحية القابلة للعكس ولكن غير القابلة للاستزراع" (VBNC) لبكتيريا *E. amylovora* في الأنابيب باستخدام معالجات النحاس وفي الثمار (Ordax *et al.*, 2009)، ويمكن أن تتسبب بنتائج عزل سلبية كاذبة. ويرد أدناه وصف للأوساط الموصى بها:

- يُعدّ الوسط CCT في جزأين. يتألف الجزء الأول من: السكروز، 100 غرام؛ السوربيتول، 10 غرامات؛ Niaproof 4، 1.2 مليلتر؛ بنفسج بلوّري، 2 مليلتر (مذيب الإيثانول 0.1 في المائة)؛ أجار مغذ، 23 غراماً؛ ماء مقطر، لتر واحد؛ درجة الحموضة 7.0–7.2؛ ويجري التعقيم بالتسخين بالبخار وتحت الضغط (autoclaving) على حرارة 115 درجة مئوية لمدّة عشر دقائق. ويُبرّد الوسط المعقّم حتى يبلغ حرارة 45 درجة مئوية. ويتألف الجزء الثاني من: نترات الثاليوم، 2 مليلتر (محلول مائي بنسبة تركيز 1 في المائة وزن/حجم)؛ سيكلوهيكسيميد cycloheximide، 0.05 غرام؛ ويجري التعقيم عن طريق الترشيح. يضاف الجزء 2 إلى لتر واحد من الجزء 1 المعقم (Ishimaru and Klos, 1984).
- يتكون الوسط King's B من: بروتيوز ببتون (هضمون) رقم 3، 20 غراماً؛ غليسرين، 10 مليلترات؛ فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4، 1.5 غرام؛ كبريتات المغنيزيوم $MgSO_4.7H_2O$، 1.5 غرام؛ أجار، 15 غراماً؛ ماء مقطر، لتر واحد؛ درجة الحموضة 7.0–7.2؛ ويجري التعقيم بالتسخين بالبخار وتحت الضغط (autoclaving) إلى حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة (King وآخرون، 1954).
- يتكون وسط الليفان من: مستخلص الخميرة، 2 غرام؛ ببتون (هضمون) باكتوببتون bactopeptone، 5 غرامات؛ كلوريد الصوديوم NaCl، 5 غرامات؛ السكروز، 50 غراماً؛ أجار، 20 غراماً؛ ماء مقطر، لتر واحد؛ درجة الحموضة 7.0-7.2؛ ويجري التعقيم بالتسخين بالبخار وتحت الضغط (autoclaving) على حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة.

يضاف السيكلوهيكسيميد بواقع 0.05 غرام/لتر إلى وسطي King’s B والليفان عندما يتوقع وجود فطريات في العزل. ويعدّ محلول مخفف بنسبة 1:10 و1:100 لكل منقوع في محلول ملحي منظم بالفوسفات (كلوريد الصوديوم، 8 غرامات؛ كلوريد البوتاسيوم، 0.2 غرام؛ فوسفات هيدروجين الصوديوم Na_2HPO_4 - $12H_2O$، 2.9 غرام؛ فوسفات هيدروجين البوتاسيوم KH_2PO_4 0.2 غرام؛ ماء مقطر، لتر واحد).

ويفضل نشر 100 ميكرولتر من المنقوعات ومحاليلها المخففة بالطلي الثلاثي على صفائح 130 مليمتراً، أو نشر 50 ميكرولتراً في أطباق بيتري (Petri) 90 مليمتراً معيارية. ويتم تحضين الصفائح على حرارة 25 درجة مئوية لمدة تصل إلى أربعة أيام. وعادة تسجّل القراءة النهائية بعد مضي 72 ساعة. ويكون لون مستعمرات بكتيريا *E. amylovora* على الوسط CCT بنفسجياً شاحباً وشكلها دائرياً ومحدباً إلى مقبب وتكون سلسة ومخاطية ونموها أبطأ مما هو عليه في وسطي King’s B أو الليفان. ويكون لون المستعمرات على الوسط King´s B أبيض قشدياً وشكلها دائرياً وتكون غير متألقة تحت ضوء أشعة فوق بنفسجية 366 نانومتراً. ويكون لون المستعمرات على وسط الليفان أبيض وشكلها دائرياً ومقبباً وتكون سلسة ومخاطية. وقد ورد ذكر وجود مستعمرات بكتيريا *E. amylovora* على وسط الليفان كانت نتيجة الكشف عنها سالبة (Bereswill *et al.*, 1997).

ويتم الحصول على مستزرعات نقية من مستعمرات بكتيريا مفردة مشتبه بها لكل عينة، بالتخفيف والطلي على الوسط King's B. ويفضل تحديد هوية مستعمرات بكتيريا *E. amylovora* المفترضة بواسطة الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم المقترن باستخدام الأجسام الحيوية المضادة (DASI)-ELISA أو باختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز أو اختبارات مناسبة أخرى (مثل الكيمياء الحيوية والتألق المناعي وشاكلة (بروفيل) الأحماض الدهنية)، أو عن طريق تطعيم الأعضاء المعرضة للإصابة لدى أي عائل متوفر لبكتيريا E. amylovora من أجل اختبار القدرة الإمراضية، كما هو مبين في القسم 4.

وعند تحليل عينات حاملة لأعراض، يتوقع أن تكون هناك علاقة ترابط جيدة بين العزل والتألق المناعي والتخصيب مع فحص DASI-ELISA (القسم 3-1-4-1) والتفاعل المتسلسل للبوليميراز.

وفي اختبارات حلقية أجريت عامي 2003 و2010، بلغت درجة دقة العزل 0.88 و0.81 للوسط King's B و0.92 و0.89 لوسط الليفان و0.92 و0.95 للوسط CCT على التوالي، (López وآخرون 2006؛ M.M. Lopez، إبلاغ شخصي، 2012). وفي اختبار حلقي عام 2009، بلغت دقة العزل للوسط CCT، 0.96 (Dreo وآخرون 2009).

3-1-3-2 التخصيب-العزل

يستخدم التخصيب لمضاعفة الأعداد الأولية لبكتيريا *E. amylovora* القابلة للاستزراع في عينة ما، ولإجراء التخصيب بواسطة فحص DASI-ELISA أو التخصيب بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وينبغي أن يجري التخصيب قبل العزل (حتى للعينات الحاملة لأعراض) وذلك عندما يُتوقع وجود عدد قليل من خلايا البكتيريا القابلة للاستزراع (مثلاً، العينات المعالجة بالنحاس، والعينات التي تكون أعراضها قديمة، والعينات التي تكون قد جمعت خلال ظروف مناخية غير مؤاتية للفحة النارية، كما الحال في فصل الشتاء). وتزيد مرحلة التخصيب كثيراً من حساسية اختبار DASI-ELISA. وينصح بأن يستخدم للتخصيب وسطان سائلان مثبتا الصلاحية – أحدهما غير انتقائي (King’s B) وآخر شبه انتقائي (CCT) – لأن تركيبة مجموعات الكائنات الحية الدقيقة وعددها ليسا معروفين.

تُنقع عينة النسيج كما هو موضح في القسم 3-1-2 ويسكب 0.9 مليلتر منها فوراً في كل من أنبوبين معقمين سعتهما 10–15 مليلتر (لضمان تهوية كافية) يحتويان على 0.9 مليلتر من كل وسط تخصيب سائل (King's B دون أجار، وCCT مصنوع من المرق المغذي بدلاً من الأجار المغذي). ويتم تحضين الأنبوبين على حرارة 25 درجة مئوية مدة 48–72 ساعة من دون هزّهما. ويوصى بحضن أطول مدة عند معالجة عينات من النبات قد جمعت في فصل الشتاء. وينشر كل من مرق التخصيب والمحلولات المخففة (10:1 و100:1) المعدّة في محلول ملحي منظم بالفوسفات على صفائح CCTبالطلي الثلاثي للحصول على مستعمرات معزولة. ويتم تحضين الصفائح على حرارة 25 درجة مئوية لمدة 72–96 ساعة. وتتم القراءة النهائية للصفائح بعد مضي 72 ساعة، وينبغي أن تُتبع بتنقية المستعمرات وتحديد هويتها.

وينصح باستخدام وسط شبه انتقائي للتصفيح والتخفيف لأن مرحلة التخصيب ستسمح بنمو المُمرضات، لكنها ستسمح أيضاً بتكاثر وفير لبكتيريا أخرى. وفي الاختبار الحلقي الذي أجري عام 2010، بلغت درجة دقة التخصيب-العزل في الوسطين King's B وCCT، 0.97.

3-1-4 الكشف المصلي

3-1-4-1 التخصيب بواسطة فحص DASI-ELISA

تم التثبت في اختباري الحلقة من صلاحية عُدّة التخصيب بالاقتران مع فحص DASI-ELISA. وهي متوفرة تجارياً من Plant Print Diagnòstics SL،[1] وهي تستند إلى خليط من جسمين مضادين أحاديي الكلون محددين موصوفين في Gorris وآخرين (1996)، وهي تتطلب التخصيب المسبق للعينات، كما وُصف سابقاً. وينبغي اتباع البروتوكول التالي بحذافيره لتحقيق أقصى قدر من الدقة. قبل فحص إليزا، تُعالَج الكميات المطلوبة من المستخلصات والشواهد المُخصّبة بتحضينها في حمام مائي على حرارة 100 درجة مئوية لمدة عشر دقائق. وهذا العلاج ضروري لتحقيق التخصص الأمثل. وتعامل العينات المغلية (على حرارة الغرفة) باختبار إليزا في اليوم نفسه (أو تُخزن على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر لتحليلها لاحقاً) باتباع إرشادات الشركة المُصنّعة للعدّة التجارية.

ويكون اختبار إليزا سلبياً إذا كان متوسط قراءة الكثافة الضوئية لكبيبة عينة مكررة أقل من 2 × الكثافة الضوئية لأنابيب عينة المادة المستخلصة للشاهد السلبي (شريطة أن تكون الكثافة الضوئية لأنابيب عينة المادة المستخلصة للشاهد الإيجابي فوق 1.0 بعد تحضينها مدة 90 دقيقة وأكبر مرتين من الكثافة الضوئية التي تم الحصول عليها من العينة السلبية). ويكون اختبار إليزا إيجابياً إذا كان متوسط قراءة الكثافة الضوئية لكبيبة عينة مكررة أكبر من 2 × الكثافة الضوئية من أنابيب عينة المادة المستخلصة للشاهد السلبي (شريطة أن تكون الكثافة الضوئية لكافة أنابيب عينة المادة المستخلصة للشاهد السلبي أقل من 2 × متوسط الكثافة الضوئية لأنابيب عينة المادة المستخلصة للشاهد الإيجابي).

وتشير القراءات السلبية لفحص إليزا في كبيبات الشاهد الإيجابي إلى أن الاختبار لم يؤدَ بشكل صحيح و/أو أن الكواشف لم تجهّز جيداً. وتشير القراءات الإيجابية لفحص إليزا في كبيبات

[1] جرى في هذا بروتوكول التشخيص وصف الطرائق (بما فيها الإشارة إلى الأسماء التجارية) بحسب ما هي منشورة، إذ أنها تحدد المستوى الأصلي للحساسية أو التخصص و/أو قابلية النسخ الذي تم بلوغه. إن استخدام أسماء الكواشف أو المواد الكيميائية أو التجهيزات في بروتوكولات التشخيص هذه لا ينطوي على تأييدها من أجل استثناءات أخرى قد تكون مناسبة هي أيضاً. يجوز تعديل الإجراءات المخبرية الواردة في البروتوكولات لكي تتواءم مع المعايير المختبرات الفردية، شريطة المصادقة عليها بالشكل المناسب.

الشاهد السلبي إلى حدوث تلوث أو إلى حدوث التصاق جسم مضاد بمتلقٍّ غير محدد. وفي الحالتين ، يجب تكرار الاختبار أو إجراء اختبار ثانٍ يستند إلى مبدأ بيولوجيّ مختلف، كمثل التفاعل المتسلسل للبوليميراز.

وفي اختباري الحلقة اللذين أجريا في عام 2003 و2010 بلغت دقة DASI-ELISA 0.79 و0.82 على التوالي للتخصيب في الوسط King's B و0.83 و0.77 على التوالي للتخصيب في الوسط CCT (López وآخرون، 2006، 2010).

2-4-1-3 دمغ الأنسجة المباشر – إليزا

من أجل دمغ الأنسجة، تضغط أجزاء من النبات حديثة القص بعناية على غشاء من النتروسللوز. وتعدّ الدمغات للشواهد الإيجابية والسلبية. ويمكن الاحتفاظ بالأغشية المدموغة لعدة أشهر في مكان جاف على درجة حرارة البيئة المحيطة. وينبغي استخدام مصدر مثبت الصلاحية من الأجسام المضادة لبكتيريا *E. amylovora* مثل عدّة Plant Print Diagnòstics SL. أما لتظهير الدمغات، فينبغي اتباع إرشادات الشركة المُصنّعة. وتراقب الدمغات تحت المجهر بقوة تضخيم متدنية (× 10 أو × 20). ويعتبر الاختبار إيجابياً عندما تظهر رواسب أرجوانية–بنفسجية في أقسام من الأنسجة النباتية المدموغة على الغشاء، فيما لا تظهر في دمغة نسيج النبات للشاهد السلبي. وإذا دمغت الإفرازات أو مستعمرات البكتيريا، فينبغي أن تظهر بلون بنفسجي عندما تكون إيجابية. ويكون الاختبار سلبياً عندما لا تظهر رواسب أرجوانية–بنفسجية، كما الحال في الشاهد السلبي.

3-4-1-3 التألق المناعي

التألق المناعي طريقة مصلية بديلة موصى بها، ومن السهل تتبع البروتوكول القياسي (مصدر مجهول، 1998). وينبغي استخدام مصدر أجسام مضادة لـ *E. amylovora* مثبت الصلاحية. وقد تم في اختبار للحلقة التحقق من صلاحية جسمين مضادين متاحين تجارياً: فالأول جسم مضاد أحادي الكلون متوفر من Plant Print Diagnòstics SL والثاني جسم مضاد متعدد الكلون متوفر من شركة Loewe Biochemicals[1].

ينبغي إجراء اختبار التألق المناعي على عينة مستخلصة حديثاً ومثبتة على شرائح. تستخدم منقوعات غير مخففة ومحلولات مخففة بنسبة 10:1 و100:1 في محلول ملحي منظم بالفوسفات لتبقيع نوافذ شرائح التألق المناعي. ويستخدم الجسم المضاد أحادي الكلون أو الجسم المضاد متعدد الكلون بنسبة تخفيف مناسبة في المحلول الملحي المنظم بالفوسفات. وتخفف إيزوتيوسيانات الفُلورِسيِّن المقترنة المذوبة بالشكل المناسب في محلول ملحي منظم بالفوسفات: goat anti-mouse للجسم المضاد أحادي الكلون، و goat anti-rabbit أو anti-goat للجسم المضاد أحادي الكلون).

تعتبر نتيجة الاختبار على عينة ما سلبية إذا لوحظت خلايا متألقة خضراء بخصائص مورفولوجية نموذجية لبكتيريا *E. amylovora* في الشواهد الإيجابية، ولكن ليس في نوافذ العينة. وتعدّ نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية إذا لوحظت خلايا متألقة خضراء بخصائص مورفولوجية نموذجية في الشواهد الإيجابية وفي نوافذ العينة ولكن ليس في الشواهد السلبية. وبما أن عدد الخلايا البالغ 10^3 خلايا/مليلتر هو الحدّ الفاصل للكشف الذي يمكن الركون إليه في اختبار التألق المناعي، فمع عينات يفوق عدد الخلايا فيها 10^3 خلايا/مليلتر، تعتبر نتيجة فحص التألق المناعي إيجابية. ويمكن اعتبار نتيجة اختبار التألق المناعي غير مؤكدة للعينات بخلايا أقل من 10^3 خلايا/مليلتر ، أو خلايا خافتة التألق.

في الاختبار الحلقي الذي أجري في عام 2003، بلغت درجة دقة اختبار التألق المناعي 0.70 للجسم المضاد أحادي الكلون من Plant Print Diagnòstics و0.72 للأجسام المضادة متعددة الكلون من Loewe Biochemicals، ما يؤكد أن حساسية هذه التقنية هي تقريباً 10^3 وحدات مكوّنة لمستعمرات/مليلتر.

3-1-4-4 المقايسة المناعية بالانسياب الجانبي

هناك جهازان للانسياب الجانبي متوفران تجارياً يستخدمان لغرض إجراء تحليل سريع للمادة النباتية، وهما: جهاز Ea AgriStrip (Bioreba[1]) وجهاز Pocket Diagnostics (Forsite Diagnostics[1]). وفي اختبارين للحلقة أجريا في عامي 2009 و2010 وفقا لإرشادات الشركة المصنعة، بلغت درجة دقة جهاز Ea AgriStrip[1] (Bioreba) 0.66 و0.55 على التوالي، ودرجة دقة جهاز Pocket Diagnostics[1] 0.64 و0.56 على التوالي. وتم التوصل إلى هذه النتائج لدى كشف بكتيريا *E. amylovora* في عينات تتضمن من 1 إلى 10^6 وحدات مكوّنة للمستعمرات/غرام، لكن درجة الدقة كانت تقريباً 1.0 عند تحليل عينات فيها 10^5 إلى 10^6 وحدات مكوّنة لمستعمرات/غرام، وهذا هو الحدّ الأدنى المتوقع في العينات الحاملة للأعراض (López وآخرون، 2010). ولا يوصى باستخدام هاتين العدّتين إلا للعينات الحاملة للأعراض.

3-1-5 الكشف الجزيئي

خضعت عدة طرق قائمة على التفاعل المتسلسل للبوليميراز وبروتوكول واحد للتضخيم المتساوي الحرارة بواسطة الحلقة (LAMP)[2] للكشف عن بكتيريا *E. amylovora*، إلى تقييم واسع في الاختبارات الحلقية لدى عدد من المختبرات (Lopez وآخرون 2010؛ إبلاغ شخصي، 2012). وقد قيّم Powney وآخرون (2011a) مدى تخصص بعض هذه الطرق. وقد تكون طرق التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدية أكثر تكلفة وتستغرق وقتاً طويلاً وعادة تتطلب تدريباً أكثر مما تتطلب الطرق المصلية. ولهذه الأسباب، فضلاً عن احتمال مخاطر التلوث، فهي ليست دائماً مناسبة لإجراء اختبارات على نطاق واسع. ومع ذلك، أعطت بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي وبعض اختبارات التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدية واختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل في الأنبوب الواحد نتائج دقيقة للغاية، ولذا يوصى بها كطرق جزيئية. وينبغي أن تجرى فحوصات التفاعل المتسلسل للبوليميراز جميعها باستخدام حمض نووي مستخلص من العينات بسبب وجود كمية عالية من العوامل الكابحة لعوائل بكتيريا *E. amylovora* أو من عينات مخصبة لأن موثوقية الكشف عنها أكبر.

3-1-5-1 الشواهد للاختبارات الجزيئية

كي تعتبر نتيجة الاختبار موثوقة، ينبغي تناول شواهد مناسبة تعتمد على نوع الاختبار المستخدم ومستوى اليقين المطلوب لكل سلسلة من العزل والتضخيم للحمض النووي المستهدف. وبالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز، فإن الشاهد الإيجابي للحمض النووي والشاهد الداخلي وشاهد التضخيم السلبي (دون شاهد نموذج) تشكل الحد الأدنى للشواهد التي ينبغي أن تستخدم.

---

[2] عند استخدام التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة الحلقة على أساس منتظم في منطقة خاضعة لنظام براءات اختراع، مثل اليابان (براءات اختراع 358 313 3 و441 973 3 و424 139 4) والولايات المتحدة (US6 410 278 وUS6 974 670 وUS7 494 790) والاتحاد الأوروبي (534 020 1 و260 873 1 و337 045 2 و338 287 2) والصين (ZL008818262) والجمهورية الكورية (10-0612551) وأستراليا (779160) والاتحاد الروسي (964 252 2)، من الضروري لحماية حق الملكية الفكرية أن يحصل المستخدمون على رخصة من شركة Eiken Chemical Co., Ltd قبل الاستخدام.

الشاهد الإيجابي لحمض النواة

يُستخدم هذا الشاهد لرصد كفاءة طريقة الاختبار (عدا الاستخلاص)، وبالتحديد التضخيم. ويمكن استخدام حمض نواة مُعدّ مسبقاً (مخزّن) أو حمض نووي كامل الجينوم مضخّم أو شاهد اصطناعي (مثلاً، منتج مستنسخ للتفاعل المتسلسل للبوليميراز).

الشاهد الداخلي

بالنسبة إلى التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والتفاعل في الوقت الحقيقي، ينبغي أن يتضمن البروتوكول شواهد نباتية داخلية (جينة تدبير الشؤون الوراثية كمثل COX (Weller وآخرون، 2000) أو الحمض النووي الريبي S16 (Weisberg وآخرون، 1991) لاستبعاد احتمال ظهور نتائج سلبية كاذبة بسبب إخفاق استخلاص الحمض النووي أو تدهوره أو وجود كوابح التفاعل المتسلسل للبوليميراز.

شاهد التضخيم السلبي (دون شاهد نموذج)

هذا الشاهد ضروري للتفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي والتفاعل في الوقت الحقيقي بغية استبعاد النتائج الإيجابية الكاذبة الناجمة عن التلوث خلال إعداد خليط التفاعل. ويضاف في مرحلة التضخيم ماء صالح للتفاعل المتسلسل للبوليميراز كان قد استعمل لإعداد خليط التفاعل.

شاهد الاستخلاص الإيجابي

يستخدم هذا الشاهد لضمان أن تكون كمية ونوعية حمض النواة المستخلص المستهدف كافيتين للتفاعل المتسلسل ولضمان كشف الهدف. ويستخلص الحمض النووي من أنسجة العائل المصابة أو من أنسجة نباتية سليمة قد انغرزت فيها الآفة المستهدفة.

وينبغي لكمية الشاهد الإيجابي أن تبلغ تقريباً عُشر كمية نسيج الأوراق المستخدم لكل نبتة من أجل استخلاص الحمض النووي.

وبالنسبة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز، يجب الحرص على اجتناب التلوث الناجم عن رذوذ الشاهد الإيجابي أو عن العينات الإيجابية. وعندما يقتضي الأمر ذلك، يجب أن يُسلسل الشاهد الإيجابي المستخدم في المختبر بحيث تمكن مقارنة السلسلة بسهولة مع السلاسل التي يتم الحصول عليها من أمبليكونات التفاعل ذات الحجم الصحيح. وكبديل عن ذلك، يمكن تشكيل شواهد إيجابية اصطناعية ذات سلسلة معروفة تقارَن بدورها بأمبليكونات التفاعل ذات الحجم الصحيح.

شاهد الاستخلاص السلبي

يستخدم هذا الشاهد لرصد التلوث خلال استخلاص حمض النواة و/أو رد الفعل المتبادل مع نسيج العائل. ويتضمن الشاهد حمضاً نووياً استخلص من أنسجة العائل غير المصابة وتم تضخيمه لاحقاً. وينصح باستخدام شواهد متعددة حين يتوقع أن تكون هناك أعداد كبيرة من العينات الإيجابية.

2-5-1-3 استخلاص الحمض النووي

قيّمت في اختبار للحلقة أجري عام 2009 (Dreo وآخرون، 2009) ثلاث طرق لاستخلاص الحمض النووي: Llop وآخرون (1999) وTaylor وآخرون (2001) وعدّة REDExtract -N-Amp Plant

(Sigma-Aldrich[1]) لإجراء التفاعل المتسلسل للبوليميراز مع أربعة بروتوكولات للتفاعل تتراوح درجة دقتها بين 0.67 إلى 0.76. وكما هو مبين أدناه لدرجات الدقة المعطاة لطرق التفاعل المختلفة، أظهرت طرق استخلاص الحمض النووي هذه نتائج متقاربة في اختبار للحلقة أجري عام 2010 (Lopez وآخرون 2010). ولم تتحسن الكفاءة بعد تخفيف المستخلصات بنسبة 10:1، ما يشير إلى وجود القليل من الكوابح أو عدم وجودها. وبناءً على هذه النتائج، يوصى باتباع طريقة الاستخلاص التي وضعها Llop وآخرون (1999) بما أنها اختبرت على نطاق واسع في عدد من البلدان ولكونها متدنية التكلفة ويمكن إجراؤها بسهولة في المختبر.

استخلاص الحمض النووي بحسب Llop وآخرين (1999)

تخضع عينة من المنقوع مكونة من مليلتر واحد أعدّت وفقاً للقسم 3-1-2، و/أو مليلتر واحد من منقوع مخصّب، للطرد المركزي بسرعة 10 000 دورة لمدة 5 دقائق على درجة حرارة البيئة المحيطة. يتم التخلص من المادة الطافية ويعاد تعليق الحبيبة في 500 ميكرولتر من دارئ استخلاص (Tris-HCl بدرجة حموضة 7.5، 24.2 غرام؛ كلوريد الصوديوم، 14.6 غرام؛ إيثيل ثُنَائي أمين حِمض الخليك الرباعي (EDTA)، 9.3 غرام؛ كبريتات الصوديوم (SDS)، 5 غرامات؛ بولي فينيل البيروليدون، 20 غراماً؛ لتر واحد من ماء مقطّر؛ معقّم بالترشيح) ويجري تحضينها لمدة ساعة واحدة على درجة حرارة البيئة المحيطة وتخضع للطرد المركزي بسرعة 4 000 دورة لمدة 5 دقائق. ويُخلط ما يقرب من 450 ميكرولتراً من المادة الطافية مع كمية مساوية من الأيزوبروبانول، ويُقلَب ويترك على حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة إلى ساعة واحدة. ويخضع الحمض النووي المترسب لطرد مركزي بسرعة 10 000 دورة لمدة 5 دقائق، ويتم التخلص من المادة الطافية ثم تجفف الحبيبات بالهواء. وإذا تبقّى راسب ملوّن (بني أو أخضر) في الجزء السفلي من الأنبوب، فإنه يُزال بعناية بينما يجري التخلص من المادة الطافية، فيتم الحصول على حبيبة حمض نووي أنظف. ويعاد تعليق الحبيبة في 200 ميكرولتر من الماء. وينبغي أن تستخدم في التفاعل المتسلسل للبوليميراز مباشرة أو أن تخزن على حرارة 20 درجة مئوية تحت الصفر.

3-1-5-3 تضخيم الحمض النووي بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز

يتوفر وصف للكثير من بادئات وبروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز للكشف عن بكتيريا *E. amylovora*. وقد اعترت بعضها مشاكل تتعلق بالتخصص (Roselló وآخرون، 2006؛ Powney وآخرون، a2011). وإن البادئات والبروتوكولات التي تم التثبت من صلاحياتها في الاختبارات الحلقية هي تلك التي وضعها Bereswill وآخرون (1992) وLlop وآخرون (2000)، بتخصيب أو بدون تخصيب سابق، في عام 2003؛ وتلك التي وضعها Taylor وآخرون (2001) وStöger وآخرون (2006) وObradovic وآخرون (2007) في عامي 2009 و2010. ويشير اكتشاف سلالات بكتيريا *E. amylovora* كاملة الضراوة بدون البلازميد pEA29 (Llop وآخرون، 2006) وتجارب من بلدان مختلفة (Powney وآخرون، a2011) إلى ضرورة استخدام بروتوكولين اثنين للتفاعل المتسلسل للبوليميراز: أحدهما مع بادئات تستند إلى سلاسل pEA29، والآخر مع بادئات تستهدف سلاسل صبغية فريدة. وإذا كان التفاعل المتسلسل للبوليميراز مع البروتوكول المستند إلى بادئات pEA29 سلبياً ومع البروتوكول المستند إلى بادئات صبغية إيجابياً، يمكن اعتبار التفاعل الخاص ببكتيريا *E. amylovora* إيجابياً. ويمكن القيام بالتفاعل باستخدام البادئات والشروط المثبتة الصلاحية في اختبارات الحلقة، وإن كان يتعين ترتيب أطوار التضخيم بحيث تحقق النتيجة المُثلى لكلٍ من أجهزة التدوير الحراري (thermocyclers) المختلفة.

التفاعل المتسلسل للبوليميراز بحسب Bereswill وآخرين (1992)

البادئتان هما:

A (forward): 5′-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3′

B (reverse): 5′-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3′

السلاسل المستهدفة موجودة في البلازميد pEA29. ويتألف مزيج التفاعل من: ماء فائق النقاوة، 17.4 ميكرولتر؛ دارئ 10×، 2.5 ميكرولتر؛ 50 ميليمولاراً من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$)، 1.5 ميكرولتر؛ 10 ميليمولارات من ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTPs)، 0.5 ميكرولتر؛ 10 وحدات/ميكرولتر من البادئة A، 0.25 ميكرولتر؛ و10 وحدات/ميكرولتر من البادئة B، 0.25 ميكرولتر؛ 5 وحدات/ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq، 0.1 ميكرولتر. وحجم عينة الحمض النووي المستخلص هو 2.5 ميكرولتر ينبغي أن تضاف إلى 22.5 ميكرولتر من خليط التفاعل. أما بارامترات التدوير فهي: مرحلة إزالة للخواص الطبيعية denaturation على حرارة 93 درجة مئوية مدة 5 دقائق، تليها 40 دورة على حرارة 93 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، و52 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة و15 ثانية، ومرحلة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية مدة 10 دقائق. أما حجم الأمبليكون فيبلغ 900 زوج قواعد (bp) بحسب Bereswill وآخرين (1992)، وإن كانت هناك إمكانية حدوث اختلافات في الحجم تتراوح بين 900 و100 1 زوج قواعد اعتماداً على عدد تكرارات أزواج القواعد الثمانية في الجزء المضخّم (Jones وGeider ، 2001).

وفي الاختبار الحلقي أجري عام 2003، بلغت درجة الدقة 0.51، لكنها ارتفعت إلى 0.74 و0.78 بعد تخصيب العينات في الوسطين King's B وCCT على التوالي (López وآخرون، 2006).

التفاعل المتسلسل للبوليميراز بحسب Taylor وآخرين (2001)

البادئتان هما:

G1-F: 5′-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3′

G2-R: 5′-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3′

السلاسل المستهدفة صبغية (كروموسومية). ويتألف مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز من: ماء فائق النقاوة، 14.3 ميكرولتر؛ دارئ 10×، 2.5 ميكرولتر؛ 50 ميليمولاراً من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$)، 1.5 ميكرولتر؛ 10 ميليمولار من ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTPs)، 2.25 ميكرولتر؛ 10 وحدات/ميكرولتر من بادئة G1-F، ميكرولتر واحد؛ 10 وحدات/ميكرولتر من بادئة G2-R، ميكرولتر واحد؛ 5 وحدات/ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي Taq، 0.2 ميكرولتر؛ وتضاف عينة مقدارها 2.5 ميكرولتر من الحمض النووي المستخلص إلى 45 ميكرولتراً من مزيج التفاعل. أما بارامترات التدوير فهي: 94 درجة مئوية لمدة 3 دقائق، تليها 40 دورة على حرارة 93 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و60 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، مع مرحلة استطالة نهائية على 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، وتبريد على حرارة 15 درجة مئوية. وأما حجم الأمبليكون المتوقع فهو 187 زوج قواعد (bp).

وفي اختبار حلقي أجري عام 2010، بلغت درجة الدقة 0.77 باستخدام إجراء استخلاص الحمض النووي بحسب Llop وآخرين (1999).

التفاعل المتسلسل للبوليميراز حسب Stöger وآخرين (2006)

البادئتان من Llop وآخرين (1999) هما:

PEANT1-F: 5′-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3′

PEANT2-R: 5′-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3′

السلاسل المستهدفة موجودة في البلازميد pEA29. وقد أوصى Stöger وآخرون (2006) بأن تستخدم هذه الطريقة بحمض نووي مستخلص باستخدام عدّة REDExtract-N-Amp Plant (Sigma-Aldrich[1]). ويتألف مزيج التفاعل من: ماء فائق النقاوة، 5 ميكرولترات؛ خليط من التحليل بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز جاهز من شركة REDExtract-N-Amp (Sigma-Aldrich)، 10 ميكرولترات؛ 10 بيكومول/ميكرولتر من بادئة PEANT1-F، 0.5 ميكرولتر؛ 10 بيكومول/ميكرولتر من بادئة PEANT2-R، 0.5 ميكرولتر، وحمض نووي مستخلص، 4 ميكرولترات. أما بارامترات التدوير فهي: درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، تليها 35 دورة على حرارة 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، و58 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، مع مرحلة استطالة نهائية على 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، وتبريد على حرارة 15 درجة مئوية. وأما حجم الأمبليكون المتوقع فهو 391 زوج قواعد (bp).

وفي الاختبار الحلقي الذي أجري عام 2009، بلغت درجة الدقة 0.76 وفي اختبار حلقي آخر أجري عام 2010 بلغت 0.72، وذلك مع عدّة استخلاص الحمض النووي الموصى بها.

التفاعل المتسلسل للبوليميراز بحسب Gottsberger وآخرين (2010) (مكيّف من Obradovic وآخرين (2007))

البادئتان هما:

FER1-F: 5′-AGC AGC AAT TAA TGG CAA GTA TAG TCA-3′

rgER2-R: 5′-AAA AGA GAC ATC TGG ATT CAG ACA AT-3′

السلاسل المستهدفة صبغية (كروموسومية). ويتألف مزيج التفاعل من: ماء فائق النقاوة، 14.3 ميكرولتر؛ دارئ 10 × 2.5 ميكرولتر؛ 50 ميليمولار من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$)، 0.75 ميكرولتر؛ 10 ميليمولار من ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTPs)، 0.25 ميكرولتر؛ 10 بيكومول/ميكرولتر من بادئة FER1-F، ميكرولتر واحد؛ 10 بيكومول/ميكرولتر من بادئة rgER2-، ميكرولتر واحد؛ 5 وحدات/ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي Taq، 0.2 ميكرولتر؛ وحمض نووي مستخلص، 5 ميكرولتر. أما بارامترات التدوير فهي: درجة حرارة 94 درجة مئوية لمدة 3 دقائق، تليها 41 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 10 ثوان و60 درجة مئوية لمدة 10 ثوان و72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، مع مرحلة استطالة نهائية على 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، وتبريد على حرارة 15 درجة مئوية. وأما حجم الأمبليكون المتوقع فهو 458 زوج قواعد (bp).

وفي اختبار حلقي أجري عام 2009، بلغت درجة الدقة 0.76 وفي اختبار حلقة آخر أجري عام 2010 بلغت 0.68، وذلك باستخدام طريقة استخلاص الحمض النووي التي يصفها Llop وآخرون، (1999).

التفاعل المتسلسل للبوليميراز حسب Llop وآخرين (2000)

يستخدم التفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل حسب Llop وآخرين (2000) مجموعتين من البادئات تجمعان في أنبوب تفاعل واحد. وبسبب اختلاف درجة حرارة التلدين annealing لكل من

البادئتين يجرى التفاعل المتسلسل للبوليميراز تباعًا. أما مجموعة البادئات الخارجية فهي تلك التي صممها McManus وJones (1995)، وتستند إلى تسلسلات البلازميد pEA29. أما مجموعة البادئات الداخلية فهي تلك التي وصفها Llop وآخرون (2000).

البادئتان الخارجيتان هما:

AJ75-F: 5′-CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT-3′

AJ76-R: 5′-ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA-3′

البادئتان الداخليتان هما:

PEANT1-F: 5′-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3′

PEANT2-R: 5′-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3′

يتألف مزيج التفاعل من: ماء فائق النقاوة، 36.25 ميكرولتراً؛ دارئ 10 × 2.5 ميكرولتر؛ 50 ميليمولارا من كلوريد المغنيزيوم ($MgCl_2$)، 3 ميكرولترات؛ 10 ميليمولارات من ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTPs)، 0.5 ميكرولتر؛ 0.1 بيكومول/ميكرولتر من بادئة AJ75-F، 32.0 ميكرولتر؛ 0.1 بيكومول/ميكرولتر من بادئة AJ76-R، 32.0 ميكرولتر؛ 10 بيكومول/ميكرولتر من بادئة PEANT1-F، ميكرولتر واحد؛ 10 بيكومول/ ميكرولتر من بادئة PEANT2-R، ميكرولتر واحد؛ 5 وحدات/ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq، 0.6 ميكرولتر؛ وتنبغي إضافة عينة من الحمض النووي بحجم 2 ميكرولتر إلى 48 ميكرولتراً من مزيج التفاعل. أما بارامترات التدوير فهي: مرحلة إزالة الخواص الطبيعية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 4 دقائق، تليها 25 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، و72 درجة مئوية لمدة 90 ثانية. ويتبع هذه الدورة الأولى من التفاعل المتسلسل للبوليميراز في جهاز التدوير الحراري نفسه مرحلة ثانية لإزالة الخواص الطبيعية على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 4 دقائق، و40 دورة على حرارة 94 درجة مئوية لمدة 60 ثانية و72 درجة مئوية لمدة 60 ثانية، مع مرحلة استطالة نهائية على حرارة 72 درجة مئوية مدة 10 دقائق. أما حجم الأمبليكون المتوقع فهو 391 زوج قواعد (bp)، ولو أن حدوث اختلافات في الحجم ممكن.

وقد بلغت درجة الدقة 0.69 في اختبار حلقة أجري عام 2003 و0.72 في اختبار حلقة آخر أجري عام 2010، لكن الدقة زادت بعد التخصيب إلى 0.84 (الوسط King's B) و0.86 (الوسط CCT) في اختبار حلقي أجري عام 2003 وإلى 0.79 (King's B) و0.88 (CCT) في اختبار حلقة آخر أجري عام 2010.

4-5-1-3 اعتبارات عامة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز

قد تحتاج بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز إلى تعديل (تكييف لتحقيق النتائج المثلى) عند استخدام كواشف مختلفة أو أجهزة تدوير حرارية مختلفة.

بعد التضخيم بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز يمكن تأكيد وجود بكتيريا *E. amylovora* بسَلسلة منتجات التفاعل المتسلسل للبوليميراز أو بتحليل تعدد شكل أطوال الاقتطاع (RFLP). ويمكن استخدام نمط الاقتطاع الذي لوحظ في الأمبليكونات التي تم الحصول عليها بالبادئات التي وضعها Bereswill وآخرون (1992) أو بالتفاعل المتسلسل للبوليميراز المتداخل الذي طوره Llop وآخرون (2000) لتأكيد تخصص التحليل بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز عند المقارنة مع نمط الاقتطاع في سلالة ضبط معروفة. وينبغي أن يجري هضم الاقتطاع بأنزيمي الاقتطاع النووي الداخليين DraI وSmaI.

وتكون نتيجة الاختبار على عينة ما سلبية إذا لم يُكشف عن الأمبليكون الخاص ببكتيريا *E. amylovora* بالحجم المتوقع في العينة (ونمط أنزيم الاقتطاع أو تسلسل الأمبليكون، عندما ينطبق ذلك) فيما كشف عنه في كافة الشواهد الإيجابية. وتكون نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية، إذا كشف عن الأمبليكون الخاص ببكتيريا *E. amylovora* بالحجم المتوقع، شريطة ألا يكون هناك تضخيم من أي من الشواهد السلبية وأن يكون نمط الاقتطاع أو تسلسل الأمبليكون (عندما ينطبق ذلك) دالاً على وجود بكتيريا *E. amylovora*.

3-1-5-5 التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي

استناداً إلى تقييم بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي في اختبارات حلقية أجريت عامي 2009 و2010 (Dreo وآخرون 2009؛ وLopez وآخرون، 2010) أوصي بالبروتوكول الذي وصفه Pirc وآخرون (2009)، والذي يستهدف السلاسل الصبغية. كما أن التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي المزدوج المستند إلى سلاسل صبغية متوفر أيضاً، لكنه لم يختبر حلقياً (Lehman وآخرون 2008).

التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي بحسب Pirc وآخرين (2009)

تستخدم الأوليغونيكليوتيدات oligonucleotides التالية:

Ams116F primer: 5′-TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA-3′

Ams189R primer: 5′-GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG-3′

Ams141T probe: FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA

ينفذ التفاعل في كمية نهائية تبلغ 25 ميكرولتراً. ويتألف مزيج التفاعل من: ماء بالغ النقاوة، 2.5 ميكرولتر؛ وخليط ×2 TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[1])، 12.5 ميكرولتر؛ 10 بيكومول من البادئة Ams116F، 2.25 ميكرولتر؛ 10 بيكومولات من البادئة Ams189R، 2.25 ميكرولتر؛ و10 بيكومول من FAM-labelled Ams141T، 0.5 ميكرولتر؛ و5 ميكرولتر من مستخلص الحمض النووي (مضاف إلى مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز البالغ 20 ميكرولتراً). أمّا بارامترات التدوير فهي: دقيقتان على حرارة 50 درجة مئوية؛ 10 دقائق على حرارة 95 درجة مئوية، و40 دورة من 15 ثانية على حرارة 95 درجة مئوية ودقيقة واحدة على 60 درجة مئوية. والنمط القياسي لمعدلات زيادة درجة الحرارة في جهازي HT7900 وHT7900 Fast (Applied Biosystems) هو: 1.6 درجة مئوية/ثانية صعوداً و1.6 درجة مئوية/ثانية نزولاً. ومن الممكن تشغيل التفاعلات بمعدلات زيادة أبطأ، لكن النتائج لم تكن مقبولة بمعدلات أسرع (حوالي 3.5 درجة مئوية/ثانية صعوداً ونزولاً). وحجم الأمبليكون المتوقع هو 74 زوج قواعد (bp).

تتوفر عادة خيارات مختلفة، آلية أو يدوية، لتحليل نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي، لتعيين حدود الإشارة والضوضاء. وينبغي اتباع التعليمات الخاصة بالبرمجيات المناسبة، كما ينبغي تعيين خط الأساس تلقائياً وتعيين العتبة يدوياً بحيث تتقاطع والمرحلة الأسية من منحنيات التضخيم للشاهد.

وقد بلغت درجات الدقة في اختبار حلقة أجري عام 2010، 0.80 و0.85 و0.76 مع استخلاص الحمض النووي بالطريقة الواردة في Llop وآخرين (1999)، ولعدّة التفاعل المتسلسل للبوليميراز REDExtract-N-Amp Plant (Sigma-Aldrich)، ولـ Taylor وآخرين (2001)، على التوالي.

التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي حسب Gottsberger (2010)

تستخدم الأوليغونيكليوتيدات oligonucleotides التالية التي تستهدف كروموسوم بكتيريا *E. amylovora*:

hpEaF primer: 5′-CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA-3′

hpEaR primer: 5′-AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT-3′

hpEaP probe: FAM-TCG TCG AAT GCT GCC TCT CT-MGB

يُنفذ التفاعل في كمية نهائية تبلغ 20 ميكرولتراً. ويتألف مزيج التفاعل من: ماء بالغ النقاوة، 6 ميكرولتر؛ وخليط 2× TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[1])، 10 ميكرولترات؛ 10 بيكومولات من البادئة hpEaF، ميكرولتر واحد؛ 10 بيكومول من البادئة hpEaR، ميكرولتر واحد؛ و10 بيكومول من البادئة hpEaP، ميكرولتر واحد؛ وميكرولتر واحد من مستخلص الحمض النووي (مضاف إلى مزيج التفاعل المتسلسل للبوليميراز البالغ 20 ميكرولتراً). أمّا بارامترات التدوير فهي: دقيقتان على حرارة 50 درجة مئوية؛ 10 دقائق على حرارة 95 درجة مئوية، و50 دورة من 15 ثانية على حرارة 95 درجة مئوية، ودقيقة واحدة على 60 درجة مئوية. وحجم الأمبليكون المتوقع هو 138 زوج قواعد (bp).

لتحليل نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي، تتوفر عادة خيارات مختلفة، آلية أو يدوية، لتعيين حدود الإشارة والضوضاء. وينبغي اتباع التعليمات الخاصة بالبرنامج الحاسوبي المناسب. وينبغي تعيين خط الأساس تلقائياً وتعيين العتبة يدوياً بحيث تتقاطع والمرحلة الأسّية من منحنيات التضخيم للشاهد.

لم يكن بالإمكان اختبار درجة دقة التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي هذا في اختبار حلقي أجري عام 2010؛ لكنّ مختبراً واحداً قد اختبره بالتوازي مع التفاعل في الوقت الحقيقي الذي وضعه Pirc وآخرون (2009) فحصل على النتائج النوعية نفسها مع استخلاص الحمض النووي بالطريقة الواردة في Llop وآخرين، (1999).

6-5-1-3 تفسير النتائج من التفاعل المتسلسل للبوليميراز

التفاعل المتسلسل للبوليميراز التقليدي

يعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز الخاص بالمُمرض صالحاً فقط إذا:

(1) أنتج الشاهد الإيجابي أمبليكوناً للبكتيريا من الحجم الصحيح.

(2) لم تُنتج أمبليكونات من الحجم الصحيح للبكتيريا في شاهد الاستخلاص السلبي وشاهد التضخيم السلبي.

في حال استخدمت أيضاً بادئات للشاهد الداخلي من الحمض النووي الريبي S16 (16S rDNA)، ينبغي أن ينتج الشاهد السلبي، أي النسيج النباتي السليم، (في حال استخدم) والشاهد الإيجابي وكل عينة من عينات الاختبار، أمبليكوناً بحجم 1.6 كيلوقاعدة (kb) (16S rDNA). وتجدر الملاحظة أن الشواهد الإيجابية الاصطناعية أو الخاصة بالبلازميد لن تنتج أمبليكوناً بحجم 1.6 كيلوقاعدة. ويشير إخفاق العينات في التضخم مع بادئات الشاهد الداخلي إلى أن عملية استخلاص الحمض النووي قد فشلت أو أن حمض النواة لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن مركّبات كابحة

للتفاعل المتسلسل للبوليميراز موجودة في الحمض النووي المستخلص أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر نتيجة اختبار عيّنة ما إيجابيةً إذا ما أنتجت أمبليكوناً من الحجم الصحيح.

التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي

لا يعتبر التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي صالحاً إلا إذا:

(1) أنتج الشاهد الإيجابي منحنى تضخيم بواسطة البادئات الخاصة بالمُمرض.

(2) لم يُنتج أي منحنى تضخيم (أي أن قيمة حد الدورة تبلغ 40) في شاهد الاستخلاص السلبي وشاهد التضخيم السلبي.

في حال استخدمت بادئات الشاهد الداخلي لـ COX هي أيضاً، ينبغي أن ينتج الشاهد السلبي (في حال استخدم) والشاهد الإيجابي وكل عينة من عينات الاختبار منحنى تضخيم. ويشير إخفاق العينات في إنتاج منحنى تضخيم مع بادئات الشاهد الداخلي إلى أن عملية استخلاص الحمض النووي قد فشلت أو أن حمض النواة لم يدرج في مزيج التفاعل أو أن مركّبات كابحة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز موجودة في الحمض النووي المستخلص أو أن الحمض النووي قد فسد.

وتعتبر نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية إذا أنتجت منحنى أسّياً نموذجياً. وينبغي التحقق من قيمة حد الدورة في كل مختبر لدى تنفيذ الاختبار أول مرة.

7-5-1-3 التضخيم المتساوي الحرارة بوساطة الحلقة LAMP

وضع بروتوكول هذا التضخيم ووصفه Temple وآخرون (2008)، وTemple وJohnson (2011). وقد قُيّم في اختبار حلقي أجري عام 2010، لأنه اعتبر مناسباً للمختبرات غير المجهزة للتفاعل المتسلسل للبوليميراز وسهل الأداء. وتبين في هذا الاختبار أن التضخيم باستخدام بادئات للكشف عن المورثات الصبغية *amsL* لبكتيريا *E. amylovora* يفتقر إلى الحساسية المناسبة لتحليل العينات ذات الأعداد الجرثومية المتدنية. ونتيجة لذلك، لا ينصح بهذا البروتوكول الموصوف أدناه لاكتشاف الصبغية *amsL* إلا لتحليل العينات الحاملة للأعراض التي فيها أكثر من 10^5-10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر. ولم يُقيّم في الاختبار الحلقي البروتوكول الذي وضعه Temple وJohnson (2011) باستخدام بادئات للكشف عن البلازميد pEA29.

بادئات هذا التضخيم للكشف عن *amsL* هي:

ALB Fip: 5′-CTG CCT GAG TAC GCA GCT GAT TGC ACG TTT TAC AGC TCG CT-3′

ALB Bip: 5′-TCG TCG GTA AAG TGA TGG GTG CCC AGC TTA AGG GGC TGA AG-3′

ALB F: 5′-GCC CAC ATT CGA ATT TGA CC-3′

ALB B: 5′-CGG TTA ATC ACC GGT GTC A-3′

استخدمت البادئتان Fip وBip عند تركيزات نهائية تبلغ 2.4 ميكرومتر والبادئتان F و B عند تركيزات نهائية تبلغ 0.2 ميكرومتر. وكانت حرارة الذوبان للبادئات تتراوح بين 58 و60 درجة مئوية. ويتألف مزيج تفاعل LAMP من: ×10 دارئ من ThermoPol (New England Biolabs[1])، 5 ميكرولترات؛ و10 ميليمولارات من ثلاثي فوسفات النيوكليتيد منقوص الأكسجين (dNTPs)، 5 ميكرولترات؛ و100 ميليمولار من سلفات المغنيزيوم $MgSO_4$، 2 ميكرولتر؛ و10 مليغرام/مليلتر من

ألبومين المصل البقري (BSA)، 2 ميكرولتر؛ 100 ميكرومتر من ALB Fip، 1.2 ميكرولتر؛ 100 ميكرومتر من ALB Bip، 1.2 ميكرولتر؛ 10 ميكرومتر من ALB F، 1 ميكرولتر؛ 10 ميكرومتر من ALB B، 1 ميكرولتر؛ 8 وحدات/ميكرولتر من بوليميراز الحمض النووي للسوماتروبين البقري، 2 ميكرولتر؛ الحمض النووي النموذج، 5 مليلتر؛ وماء فائق النقاوة، 24.6 ميكرولتر. وتجدر الإشارة إلى أن كلاً من بوليميراز الحمض النووي للسوماتروبين البقري والحمض النووي النموذج والماء الفائق النقاوة لا تتم إضافتهم إلى المزيج الرئيسي، بل تُضاف منفصلة بعد تقسيم الخليط الرئيسي إلى قُسامات. وقبل بدء التفاعل يجهّز حمام مائي أو جهاز تدوير حراري على حرارة 65 درجة مئوية. ويعدّ المزيج ويصبّ 18.4 ميكرولتر منه بواسطة الماصة في كل أنبوب 0.2 ميكرولتر مفرد من أنابيب التفاعل المتسلسل للبوليميراز. وبعد ذلك يصب بوليميراز الحمض النووي للسوماتروبين البقري والحمض النووي النموذج والماء الفائق النقاوة من خلال ماصة بشكل منفصل في كل أنبوب يحتوي على المزيج الرئيسي. وتوضع الأنابيب في دوّارة الأطباق (1 000 دورة في الدقيقة مدة 30 ثانية) وتوضع في حوض مائي (65 درجة مئوية) في حامل كي تكون نهاية التفاعل مغمورة أو في جهاز تدوير حراري (65 درجة مئوية) مدة 55 دقيقة. وتزال الأنابيب وتترك لتبرد مدة 10 ثوان.

تكون نتيجة الاختبار على عينة ما إيجابية إذا لوحظ وجود ترسبات ضبابية في الأنبوب أو وجود ترسبات بيروفوسفات ماغنيزيوم بيضاء صلبة في قعره، كما للشاهد الإيجابي. أما صفاء المحلول فيشير إلى نتيجة سلبية للاختبار، وكذلك الحال بالنسبة إلى شاهد السلبي.

وفي اختبار حلقي أجري عام 2010، بلغت درجة الدقة 0.64، لكنها لعينات فيها 10^5-10^6 وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر بلغت 0.80. ولهذا السبب، لا يوصى بهذا التضخيم إلا لتحليل العينات الحاملة لأعراض.

2-3 الكشف في النباتات غير الحاملة للأعراض

يشار إلى اختبارات المسح الموصى بها في المخطط الانسيابي الوارد في الشكل 2.

1-2-3 أخذ العينات وتجهيزها

يمكن تجهيز العينات غير الحاملة للأعراض بشكل منفرد (يحبذ ذلك) أو في مجموعات يصل عددها إلى 100 (منظمة وقاية النباتات في أوروبا والبحر الأبيض المتوسط، 2013). وينبغي اتخاذ الاحتياطات اللازمة لاجتناب التلوث عند جمع العينات وأثناء عملية الاستخلاص. ويمكن أخذ العينات وتجهيزها باتباع أحد البروتوكولات التالية:

- تجمع الزهرات أو البراعم أو الثمار الصغيرة أو الفلقات من الجذوع في أكياس أو حاويات معقمة، في فصل الصيف أو في مطلع الخريف بعد وجود الظروف المؤاتية لتكاثر بكتيريا *E. amylovora* وعندما تفوق حرارة الطقس 15 درجة مئوية (van der Zwet and Beer، 1995). وتقطع البراعم الفتية التي يبلغ طولها حوالي 20 سنتمتراً، أو الزهرات إن توفرت، من النبات المشتبه به. وإذا لزم إجراء تحليلات في فصل الشتاء، تجمع خمسة إلى عشرة براعم لكل نبتة. ويجري في المختبر قطع الزهرات إن توفرت وسويقة وقاعدة طرف عدة أوراق من قاعدة البراعم أو فلقات الجذوع من النباتات المختارة. وتوزن كمية بين 0.1-1.0 غرام من المواد النباتية وتنقع في محلول دارئ مضاد للأكسدة باتباع البروتوكول الموضح في القسم 3-1-2.

- هناك إجراء لأخذ العينات لم يتم التثبت من صلاحيته لتحليل الغصينات الخشبية غير الحاملة لأعراض من مشاتل، وهو كما يلي: تؤخذ عينة مكونة من 100 غصين، يبلغ طول كل منها حوالي 10 سنتمترات، من 100 نبتة. وإذا كانت هناك عدة أجناس من النباتات في المجموعة، ينبغي أن تُمثل بالتساوي في العينة (ثلاثة أجناس كحد أقصى لكل عينة). ويؤخذ من كل عينة عشوائياً 30 غصيناً ويقطّع كل غصين إلى أربع قطع (ما ينتج 120 قطعة جذعية). تغطى العينات بمحلول ملحي منظم بالفوسفات المعقم يحتوي على 0.1 Tween 20 في المائة في قوارير Erlenmeyer، فتحرّك القوارير بقوة على رجاجة دوّارة مدة 1.5 ساعة على درجة حرارة البيئة المحيطة. ويصفى المستخلص من خلال ورق ترشيح محفوظ في مرشِّح من الزجاج الملبد باستخدام مضخة تفريغ هواء ويجمع المُرشّح ليستخدم مباشرة للتحليل أو يطرد مركزياً بقوة 10 000 دورة لمدة 20 دقيقة. وتعلّق الحبيبة في 4.5 مليلتر من المحلول الملحي المنظم بالفوسفات المعقّم. ثم تنفّذ تقنيات الكشف المشار إليها أدناه. ويمكن تطبيق بروتوكول مشابه على أوراق الشجر والزهرات والبراعم.

سيتفاوت الاسترداد المتوقع لبكتيريا *E. amylovora* تبعاً لتوقيت أخذ العينات، ويكون الحد الأقصى للاسترداد في فصل الصيف (شريطة توفر الظروف المناخية المواتية لهذه البكتيريا)، بينما يكون الاسترداد منخفضاً في فصل الشتاء. وينبغي تجهيز العينات فورا عن طريق إجراء تخصيب يليه اختبار DASI-ELISA والتفاعل المتسلسل للبوليميراز والعزل باستخدام البروتوكولات الموصوفة لكل تقنية للعينات الحاملة للأعراض والتي وضعها López وآخرون (2006). أما التألق المناعي فاختياري؛ وفي حالة القيام به، ينبغي أن يجرى مباشرة على المستخلص قبل التخصيب.

3-2-2 اختبارات المسح

في العادة، يكون التحليل المباشر للعينات غير الحاملة للأعراض سلبياً بسبب انخفاض المجموعات البكتيرية. ولذا، عند تحليل المواد غير الحاملة لأعراض، لا بديل عن تخصيب عينات أعدت في دارئ مضاد للأكسدة (القسم 3-2-1) (Gorris وآخرون، 1996) لمدة 72 ساعة على حرارة 25 درجة مئوية تقريباً. ومن المستحسن القيام باختبارين على الأقل من اختبارات المسح التالية يكونان مستندين إلى مبدأين بيولوجيين مختلفين:

- تخصيب-عزل. اتبع الإجراء للعينات الحاملة للأعراض (القسم 3-1-3-2).
- تخصيب-DASI-ELISA. اتبع الإجراء للعينات الحاملة للأعراض (القسم 3-1-4-1).
- تخصيب-التفاعل المتسلسل للبوليميراز أو تخصيب-التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي. استخدم 500-1 000 ميكرولتر من العينات التي خصّبت في وسط King's B و/أو CCT لاستخلاص الحمض النووي، ثم اتبع إجراء التضخيم على طريقة Taylor وآخرين (2001) أو طريقة Llop وآخرين (2000) (القسم 3-1-5-1) أو بروتوكولات التفاعل المتسلسل للبوليميراز في الوقت الحقيقي (القسم 3-1-5-5).

إذا كان أي من اختبارات الفرز إيجابياً بينما كان العزل سلبيا، تنبغي محاولة عزل المُمرض من المستخلص المخزون على حرارة 80 درجة مئوية تحت الصفر مع الغليسرين أو من العينات المخصبة. وعندما تكون ثلاثة اختبارات أو أكثر إيجابية بينما العزل سلبياً، فمن المعقول الاشتباه بشدة بوجود بكتيريا *E. amylovora* في العينة، لكن تحديد الهوية وتأكيدها يتطلب عزل المُمرض من عينات جديدة وتحديد هوية البكتيريا لاحقاً.

4- تحديد الهوية

ينبغي أن يستند تحديد الهوية إلى النتائج التي تم الحصول عليها من عدة تقنيات، لأن الأنواع الأخرى من الفصيلة الإيروينية Erwinia مثل بكتيريا *E. piriflorinigrans* (López وآخرون، 2011)، وبكتيريا *E. pyrifoliae* (Kim وآخرون، 1999؛ Rhim وآخرون، 1999)، وبكتيريا *E. uzenensis* (Matsuura وآخرون، 2012) وغيرها من الأنواع الإيروينية *Erwinia* spp. (Kim وآخرون، a2001؛ b2001؛ Palacio-Bielsa وآخرون، 2012) تشترك مع بكتيريا *E. amylovora* في الخصائص المورفولوجية والمصلية والجزيئية نفسها. ويمكن التفريق بين بكتيريا *E. amylovora* والأنواع الإيروينية *Erwinia* الوثيقة الصلة بها (التي يمكن العثور عليها في أنسجة حاملة للأعراض ومتشابهة في بعض العوائل) بالجمع بين ثلاث تقنيات مستندة إلى مبادئ بيولوجية مختلفة:

- التفاعل المتسلسل للبوليميراز المستند إلى حمض نووي صبغي (كروموسومي) (القسمان 3-1-5-2 و4-3-1)
- DASI-ELISA باستخدام أجسام مضادة أحادية الكلون، كما وصف أعلاه للكشف (القسم 3-1-4-1، باستثناء مرحلة التخصيب).
- التلقيح في عوائل مرض اللفحة النارية لاستيفاء متطلبات فرضيات Koch، بما في ذلك إعادة عزل الممرضات الملقحة (القسم 4-4).

ولتحديد هوية المستعمرات، يوصى باستخدام تقنيتين على الأقل من التقنيات الثلاث هذه. كما يمكن استخدام اختبارات أخرى تبعاً لخبرة المختبر؛ ويرد وصف لهذه التقنيات أدناه. وعند الاقتضاء، ينبغي أن يشمل التأكيد النهائي لهوية المستزرعات البكتيرية اختباراً للقدرة الإمراضية.

إن عازلات *E. amylovora* الموصى باستخدامها كشواهد إيجابية هي NCPPB 683 و CFBP 1430. ويمكن أن توفر المجموعات التالية، من بين أخرى، سلالات مرجعية مختلفة لبكتيريا *E. amylovora*: المجموعة الوطنية للبكتيريا المسببة لأمراض النبات (NCPPB)، وكالة البحوث الغذائية والبيئية، يورك، المملكة المتحدة؛ المجموعة الفرنسية للبكتيريا المسببة لأمراض النبات (CFBP)، المعهد الوطني الفرنسي للبحوث الزراعية (Station Phytobactériologie) (INRA)، أنجيه، فرنسا؛ المجموعة البلجيكية المنسقة من الكائنات الحية الدقيقة BCCM/LMG، Ghent، بلجيكا؛ المجموعة الدولية للكائنات المجهرية للنبات (ICMP)، مركز ماناكي وينوا لأبحاث رعاية الأراضي (Manaaki Whenua Landcare Research)، أوكلاند، نيوزيلندا؛ مجموعة الأنواع المستزرعة الأمريكية (ATTC)، ماناساس، فيرجينيا، الولايات المتحدة الأمريكية. ولا يمكن ضمان أصالة السلالات إلا إذا تم الحصول عليها مباشرة من مجموعات الأنواع المستنبتة.

4-1 تحديد الهوية التغذوي والأنزيمي

تعتبر الاختبارات المظهرية النمطية phenotypic الرئيسية مفيدة ولا تزال تستخدم لتحديد الهوية، ولكن ينصح بالجمع بينها وبين اختبارات القدرة الإمراضية واختبار مصلي أو جزيئي. وتعرّف الجراثيم الأعضاء في جنس إيروينيا *Erwinia* على أنها جراثيم سلبية لصبغ Gram ، وكائنات مخيّرة للعيش بمعزل عن الهواء، وقادرة على الحركة بواسطة أسواط محيطية، وقضيبية الشكل، وقادرة على إنتاج حمض من الغلوكوز والفركتوز والغالاكتوز والسكروز. والخصائص المظهرية النمطية الرئيسية (Paulin، 2000) المشتركة بين معظم سلالات بكتيريا *E. amylovora*، بحسب طرق Jones وGeider (2001) هي: اختبار أوكسيداز (-)، واختبار الأكسدة/التخمير (O/F) (+/+)، صبغة فلورية في وسط King's B تحت ضوء أشعة فوق بنفسجية (-)، إنتاج ليفان (+)،

خفض النيترات (-)، استخدام السيترات (+) وتسييل الجيلاتين (+)، يورياز وإندول (-)، شكل مستعمرات في وسط CCT.

وتميّز الاختبارات التالية بكتيريا *E. amylovora* عن بكتيريا *E. pyrifoliae* وبكتيريا *E. piriflorinigrans*، مع أن بعض الخصائص الفيزيولوجية والبيوكيميائية لبعض السلالات قد تختلف (الجدول 1).

الجدول 1- الاختلافات بين بكتيريا *Erwinia amylovora* وبكتيريا *Erwinia pyrifoliae* وبكتيريا *Erwinia piriflorinigrans*

الاختبار الميكروبيولوجي	*Erwinia amylovora*	*Erwinia pyrifoliae*	*Erwinia piriflorinigrans*
التحلل المائي للجيلاتين	+	–	–
إينوزيتول†	–	غير محدد	+
سوربيتول†	+	+	–
أيسكولين†	متغير	–	+
ميليبيوز†	–	–	+
د- رافينوز†	–	–	+
ب- جينتيوبيوز†	+	–	+
التضخيم بواسطة ‡ EP16A/EPI62CCPS1/CPS2C	–	+	غير محدد

† مأخوذ من Roselló وآخرين، (2006)، وLópez وآخرين (2011). أكسدة الركائز في صفائح شريطية API 50 CH (bioMérieux) باستخدام الطريقة التي وصفها López وآخرون (2011). يعطي أكثر من 90 في المائة من السلالات النتائج المشار إليها.
‡ بحسب Kim وآخرون (2001ب).

4-1-1تحديد الهوية عن طريق الخصائص الكيميائية-الحيوية

4-1-1-1 تحديد الخصائص التغذوية والأنزيمية

يمكن تحديد هوية بكتيريا *E. amylovora* من الناحية البيوكيميائية عبر تحديد خصائصها على نظام الشرائح الشريطية API 20 E وAPI 50 CH (*bioMérieux*[1]).

API 20 E[1]. ينبغي اتباع تعليمات الشركة المصنّعة لإعداد المستعلق وتلقيح الشريحة الشريطية. تلقّح الشريحة على حرارة 25-26 درجة مئوية. وينبغي أن تتم القراءة بعد 48 ساعة لمستزرعة بكتيريا *E. amylovora* النموذجية كالتالي: ينبغي لاختبارات نازع كربوكسيل الليسين (LDC)، ونازع كربوكسيل الأورنثين (ODC)، واستخدام السيترات (CIT)، وإنتاج H_2S، يورياز (URE)، ونازعة أمين التربتوفان (TDA)، وإنتاج إندول (IND) وأكسدة رامنوز (RHA)، أن تكون سلبية النتيجة، بينما ينبغي لاختبار أكسدة السكروز (SAC) أن يكون إيجابياً. وقد تختلف اختبارات أخرى تبعاً للسلالة، بحسب Donat وآخرون (2007).

API 50 CH. يعدّ مزيج مستعلق كثافته الضوئية 1.0 (على طول موجة قدره 600 نانومتر) في محلول ملحي منظم بالفوسفات. ويضاف مليلتر واحد من المزيج المُستعلق إلى 20 مليلتراً من وسط Ayers (NH_4H2PO_4، غرام واحد؛ كلوريد البوتاسيوم (KCl)، 0.2 غرام؛ سلفات المغنيزيوم

($MgSO_4$)، 0.2 غرام؛ 0.2 في المائة من البروموثيمول الأزرق، 75 مليلتراً؛ لتر واحد من الماء المقطر؛ درجة الحموضة 7؛ تعقيم على حرارة 120 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة) (Ayers وآخرون، 1919). وينبغي اتباع إرشادات الشركة المصنعة لتلقيح الشريحة الشريطية. ويجري تحضين الشريحة الشريطية على حرارة 25-26 درجة مئوية في ظروف يتوفر فيها الهواء. وتلاحظ الاستفادة من الكربوهيدرات المختلفة بتكوّن لون أصفر في الأنبوب. وينبغي أن تكون القراءة بعد 72 ساعة لمستزرعة بكتيريا *E. amylovora* نموذجية إيجابية لـ أرابينوز-L، ريبوز، جلوكوز-د، سكر -د، مانيتول، سوربيتول، أسيتيل غلُوكُوزامين-N، سكروز، تريهالوز، جنتيوبيوز-β. ولا تستخدم بكتيريا *E. amylovora* في هذه الظروف السكريات المتبقية، لكن بعض السلالات قد تستخدم الغليسيرول وفوكوز د-، حسب Donat وآخرين، (2007).

2-1-1-4 التحديد المؤتمت للهوية

يتوفر تجارياً نظام مؤتمت لتحديد الهوية يستند إلى نتائج تفاضلية لـ 94 اختباراً مظهرياً في طبق العيار المجهري وإلى البرمجيات المصاحبة له (OmniLog[1], Biolog[1]). وينبغي إتباع تعليمات الشركة المصنّعة للقيام بتحديد افتراضي للهوية لمستخلصات بكتيريا *E. amylovora* المشتبه بها.

3-1-1-4 تحديد الخصائص عن طريق الأحماض الدهنية

في سياق تحديد الخصائص عن طريق الأحماض الدهنية، تنمّى مستعمرات غير متألقة إيجابية لوسط الليفان في أجار الصُّويا بالتريبتيكاز المتوفر تجارياً على حرارة 28 درجة مئوية (Sasser، 1990) لمدة 48 ساعة. ويجري استخلاص الأحماض الدهنية ويحلل المستخلص باستخدام نظام Sherlock لتحديد هوية الميكروبات (MIDI[1]) المتوفر تجارياً أو غيره من البرمجيات المناسبة للتحديد الظنّي لهوية بكتيريا *E. amylovora*، بحسب Wells وآخرون (1994).

2-4 التحديد المصلي للهوية

1-2-4 التلاصق **Agglutination**

يمكن تحديد هوية مستعمرات *E. amylovora* افتراضياً من خلال تلاصقها على شريحة. يخلط على شريحة مزيج مُستعلق كثيف من الخلايا مع قطرة من محلول ملحي منظم بالفوسفات وقطرة من مصل مضاد لـ بكتيريا *E. amylovora* (غير مخفف، أو مخفف بنسبة 1:5 إلى 1:10 فقط). ويمكن استخدام أجسام مضادة أحادية الكلون شريطة تلاصقها مع السلالات المرجعية. وينبغي تحديد تخصص الأجسام المضادة مسبقاً.

2-2-4 التألق المناعي

يعدّ مزيج مستعلق مكوّن من حوالي 10^6 خلايا/مليلتر في محلول ملحي منظم بالفوسفات من مستعمرات إيجابية لوسط الليفان وغير متألقة، ويتّبع إجراء التألق المناعي الموضح في القسم 3-1-4-3. وينبغي تحديد تخصص الأجسام المضادة مسبقا.

3-2-4 الفحص المناعي المرتبط بالأنزيم (إليزا)

يمكن تحديد هوية العازلات من خلال إجراء الدمغ المباشر للأنسجة-إليزا (القسم 3-1-4-2)، وDASI-ELISA (القسم 3-1-4-2)، وإليزا غير المباشر (أنظر أدناه) باستخدام أجسام مضادة أحادية الكلون محددة كما هو موضح فيما يتعلق بالكشف. وقد تم التحقق من صلاحية مزيج من الأجسام

المضادة في اختباري حلقة لفحص DASI-ELISA. ويعدّ مزيج مُستعلق من حوالي 10^8خلايا/مليلتر في محلول ملحي منظم بالفوسفات من المستعمرات المشتبه بها. ويمكن استخدام DASI-ELISA الوارد في القسم 3-1-4-1، ولكن بدون مرحلة التخصيب.

فحص إليزا غير المباشر

تعالج مستزرعات العزلات المشتبه بها على حرارة 100 درجة مئوية لمدة 10 دقائق في حمام مائي أو على قالب تسخين لخفض التفاعلات غير المحددة مع الأجسام المضادة أحادية الكلون التجارية. وتخلط قُسامات من 200 ميكرولتر من المستزرع مع كمية مساوية من محلول دارئ كربوني (Na_2CO3، 1.59 غرام؛ $NaHCO_3$، 2.93 غرام؛ لتر واحد من الماء المقطر؛ درجة حموضة 9.6 ويوضع هذا المحلول في كبيبة واحدة على الأقل من كبيبات طبق عيار مجهري. ويجري تحضين الطبق على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة أو على حرارة 4 درجات مئوية طوال الليل. وتُفرغ المستخلصات من الكبيبات عبر نقرها بالإصبع ويُغسل الطبق بمحلول دارئ للغسل ثلاث مرات (أنظر بروتوكول DASI-ELISA). وتعدّ الأجسام المضادة المحددة لبكتيريا *E. amylovora* التجارية من Plant Print Diagnòstics SL[1] بدرجة التخفيف الموصى بها. ويضاف إلى كل كبيبة 200 ميكرولتر من محلول الأجسام المضادة المحددة لبكتيريا *E. amylovora* المخفف ويجري تحضين الطبق على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة. وتُفرغ المستخلصات من الكبيبات وتغسل كما من قبل. ويعدّ المحلول المخفف المناسب من المضاد المقترن لأنزيم الفوسفاتاز القلوي في محلول ملحي دارئ فوسفاتي يحتوي على 0.5 في المائة من ألبومين المصل البقري (BSA). ويضاف إلى كل كبيبة 200 ميكرولتر من المضاد المقترن المخفف ويجري تحضين الطبق على حرارة 37 درجة مئوية لمدة ساعة. ويفرّغ محلول الأجسام المضادة من الأنابيب بواسطة النقر بالإصبع وتغسل الكبيبات كما من قبل. ويعدّ 1 مليغرام/مليلتر من ركيزة الفوسفاتاز القلوية (p-nitrophenylphosphate) في ركيزة دارئة (أمين مزدوج الإيثانول، 97 مليلتراً؛ و800 مليلتر من الماء المقطر؛ يعدّل لدرجة حموضة 9.8 بحمض هيدروكلوريك مركّز؛ ثم تعدّل الكمية إلى 000 1 مليلتر من الماء المقطر). ويضاف إلى كل كبيبة 200 ميكرولتر من محلول ركيزة الفوسفاتاز القلوية. ويجري تحضين الطبق في الظلام على حرارة الغرفة ويقرأ على 405 نانومترات على فترات منتظمة خلال 90 دقيقة. وتعتبر نتيجة الاختبار إيجابية بتحول لون الركيزة إلى اللون الأصفر.

4-2-4 المقايسة المناعية بالانسياب الجانبي

يُعدّ مزيج مستعلق من المستزرع النقي تبلغ نسبة تركيزه 10^7وحدات مكوّنة لمستعمرات/مليلتر، لتحديد الهوية الافتراضي. وتستخدم الدوارئ والإجراءات المقدّمة من الشركات المُصنِّعة لعدّة الاختبار، كما هو موضح في القسم 3-1-4-4.

3-4 تحديد الهوية بالطرق الجزيئية

1-3-4 التفاعل المتسلسل للبوليميراز

يُعدّ مزيج مستعلق من 10^6خلايا/ مليلتر تقريباً في ماء معقم صالح للفحص الجزيئي من مستعمرات إيجابية لوسط الليفان وغير متألقة جرت تنقيتها، ويعامل هذا المزيج على حرارة 100 درجة مئوية لمدة 10 دقائق. وتُطبق إجراءات التفاعل المتسلسل للبوليميراز المناسبة أو بروتوكول التضخيم المتساوي الحرارة بواسطة الحلقة كما هو موضح في الأقسام 3-1-5-2 إلى 3-1-5-4 (مباشرة، بدون استخلاص الحمض النووي). وعند استخدام التفاعل المتسلسل للبوليميراز لتحديد

هوية المستعمرات المستخلصة، ينبغي أن تستخدم وحدة واحدة من بوليميراز الحمض النووي للمستحرة المائية Taq (بدلاً من وحدتين كما في حالة المواد النباتية).

4-3-2 الماكرو- اقتطاع بالرحلان الكهربائي الهلامي في حقل نبضي pulsed field gel electrophoresis

بحسب Jock وآخرين، (2002)، يبين تحليل الرحلان الكهربائي الهلامي بالحقل النبضي للحمض النووي الجينومي بعد هضم جينة XbaI ستة أنماط لسلالات بكتيريا *E. amylovora* الأوروبية. ويمكن أن توفر هذه الطريقة معلومات مفيدة لتمييز السلالات. وهي تطبق لفهم انتشار مرض اللفحة النارية في أوروبا (Jock وآخرون، 2002؛ Donat وآخرون، 2007).

4-4 تقنيات القدرة الإمراضية

ينبغي تلقيح النباتات العائلة بمستعمرات بكتيريا *E. amylovora* لاستيفاء فرضيات Koch والتحقق من صحة قدرتها الإمراضية. ولتلقيح النباتات، تستخدم أصناف الكمثرى (مثل صنف كونفرس Conference ودويين دو كوميس Doyenne du Comice وويليامز Williams وباسا كراسن Passa Crassane) أو التفاح (مثل فوجي Fuji وغالا Gala وإيدارد Idared وجوناثان Jonathan)، والأكدنيا (مثل الجزائر Algerie وتاناكا Tanaka) أو الزعرور أو السفرجليات أو شوك النار. وتلقّح البراعم قطع ورقة فتية عبر العرق المركزي بمقص يُغطس مسبقاً في مزيج مستعلق من 10^{9} وحدة مكوّنة لمستعمرات/مليلتر لكل عازلة معدّة في محلول ملحي منظم بالفوسفات. وتحفظ النباتات على حرارة 20-25 درجة مئوية على 80 في المائة من الرطوبة النسبية تقريباً لمدة أسبوع أو أسبوعين. أما البراعم الفتية التي جرى تعقيمها سطحياً (بمعاملتها بإيثانول 70 في المائة لمدة 30 ثانية ثم غسلها ثلاث مرات بماء مقطر معقّم) من نباتات مزروعة في بيت زجاجي، فيمكن أيضاً أن تلقّح بالطريقة نفسها وتحفظ في أنابيب مع أجار 1 في المائة معقم. وينبغي أن تُحفظ هذه الأنابيب على حرارة 20– 25 درجة مئوية وفي الضوء لمدة 16 ساعة في اليوم.

كما يمكن أيضاً إجراء التلقيح على ثمار غير ناضجة منفصلة لأصناف مشتبه بها من الكمثرى والتفاح والأكدنيا بوضع 10 ميكرولتر من المزيج المستعلق من العازلات بتركيز 10^{9} وحدة مكوّنة لمستعمرات/ مليلتر في محلول ملحي منظم بالفوسفات في جرح حديث على سطح ثمرة معقّمة (تعامل بكلور تجاري 70 في المائة لمدة 30 دقيقة ثم تُغسل ثلاث مرات بماء مقطر معقم). وينبغي تحضين الثمار في غرفة رطبة على حرارة 25 درجة مئوية مدة ثلاثة إلى خمسة أيام.

وتعزل مرة جديدة من الأعضاء الملقّحة الحاملة لأعراض مرض اللفحة النارية النموذجية، المستعمرات المشابهة لمستعمرات بكتيريا *E. amylovora* وتحدد هويتها. وتظهر إيجابية الاختبار إذا حدث نزّ للبكتيريا واسمرار حول موقع التلقيح بعد يومين إلى سبعة أيام، كما يلاحظ في شاهد بكتيريا *E. amylovora* الإيجابي، شريطة ألا تلاحظ في الشاهد السلبي تمزقات أو يلاحظ تمزق نخري صغير فقط في موقع الجرح.

وهناك تقنيات تلقيح أخرى ممكنة. فقد تشير تفاعلات شديدة الحساسية في أوراق التبغ إلى إبانة جينات *hrp* لبكتيريا *E. amylovora*، ولكن قد يكون هذا الاختبار إيجابياً لكثير من البكتيريا المُمرضة للنبات. وينبغي استخدام نبتات تبغ من أصناف كزانتي Xanthi أو سامسون Samsun لديها أكثر من خمس إلى ست ورقات. ويعدّ مزيج مستعلق من البكتيريا بتركيز 10^{9} وحدات مكوّنة لمستعمرات/مليلتر (كثافة ضوئية 1.0 على 600 نانومتر) وتستخدم إبرة ومحقن لحقن المزيج في الفسحات ما بين الخلايا في الأوراق الناضجة. ويسجّل الانهيار الكامل للأنسجة التي

حققت بعـد 24–48 ساعة على حرارة البيئة المحيطـــة على أنه إيجابي، بحسب ما يظهـــر أيضاً في الشاهـــد الإيجابـــي لبكتيريا *E. amylovora*.

5- السجلات

ينبغي الاحتفاظ بالسجلات والأدلة على النحو المبين في القسم 2-5 من المعيار الدولي رقم 27 (*بروتوكولات تشخيص الآفات الخاضعة للوائح*).

وفي الحالات التي قد تتأثر فيها أطراف متعاقدة أخرى بنتائج التشخيص، ولا سيما في حالات عدم الامتثال (المعيار رقم 13: الخطوط التوجيهية بشأن الإخطار عن عدم الامتثال وإجراءات الطوارئ) وفي حالة ظهور الآفة في منطقة معينة للمرة الأولى، فيجب أن يتم حفظ السجلات والأدلة والمواد الإضافية التالية مدة سنة واحدة على الأقل على نحو يكفل الاقتفاء: العينة الأصلية أو مستزرع/مستزرعات الآفة، العينات المحفوظة أو المثبتة على شرائح أو مواد الاختبار (مثلاً، صور فوتوغرافية للهلاميات، ونسخ مطبوعة لنتائج إليزا وأمبليكونات التفاعل المتسلسل للبوليميراز).

6- جهات الاتصال للحصول على معلومات إضافية

يمكن الحصول على معلومات إضافية حول هذا البروتوكول من:

- Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; email: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax +34 963424001)
- Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, 231 Morrin Road, St Johns, Auckland 1140, New Zealand (Robert Taylor; e-mail: Robert.Taylor@mpi.govt.nz; tel.: +64 99093548; fax: +64 99095739)

ويمكـن أن تقدم المنظمـات القطريـة الخاصـة بوقايـة النباتـات أو المنظمـات الإقليميـة لوقايـة النباتات أو الأجهزة التابعة لهيئة تدابير الصحة النباتية طلباً لإعادة النظر في بروتوكول التشخيص من خلال أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات (ippc@fao.org)، التي ستقوم بدورها بإحالته إلى الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص.

7- شكر وتقدير

حررت المسودة الأولى لهذا البروتوكول M.M. López (من مركز وقاية النباتات، IVIA)، إسبانيا (أنظر القسم السابق)، وراجعها R. Taylor (مختبر الصحة النباتية والبيئة، مراكز التحقيق والتشخيص، وزارة الصناعات الأولية، نيوزيلندا (أنظر القسم السابق))، وR. Roberts (مختبر أبحاث أشجار الفاكهة، إدارة البحوث الزراعية في وزارة الزراعة في الولايات المتحدة، USDA-ARS، الولايات المتحدة).

واختبرت معظم التقنيات التي وصفت في اختبار الحلقة في مشروع DIAGPRO الذي موّله الاتحاد الأوروبي عام 2003، وفي مشروع EUPHRESCO عام 2009 وفي مشروع إسباني في عام 2010.

8- المراجع

يشير الملحق الحالي إلى المعايير الدولية لتدابير الصحة النباتية. وهذه المعايير متاحة على البوابة الدولية للصحة النباتية على https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms.

Anonymous. 1998. Council Directive 98/57 EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al. Official Journal of the European Communities,* L235: 1– 39.

Ayers, S.H., Rupp, P. & Johnson, W.T. 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. *US Department of Agriculture Bulletin,* 782.

Bereswill, S., Jock, S., Aldridge, P., Janse, J.D. & Geider, K. 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 51: 215–225.

Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. & Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology,* 58: 3522–3526.

Bonn, W.G. & van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. *In* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent,* Erwinia amylovora, pp. 37–54. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.

Bradbury, J.F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria.* Kew, Surrey, UK, CAB International Mycological Institute. 332 pp.

Burrill, T.J. 1883. New species of *Micrococcus* (bacteria). *The American Naturalist,* 17: 319.

Donat, V., Biosca, E.G., Peñalver, J. & López, M.M. 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *Journal of Applied Microbiology,* 103: 1639–1649.

Dreo, T., Duffy, B., López, M., Paulin, J.P., Poliakoff, F. & Reisenzein, H. 2009. *Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight* (Erwinia amylovora). York, UK, EUPHRESCO. Available at http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=662 (last accessed September 2012).

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. PM 7/20 (2) Erwinia amylovora. EPPO Bulletin, doi:10.1111/epp.12019.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). n.d. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Paris, EPPO. Available at http//www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm.

Gorris, M.T., Cambra, M., Llop, P., López, M.M., Lecomte, P., Chartier, R. & Paulin, J.P. 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae,* 411: 41–45.

Gottsberger, R.A. 2010. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology,* 51: 285–292.

Ishimaru, E.S. & Klos, E.J. 1984. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology,* 74: 1342–1345.

Jock, S., Donat, V., López, M.M., Bazzi, C. & Geider, K. 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology,* 4: 106–114.

Jones, A. & Geider, K. 2001. II Gram negative bacteria. B. *Erwinia* and *Pantoea*. *In* N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chum, eds. *Guide for identification of plant pathogenic bacteria,* 2nd edn. St Paul, MN, APS Press.

Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L. & Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systemic Bacteriology,* 49: 899–906.

Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S. & Geider, K. 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology,* 147: 2951–2959.

Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L. & Geider, K. 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease,* 85: 1183–1188.

King, E.O., Ward, M. & Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine,* 44: 301–307.

Lehman, S.M., Kim, W.K., Castle, A.J. & Svircev, S.M. 2008. Dualplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology,* 98: 673–679.

Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. & López, M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology,* 66: 2071–2078.

Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods,* 37: 23–31.

Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J.L., Montesinos, E. & López, M.M. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology,* 96: 900–907.

López, M.M., Llop, P., Gorris, M.T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. & Cambra, M. 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae,* 704: 99–103.

López, M.M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bersgma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. & Reisenzein, H. 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. ISHS 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, 16–20 August 2010, abstract 18.

López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. & Gardan, L. 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology,* 61: 561–567.

McManus, P.S. & Jones, A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology,* 85: 618–623.

Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. & Sawada, H. 2012. *Erwinia* uzenensis sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology,* doi:10.1099/ijs.0.032011-0.

Obradovic, D., Balaz, J. & Kevresan, S. 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologiia,* 76: 844–852.

Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., López, M.M. & Marco-Noales, E. 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology,* 107: 106–116.

Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. & López, M.M. 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species. *Trees*, 26: 13–29.

Paulin, J.P. 2000. *Erwinia amylovora*: General characteristics, biochemistry and serology. *In* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent,* Erwinia amylovora, pp. 87–116. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.

Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. & Dreo, J. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology,* 58: 872–881.

Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. & Rodoni, B. 2011a. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australian Plant Pathology,* 40: 87–97.

Powney, R., Smits, T.H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B. & Rodoni, B. 2011b. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *Journal of Bacteriology,* 193: 785–786.

Rhim, S-L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J-P., Langlotz, C., Kim, S-L. & Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora,* causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology,* 48: 514–520.

Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M.T., Charter, R., Cambra, M. & López, M.M. 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 28: 1–12.

Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. *In* F. Klement, K. Rudolf & D.C. Sands, eds. *Methods in phytobacteriology,* pp. 199–204. Budapest, Akademiai Kiadó.

Starr, M.P., Cardona, C. & Folsom, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology,* 41: 9515–9559.

Stöger, A., Schaffer, J. & Ruppitsch, W. 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology,* 154: 469–473.

Tanii A., Tamura, O. & Ozaki, M. 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan,* 47: 102.

Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N. & Forster, R.L.S. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,* 29: 35–43.

Temple, T.N. & Johnson, K.B. 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease,* 95: 423–430.

Temple, T.N., Stockwell, V.O. & Johnson, K. 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae,* 793: 497–504.

Thomson, S.V. 2000. Epidemiology of fire blight. *In* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent,* Erwinia amylovora, pp. 9–36. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.

Van der Zwet, T. 2004. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae,* 704: 35.

Van der Zwet, T. & Beer, S. 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin,* No. 631.

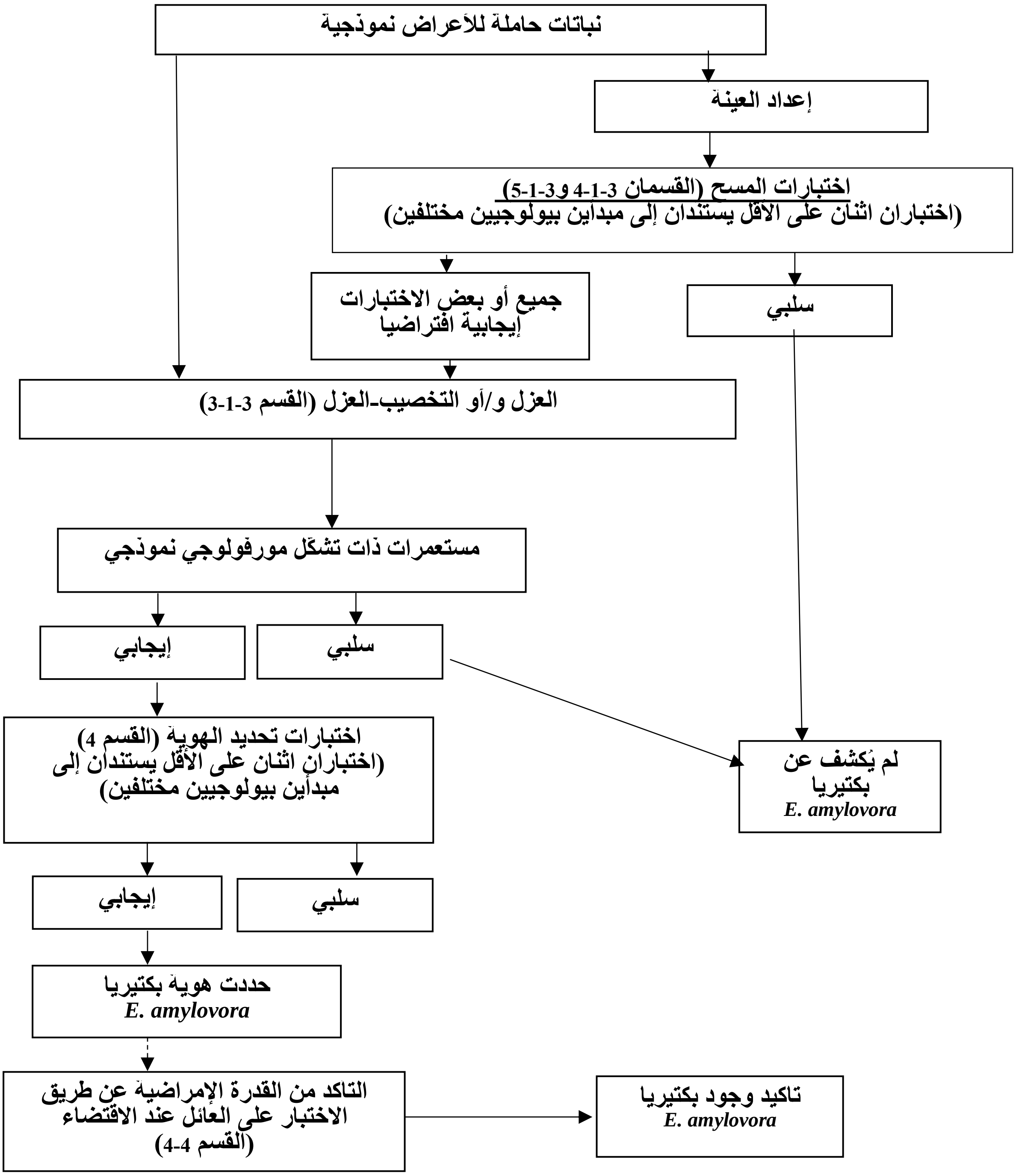
Van der Zwet, T. & Keil, H.L. 1979. *Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants.* United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 510. Washington, DC, USDA.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697–703.

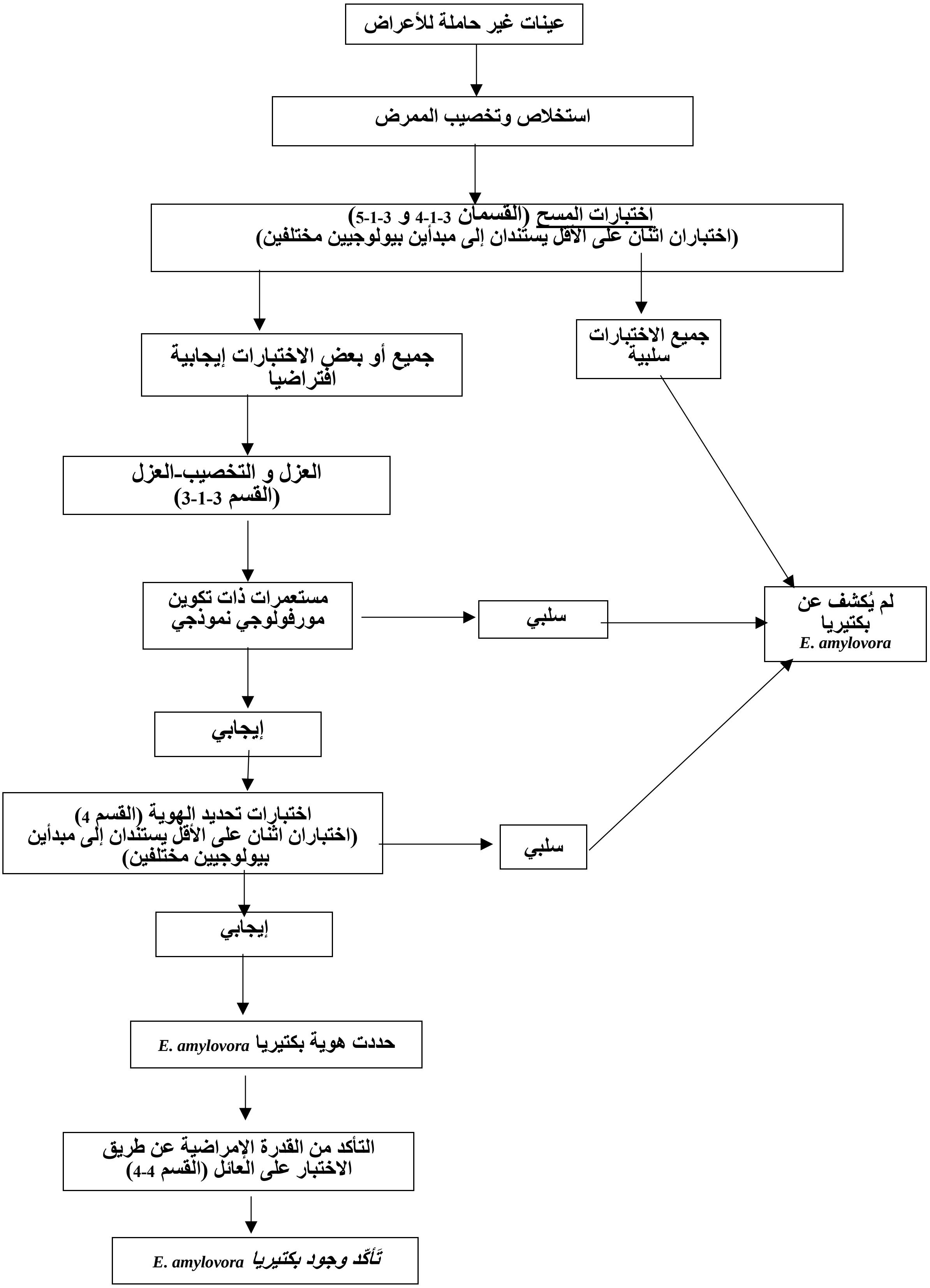
Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E. 2000. Detection of 9:03 AM *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

Wells, J.M., van der Zwet, T. & Hale, C.N. 1994. Differentiation of Erwinia species in the "amylovora" group by class analysis of cellular fatty acids. Journal of Phytopathology, 1409:03 AM: 31–38.

9- الأشكال



الشكل 1- مخطط انسيابي لتحديد هوية *Erwinia amylovora* في عينات حاملة لأعراض مرض اللفحة النارية.



الشكل 2- مخطط انسيابي لتحديد هوية بكتيريا *Erwinia amylovora* في عينات غير حاملة لأعراض مرض اللفحة النارية.
* من المعقول الاشتباه بشدة بوجود بكتيريا *E. amylovora* في العينة، لكن تحديد الهوية يتطلب عزل المُمرض من عينات جديدة وتحديد هوية البكتيريا في وقت لاحق.

تاريخ النشر:

لا يعد هذا جزءاً رسمياً من المعيار.

11-2014 عرضت لجنة المعايير الموضوع الأصلي: *Erwinia amylovora* (2009-2004).

04-2006 أضافت الدورة الأولى لهيئة تدابير الصحة النباتية الموضوع تحت بند برنامج العمل: البكتيريا.

11-2012 قدمت المسودة الأولى إلى فريق الخبراء الفني المعني بإعداد بروتوكولات التشخيص (اجتماع).

2013-06 قدمت المسودة إلى الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص (اجتماع).

2014-05 وافقت لجنة المعايير على مشاورة الأعضاء (2014_eSC_May_08).

2014-07 مشاورة الأعضاء.

12-2015 استعرض فريق صياغة بروتوكول التشخيص مسودة بروتوكول التشخيص والردّ على تعليقات الأعضاء.

03-2016 صدر قرار إلكتروني عن الفريق الفني المعني ببروتوكولات التشخيص للموافقة على اعتماده (2016_eTPDP_Mar_01)

05-2016 صدر قرار إلكتروني عن لجنة المعايير للموافقة على تقديمه لفترة الإشعار الخاصة ببروتوكولات التشخيص ومدتها 45 يوماً (2016_eSC_May_12).

07-2016 فترة الإشعار الخاصة ببروتوكولات التشخيص.

08-2016 اعتمدت لجنة المعايير بروتوكول التشخيص نيابة عن هيئة تدابير الصحة النباتية (لم يرد أي اعتراض رسمي).

المعيار الدولي لتدابير الصحة النباتية رقم 27. الملحق 13 *Erwinia amylovora* (2016)، روما، الاتفاقية الدولية لوقاية النباتات، منظمة الأغذية والزراعة.

04-2017 اخذت هيئة تدابير الصحة النباتية ، في دورتها (12)، علما بالتعديلات التحريرية المقترحة من قبل مجموعة مراجعة اللغة العربية

01-2018 راجعت خدمات الترجمة التابعة لمجموعة مراجعة اللغة الخاصة باللغة العربية برتوكول التشخيص هذا وقامت أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات بدمج التعديلات وفقاً لذلك.

03-2018 أمانة الاتفاقية الدولية لوقاية النبات صححت الخطاء في العنوان.

04-2018: الدورة الثالثة عشر لهيئة تدابير الصحة النباتية (CPM-13) في 2018 أحيطت علماً بأن مجموعة مراجعة اللغات راجعت هذا الملحق.

أخر تحديث لتاريخ المطبوع: 12-2018