

# МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

## МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

### ПРОЕКТ ДП X: *Plum pox virus*

(201-)

DRAFT  
DOCUMENT

#### Информация по публикации

<b>Дата этого документа</b>	<b>2011-11-02</b>
<b>Категория документа</b>	Проект нового приложения к МСФМ 27:2006 ( <i>Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов</i> )
<b>Текущий статус документа</b>	Проект для КФМ-7, 2012 2011-10 Решение КС, принятое при согласовании по электронной почте
<b>Источник</b>	Тема Рабочей программы: Вирусы и фитоплазмы, КФМ-1 (2006 г.) (2004-007)
<b>Основные стадии</b>	2010-05 одобрено для консультации странами-членами 2010-06 консультация стран 2011-10 Решение КС, принятое при согласовании по электронной почте
<b>Примечания</b>	Шаблон файла: IPPCStyles, окт. 2011 г. Автоматическая нумерация на полях.



**СОДЕРЖАНИЕ**

1. Информация о вредном организме .....	ДПХ-5
2. Таксономическая информация .....	ДПХ-5
3. Выявление и идентификация .....	ДПХ-6
3.1 Выявление с использованием биологических методов .....	ДПХ-7
3.2 Выявление и идентификация с использованием серологических методов.....	ДПХ-8
3.2.1 Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ .....	ДПХ-8
3.2.2 Твердофазный иммуноферментный анализ .....	ДПХ-9
3.3 Выявление и идентификация с использованием молекулярных методов.....	ДПХ-9
3.3.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией .....	ДПХ-9
3.3.2 Метод иммуноспецифической полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией .....	ДПХ-10
3.3.3 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией .....	ДПХ-10
3.3.4 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.....	ДПХ-11
4. Идентификация штаммов .....	ДПХ-14
4.1 Серологическая идентификация штаммов .....	ДПХ-14
4.2 Идентификация штаммов с использованием молекулярных методов .....	ДПХ-15
4.2.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией .....	ДПХ-15
4.2.2 Метод иммуноспецифической полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией .....	ДПХ-15
4.2.3 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией .....	ДПХ-16
4.2.4 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.....	ДПХ-16
5. Учет.....	ДПХ-17
6. Контактные лица для получения дальнейшей информации .....	ДПХ-18
7. Выражение признательности .....	ДПХ-18
8. Справочные материалы .....	ДПХ-18



## [1] 1. Информация о вредном организме

[2] Шарка (оспа сливы) является одной из наиболее серьезных болезней косточковых плодов. Эта болезнь, вызываемая вирусом *Plum pox virus* (PPV), поражает растения рода Слива (*Prunus*). Особый ущерб оно наносит абрикосу (*P. armeniaca*), сливе европейской (*P. domestica*), персику (*P. persicae*) и сливе китайской (*P. salicina*), поскольку снижает качество и вызывает преждевременное опадение плодов. Затраты на борьбу с шаркой в мире с 1970-х гг. превысили 10 000 миллионов евро (Cambra *et al.*, 2006b).

[3] Впервые шарка была зафиксирована на сливе европейской (*P. domestica*) в Болгарии в 1917-1918 гг. и описана как вирусная болезнь в 1932 г. С тех пор вирус прогрессирующе распространился по значительной части Европы, территории вокруг бассейна Средиземного моря, на Ближний и Средний Восток. Болезнь была обнаружена с ограниченным распространением в Азии, Южной и Северной Америках (ЕОКЗР, 2006; САВІ, 2011).

[4] PPV – вид рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*. Вирусные частицы представляют собой изогнутые палочки размером 700 нм × 11 нм, состоящие из одонитовой молекулы РНК примерно из 10 000 нуклеотидов, покрытой 2 000 субъединицами единственного белка оболочки (García & Cambra, 2007). PPV переносится в полевых условиях тлями неперсистентным способом, однако перевозка инфицированного растительного посадочного материала является главным способом распространения шарки на большие расстояния.

[5] Изоляты PPV можно классифицировать на семь типов или штаммов: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant) и T (Turkish) (Candresse & Cambra, 2006; James & Glasa, 2006; Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). Большинство изолятов PPV относятся к типам D и M. Штаммы D и M могут легко заражать абрикос (*P. armeniaca*) и сливу (*P. domestica*), но различаются по своей способности инфицировать сорта персика (*P. persica*). Штаммы различаются по патогенности; например, изоляты штамма M вызывают более быстрое развитие болезни и ее более серьезные симптомы, чем изоляты штамма D на абрикосе (*P. armeniaca*), сливе (*P. domestica*), персике (*P. persica*) и сливе китайской (*P. salicina*). Изоляты EA географически ограничены территорией Египта, и по их эпидемиологии и биологическим свойствам имеется очень мало информации. В нескольких европейских странах недавно были идентифицированы изоляты PPV, заражающие черешню (*P. avium*) и вишню (*P. cerasus*). Эти изоляты формируют отдельный тип, который был назван PPV-C. В Канаде из растения сливы европейской (*P. domestica*) был выделен атипичный изолят (PPV-W), представляющий собой отличный от других штамм. Кроме того, естественные рекомбинанты между штаммами D и M были описаны как штамм PPV-Rec, который проявляет эпидемиологические свойства, сходные со штаммом D. Недавно в Турции было сообщено о выявлении рекомбинантного изолята второго типа (типа T).

[6] Подробные данные относительно PPV, включая иллюстрации симптомов болезни, можно найти в Barba *et al.* (2011), САВІ (2011), ЕОКЗР (2004), ЕОКЗР (2006), García & Cambra (2007) и PaDIL (2011).

## [7] 2. Таксономическая информация

<b>Научное название:</b>	<i>Plum pox virus</i> (PPV)
<b>Синоним:</b>	Вирус шарки
<b>Таксономическая позиция:</b>	<i>Potyviridae</i> , <i>Potyvirus</i>
<b>Общие названия:</b>	шарка, оспа сливы

## [8] 3. Выявление и идентификация

[9] В естественных условиях PPV легко заражает плодовые деревья рода *Prunus*, которые используются в качестве товарных сортов или подвоев: абрикос (*P. armeniaca*), алычу культурную (*P. cerasifera*), дикий китайский персик (*P. davidiana*), европейскую сливу (*P.*

*domestica*), вишню антипку (*P. mahaleb*), сливу Мариана (*P. marianna*), сливу японскую (*P. mume*), персик (*P. persica*) и сливу китайскую (*P. salicina*), а также их межвидовые гибриды. Иногда могут быть инфицированы также черешня (*Prunus avium*), вишня (*P. cerasus*) и миндаль (*P. dulcis*). Вирус заражает также многие дикорастущие и декоративные виды рода *Prunus*, такие как западная песчаная вишня (*P. besseyi*), пурпурнолистная песчаная вишня (*P. cistena*), карликовый японский миндаль (*P. glandulosa*), слива Дамсона (*P. insititia*), лавровишня лекарственная (*P. laurocerasus*), терн (*P. spinosa*), вишня войлочная (*P. tomentosa*) и миндаль трёхлопастной (*P. triloba*). В экспериментальных условиях РРV может быть перенесен механическим путём на многочисленные виды рода *Prunus* и некоторые травянистые растения (*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* и *Pisum sativum*).

[10] Симптомы РРV могут проявляться на листьях, побегах, коре, лепестках, плодах и косточках в полевых условиях. На листьях они особенно чётко видны в весенний период и выражаются в умеренном изменении цвета листовой пластинки на светло-зелёный, появлении хлоротических пятен, полос и колец, посветлении или пожелтении жилок и даже в деформации листьев. Некоторые из этих симптомов на листьях схожи с симптомами других вирусов, таких как вирус Американского линейного узора сливы (*American plum line pattern virus*). На *Prunus cerasifera* cv. GF 31 видны ржаво-коричневые уплотнения и растрескивание коры. Что касается соцветий, то симптомы могут проявиться на лепестках (обесцвечивание) некоторых сортов персика (*P. persica*), зараженных РРV-М, или на *P. glandulosa* в результате заражения РРV-D. На заражённых плодах появляются хлоротические пятна или слабопигментированные жёлтые кольца или линии. Плоды могут быть деформированы или иметь неправильную форму, и на них под обесцвеченными кольцами могут развиваться бурые или некротические участки. Зараженные плоды могут иметь коричневую или гнилую мякоть и плохое качество. При сильной степени заражения инфицированные плоды преждевременно опадают. Как правило, на плодах ранних сортов развиваются более отчетливые симптомы, чем на поздних сортах. На косточках заражённых растений абрикоса (*P. armeniaca*) развиваются типичные светлые кольца или пятна. Алкогольные и спиртные напитки из зараженных плодов непригодны для продажи из-за нежелательного запаха. Развитие и интенсивность симптомов сильно зависят от растения-хозяина и климатических условий; например, вирус может оставаться латентным в течение нескольких лет в холодном климате.

[11] Общее руководство по методике отбора образцов описано в МСФМ 31:2008 (*Методики отбора образцов от грузов*). Для обнаружения РРV критически важен правильный отбор образцов. При отборе образцов важно учитывать биологию вируса и местные климатические условия, в частности погодные условия в период выращивания. Если присутствуют типичные симптомы, необходимо отбирать соцветия, листья и плоды с симптомами. На бессимптомных растениях, как минимум, образцы следует отбирать с однолетних побегов на середине каждой из основных ветвей, имеющих зрелые или полностью распустившиеся листья (выявление не надежно на побегах до одного года). Образцы следует отбирать как минимум с четырех различных участков (например, четыре ветки или четыре листа) каждого растения; это критически важно в связи с неравномерным распределением РРV. Отбор образцов не должен осуществляться в месяцы с наиболее высокими температурами. Результаты анализов образцов, собранных осенью, менее достоверны, чем анализы образцов, отобранных ранней весной. Растительный материал предпочтительно собирать с внутренних частей кроны дерева. В весенний сезон в качестве образцов могут быть использованы цветки, молодые побеги с полностью распустившимися листьями или плоды. Летом и осенью для проведения анализа могут быть использованы зрелые листья и кожица зрелых плодов, которые отбирают в поле или на упаковочном предприятии. Цветки, листья, побеги и кожицу плодов можно хранить при температуре 4 °C в течение не более чем 10 дней перед тестированием. Плоды могут храниться при температуре 4 °C в течение месяца перед тестированием. Зимой можно отбирать спящие почки или кусочки коры с базальной части побегов, веточек или ветвей, или целые участки отростков.

[12] Выявление PPV может осуществляться с использованием биологических, серологических или молекулярных тестов; идентификация требует серологического или молекулярного тестирования. Серологическое или молекулярное тестирование – это минимальные требования для обнаружения и идентификации PPV (например, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением). Однако, если национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) потребуется дополнительное подтверждение достоверности идентификации PPV (например, выявление в зоне, где вирус не встречается, или выявление в грузе, происходящем из страны, где вредный организм значится как отсутствующий), может быть проведено дополнительное тестирование. Если первоначальная идентификация осуществлялась молекулярным методом, последующие проверки следует проводить с применением серологических методов и наоборот. В последующих тестах может быть проведена идентификация штамма выявленного изолята PPV. В любом случае, в тесты должны быть включены положительные и отрицательные контроли. Рекомендуемые методики описаны в следующих разделах.

[13] В некоторых ситуациях (например, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением) можно одновременно тестировать несколько растений с использованием насыпных образцов от различных растений. Решение по проведению тестирования по одному или нескольким растениям зависит от концентрации вируса в растениях и уровня достоверности, требуемого НОКЗР.

[14] В данном диагностическом протоколе методы (в том числе ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначальный уровень чувствительности, специфичности и/или достигнутой воспроизводимости. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

### [15] 3.1 Выявление с использованием биологических методов

[16] Основными растениями-индикаторами, которые используют для индексирования PPV, являются сеянцы *P. cerasifera* cv. GF31, *P. persicae* cv. GF305, *P. persicae* × *P. davidiana* cv. NemaGuard или *P. tomentosa*. Растения-индикаторы выращивают из семян, которые высаживаются в почвенную смесь с хорошим дренажем и содержат в непроницаемой для насекомых теплице при температуре от 18°C до 25°C до тех пор, пока они не станут пригодными для прививки (обычно 25-30 см высотой и 3-4 мм в диаметре). В качестве альтернативы могут быть привиты сеянцы других видов *Prunus* с индикаторами-отростками растений. Растения-индикаторы должны быть инокулированы прививкой общепринятыми методами, например окулировкой (Desvignes, 1999), с использованием, как минимум, четырех повторностей для каждого растения-индикатора. В процессе инокуляции растения-индикаторы содержатся в тех же условиях и по истечении 3 недель подрезаются на несколько сантиметров выше прививки (Gentit, 2006). Привитые растения следует досматривать на симптомы в течение как минимум 6 недель. Симптомы, в частности хлоротические полосы и рисунок, можно наблюдать на отросших побегах через 3-4 недели, и их необходимо сравнивать с позитивными и здоровыми контрольными образцами. Иллюстрации симптомов, вызванных PPV на растениях-индикаторах, можно найти в работах Damsteegt *et al.* (1997; 2007) и Gentit (2006).

[17] Количественные данные относительно специфичности, восприимчивости или надёжности прививания не опубликованы. Данный метод широко применяется в системах сертификации и считается точным методом выявления. Тем не менее это долговременный тест (для развития симптомов требуется несколько недель после инокуляции), он может использоваться только для тестирования черенков, для его проведения нужны специальные помещения, такие как тепличные пространства с контролем температуры, а симптомы можно перепутать с симптомами присутствия других агентов, передающихся прививкой. Кроме того, есть

бессимптомные штаммы, которые не вызывают симптомов и не обнаруживаются на растениях-индикаторах.

### [18] 3.2 Выявление и идентификация с использованием серологических методов

[19] Для скрининга большого количества образцов настоятельно рекомендуется твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[20] При пробоподготовке примерно 0,2–0,5 г свежего растительного материала измельчают на мелкие кусочки и помещают в подходящую пробирку или пластиковый пакет. Образцы гомогенизируют приблизительно в 4-10 мл (1:20 w/v) в экстракционном буфере с применением электрического гомогенизатора тканей, либо же ручной валик, молоток или похожие приспособления. В состав экстракционного буфера входит фосфатный буфер (PBS) pH 7.2–7.4, содержащий 2% поливинилпирролидона и 0,2% диэтилдитиокарбамата натрия (Cambra *et al.*, 1994) или альтернативный, прошедший валидацию буфер. Растительный материал необходимо тщательно гомогенизировать и сразу же использовать.

#### [21] 3.2.1 Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ

[22] Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (DASI-ELISA), который также называется методом тройных антител (TAS)-ELISA, следует проводить в соответствии с методикой Cambra *et al.* (1994), используя специальные моноклональные антитела такие, как 5B-IVIA, по инструкциям производителей.

[23] 5B-IVIA являются единственными моноклональными антителами, которые продемонстрировали способность выявлять все штаммы PPV, причём с высокой степенью надёжности, специфичности и восприимчивости (Cambra *et al.*, 2006а). В ринг-тесте DIAGPRO, в котором участвовало 17 лабораторий и был использован набор из 10 образцов (заражённых PPV-D, PPV-M и PPV-D+M) и здоровых из Франции и Испании, DASI-ELISA с применением моноклональных антител 5B-IVIA оказался точным на 95% (количество истинно отрицательных и истинно положительных результатов к общему числу проверенных образцов). Точность этого метода была выше, чем при применении метода иммуноспецифической обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (IC-RT-PCR) с точностью 82% и метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с совместной амплификацией (Co-RT-PCR) с точностью 94% (Cambra *et al.*, 2006с; Olmos *et al.*, 2007). Соотношение истинно отрицательных результатов (число полученных истинно отрицательных результатов к общему числу тестируемых здоровых растений), выявленных в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, составило 99,0%, в сравнении с методами RT-PCR в режиме реального времени с использованием очищенных нуклеиновых кислот (89,2%), отпечатка тканей (98,0%) или иммуноспецифической RT-PCR (96,1%). В работе Carote *et al.* (2009) сообщалось также, что с 98,8% вероятностью сероположительные результаты, полученные в зимний период в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, были истинно положительными.

#### [24] 3.2.2 Твердофазный иммуноферментный анализ

[25] Обычные или биотин/стрептавидиновые системы DAS-ELISA следует применять с использованием наборов на основе специфичных моноклональных антител 5B-IVIA или поликлональных антител, для которых установлена способность выявлять все штаммы PPV без перекрёстной реакции с другими вирусами и здоровым растительным материалом (Cambra *et al.*, 2006а; Carote *et al.*, 2009). Тестирование следует проводить в соответствии с инструкциями производителя.

[26] В то время как моноклональные антитела 5B-IVIA выявляют с высокой степени точности, чувствительности и надёжности все штаммы PPV, некоторые поликлональные антитела недостаточно специфичны и имеют ограниченную чувствительность (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006а). Поэтому рекомендуется использовать дополнительные методы в случаях,



когда применялись поликлональные антитела и НОКЗР требует дополнительного подтверждения идентификации PPV.

### [27] 3.3 Выявление и идентификация с использованием молекулярных методов

[28] Молекулярные методы с использованием обратной транскрипции полиразмерной цепной реакции (RT-PCR) могут требовать больше затрат и времени, нежели серологические, особенно при обширных исследованиях. Тем не менее, молекулярные методы, в особенности RT-PCR в режиме реального времени, как правило, являются более чувствительными, чем серологические методы. Применение RT-PCR в режиме реального времени позволяет также избежать необходимости использования какой-либо процедуры после амплификации (например, гель-электрофореза) и поэтому данный метод быстрее и обладает меньшей вероятностью засорения, чем обычный PCR.

[29] За исключением обратной транскрипции полиразмерной цепной реакции с иммунозахватом (IC-RT-PCR) (в котором выделение РНК не требуется), выделение РНК должно осуществляться при применении должным образом утвержденных протоколов. Образцы следует размещать в индивидуальные пластиковые пакеты для предотвращения перекрестного засорения при инкубировании. В качестве альтернативы стандартного RT-PCR в режиме реального времени, срезы тканей или размягченную массу растительного материала можно иммобилизовать на промокательной бумаге или нейлоновых мембранах и анализировать методом RT-PCR в режиме реального времени (Olmos *et al.*, 2005; Osman and Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). Не рекомендуется анализировать отпечатки растительных экстрактов или срезов тканей обычным методом PCR из-за его меньшей чувствительности по сравнению с методом RT-PCR в режиме реального времени.

[30] В каждом методе описан объем выделяемого образца, который должен быть использован как образец. В зависимости от чувствительности метода минимальная концентрация образца, необходимая для выявления видов PPV, следующая: RT-PCR, 100 гч РНК образец ml-1; RT-PCR с совместной амплификацией, 1 гч РНК образец ml-1; RT-PCR в реальном времени, 2 гч РНК образец ml-1.

#### [31] 3.3.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

[32] В этом методе (RT-PCR) используются праймеры, разработанные Wetzal *et al.* (1991):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

или праймеры, разработанные Levy and Hadidi (1994):

3'NCR sense (5'-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3')

3'NCR antisense (5'-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3').

[33] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: по 1 мкм каждого праймера (P1/P2 или пары праймеров 3'NCR), 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV, 0,5 единицы ДНК Taq полимеразы, 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 1,5 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 0,3% Triton X-100 и 5 мкл образца РНК. Реакцию проводят при следующих термоциклических условиях: 45 минут при 42°C, 2 минуты при 94°C, 40 циклов по 30 секунд при 94°C, 30 секунд либо при 60 °C (праймеры P1/P2), либо при 62°C (праймеры 3'NCR), 1 минута при 72 °C, с окончательным инкубированием в течение 10 минут при 72 °C. Анализ результатов PCR осуществляется с применением гель-электрофореза. Праймеры P1/P2 и 3'NCR продуцируют ампликоны из 243 пар оснований (bp) и 220 bp соответственно.

[34] Методика, описанная в работе Wetzal *et al.* (1991), была апробирована путём проверки изолятов PPV из Средиземноморского региона (Кипр, Египет, Франция, Греция, Испания и Турция). Этот метод способен выявлять 10 гч вирусной РНК, что соответствует 2 000 вирусных частиц

(Wetzel *et al.*, 1991). Метод, разработанный Levy & Hadidi (1994), был апробирован на изолятах PPV из Египта, Франции, Германии, Греции, Венгрии, Италии, Испании и Румынии.

### [35] 3.3.2 Метод иммуноспецифической полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией

[36] Фаза иммунозахвата должна проходить в соответствии с Wetzel *et al.* (1992) с использованием экстрактов соков растений, как описано в разделе 3.2., с использованием индивидуальных пробирок или пластиковых пакетов для предотвращения засорения.

[37] Приготовьте раствор ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) поликлональных антител или специфичных к PPV моноклональных антител (5B-IVIA) в карбонатном буфере pH 9.6. Поместите 100 мкл раствора антител в пробирки PCR и выдерживайте при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 3 часов. Дважды промойте пробирки 150 мкл стерильного PBS-Tween-буфера (промывочный буфер). Дважды промойте пробирки водой без Rnase. Проведите осветление 100 мкл растительного экстракта (см. раздел 3.2) в центрифуге (5 минут при  $15\,500\times g$ ) и внесите надосадочную жидкость в микроцентрифужные пробирки, покрытые антителами. Инкубируйте в течение 2 часов на льду или при  $37^\circ\text{C}$ . Промойте пробирки три раза 150 мкл стерильного PBS-Tween (промывочный буфер). Приготовьте реакционную смесь RT-PCR, как описано в разделе 3.3.1, используя праймеры Wetzel *et al.* (1992), и внесите ее в микроцентрифужные пробирки, покрытые антителами. Проведите амплификацию, как описано в разделе 3.3.1.

[38] IC-RT-PCR обуславливает необходимость использования специфических антител, хотя методы прямых связей могут устранить это требование. IC-RT-PCR с использованием моноклональных антител 5B-IVIA был валидирован в ринг-тесте DIAGPRO, показав 82% точности выявления PPV (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). В работе Capote *et al.* (2009) сообщается, что 95,8% положительных диагнозов, полученных в зимний период с использованием метода IC-RT-PCR с моноклональными антителами 5B-IVIA, были истинно положительными.

### [39] 3.3.3 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией

[40] В данном методе используются праймеры для RT-PCR, разработанные Olmos, Bertolini & Cambra (2002):

Внутренний праймер P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

Внутренний праймер P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

Внешний праймер P10 (5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3')

Внешний праймер P20 (5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3').

[41] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: по 0,1 мкм праймеров P1 и P2, по 0,05 мкм праймеров P10 и P20, 400 мкм dNTPs, 2 единицы обратной транскриптазы AMV, 1 единица ДНК Taq полимеразы, 2 мкл  $10\times$  реакционного буфера, 3 мМоль  $\text{MgCl}_2$ , 5% DMSO и 0.3% Tritona X-100 и 5 мкл образца РНК. RT-PCR осуществляется при следующих термоциклических условиях: 45 минут при  $42^\circ\text{C}$ , 2 минуты при  $94^\circ\text{C}$ , 60 циклов по 15 секунд при  $94^\circ\text{C}$ , 15 секунд при  $50^\circ\text{C}$ , 30 секунд при  $72^\circ\text{C}$  с последующим инкубированием в течение 10 минут при  $72^\circ\text{C}$ .

[42] Реакции RT-PCR совмещают с колориметрическим обнаружением ампликонов, используя универсальный зонд к PPV, меченый 3'-дигоксигенином (5'-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-Digoxigenin-3'; Roche Molecular Biochemicals), как изложено ниже. Денатурируйте амплифицированную кДНК при  $95^\circ\text{C}$  в течение 5 минут и немедленно поместите на лёд. Поместите 1 мкл образца на нейлоновую мембрану. Высушите мембрану при комнатной температуре и облучите проходящим ультрафиолетовым излучением на транс-иллюминатор в течение 4 минут при длине волны 254 нм. Для прегибридизации поместите мембрану в пробирку для гибридизации при  $60^\circ\text{C}$  на 1 час, используя стандартный буфер для гибридизации. Слейте раствор и проведите гибридизацию, смешав зонд, меченый 3'-DIG, со стандартным буфером для гибридизации при конечной концентрации  $10 \text{ пкмоль/мл}^{-1}$  перед

инкубированием в течение 2 часов при 60 °С. Дважды промойте мембрану в течение 15 минут при комнатной температуре 0.5× промывочным раствором. Инкубируйте мембрану 2 минуты в промывочном буфере, а затем вымачивайте 30 минут в 1% блокирующем растворе (1 гр блокирующего реагента, растворенного в 100 мл буфера малеиновой кислоты). Затем инкубируйте мембрану при комнатной температуре с конъюгатом антител к антидигоксигенину с щелочной фосфатазой в рабочей концентрации 1:5 000 (150 единиц на литр<sup>-1</sup>) в 1% блокирующем растворе (масса/объем) в течение 30 минут. Дважды промойте мембрану промывочным раствором в течение 15 минут и уравновесьте в течение 2 минут в детектирующем буфере (100 мМоль Tris-HCl, 100 мМоль NaCl, pH 9.5). Субстратный раствор готовят путем смешивания 45 мкл раствора NBT (75 мг/мл<sup>-1</sup> соли тетраэтилового нитросинего в 70%-м растворе диметилформамиде) и 35 мкл раствора BCIP (50 мг/мл<sup>-1</sup> соли толуидин 5-бromo-4хлоро-3индолилфосфата и 100% диметилформамида) в 10 мл детектирующего буфера. После инкубирования с субстратом, остановите реакцию путем промывки мембраны водой.

[43] Данный метод оказался в 100 раз более чувствительным, чем метод RT-PCR по методике Wetzal *et al.* (1991) (Olmos, Bertolini & Cambra, 2002). Этот метод был валидирован в ринг-тесте DIAGPRO и проявил точность в 94% (Cambra *et al.*, 2006с; Olmos *et al.*, 2007).

### [44] 3.3.4 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

[45] RT-PCR в режиме реального времени можно проводить с использованием красителей TaqMan или SYBR Green I. Описание двух методов с использованием красителя TaqMan для универсального выявления PPV дано в работах Schneider *et al.* (2004) и Olmos *et al.* (2005). Праймеры и зонд с TaqMan, использованные в первой реакции, опубликованы в работе Schneider *et al.* (2004):

Прямой праймер (5'-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3')

Обратный праймер (5'-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3')

Зонд с TaqMan (5'-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3').

[46] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1×реакционная смесь (по 0,2 мМоль каждого dNTP и 1,2 мМоль MgSO<sub>4</sub>), по 200 наноМоль прямого и обратного праймеров, 100 наноМоль зонда TaqMan, 4,8 мМоль MgSO<sub>4</sub> и 0,5 мкл RT/Platinum® Taq mix (Superscript™ One-Step RT-PCR с Platinum® Taq kit (Invitrogen)<sup>1</sup> и 5 мкл образца РНК. RT-PCR проводят при следующих термоциклических условиях: 15 минут при 52°C, 5 минут при 95°C, 60 циклов по 15 секунд при 95°C и 30 секунд при 60°C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей.

[47] Метод Schneider *et al.* (2004) был апробирован путём тестирования изолятов PPV из Соединённых Штатов, штаммов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-M и восьми других видов вирусов. Метод оказался специфичным и позволял стабильно выявлять 10–20 гч вирусной РНК (Schneider *et al.*, 2004). PPV выявлялся этим методом на различных растениях-хозяевах, а также в листьях, побегах, почках и корнях *P. persica*.

[48] Праймеры и зонд с TaqMan, использованные во второй реакции, опубликованы в работе Olmos *et al.* (2005):

Праймер P241 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3')

Праймер P316D (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3')

Праймер P316M (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3')

<sup>1</sup> Использование бренда Invitrogen для Superscript™ One-Step RT-PCR с набором Platinum® Taq в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.

Зонд PPV-DM (5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3').

- [49] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкм праймера P241, по 0,5 мкм праймеров P316D и P316M, 200 наноМоль зонда TaqMan, 1×TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)<sup>2</sup>, 1×MultiScribe & RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems)<sup>3</sup> и 5 мкл образца РНК. RT-PCR проводится при следующих термоциклических условиях: 30 минут при 48°C, 10 минут при 95°C, 40 циклов по 15 секунд при 95°C и 60 секунд при 60 °C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей.
- [50] Метод Olmos *et al.* (2005) был апробирован с использованием трех изолятов каждого из штаммов PPV-D и PPV-M, и оказался в 1 000 раз более чувствительным, чем метод DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA. Пропорция истинно положительных результатов (число истинно положительных результатов к числу метода/количества зараженных PPV растений), правильно определённых методом RT-PCR в режиме реального времени с использованием зонда TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) и очищенных нуклеиновых кислот, составила 97.5%, в сравнении с тестированием отпечатков экстракта сока методом RT-PCR в режиме реального времени (93,6%), методом иммуноспецифической RT-PCR (91,5%) или методом DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA (86,6%) (Capote *et al.*, 2009).
- [51] Varga & James (2005) описали метод с красителем SYBR Green I для одновременного выявления PPV и идентификации штаммов D и M:
- P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')
- PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')
- PPV-FD (5'-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3')
- PPV-FM (5'-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3')
- PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').
- [52] Для обеспечения корректности выполнения анализа рекомендуется использовать следующие праймеры для внутреннего контроля:
- Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')
- Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').
- [53] Используется протокол двухэтапной RT-PCR. Условия реакции обратной транскрипции следующие: 2 мкл от 10 мкм раствора праймера P1, 2 мкл от 10 мкм раствора праймера Nad5-R, 4 мкг всего РНК и 5 мкл воды. Инкубирование при 72 °C в течение 5 минут, затем на льду. Добавить 4 мкл 5×буфера для обратной транскрипции (Invitrogen)<sup>4</sup>, 2 мкл 0,1 Моль DTT, 1 мкл 10 мМоль dNTPs, 0,5 мкл RNaseOUT™ (40 единиц/мкл<sup>-1</sup>) (Invitrogen)<sup>5</sup>, 1 мкл Superscript™ II

---

<sup>2</sup> Использование бренда Applied Biosystems для TaqMan Universal PCR Master Mix и MultiScribe и RNase Inhibitor Mix в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.

<sup>3</sup> См. сноску **Error! Bookmark not defined.**

<sup>4</sup> Использование бренда Invitrogen для буфера обратной транскрипции, RNaseOUT™, Superscript™ II и Platinum® Taq полимеразы ДНК с высокой точностью в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.

<sup>5</sup> См. сноску **Error! Bookmark not defined.**

(Invitrogen)<sup>6</sup> и 2,5 мкл воды. Инкубировать при 42°C в течение 60 минут, а затем в течение 5 минут при 99 °С. 24 мкл реакционной смеси для PCR имеет следующий состав: 400 наноМоль праймера PPV-U, 350 наноМоль праймера PPV-FM, 150 наноМоль праймера PPV-FD, 200 наноМоль праймера PPV-RR, 100 наноМоль праймера Nad5-F, 100 наноМоль праймера Nad5-R, 200 мкм dNTPs, 2 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 1× Karsai буфер (Karsai *et al.*, 2002), 1:42 000 SYBR Green I (Sigma)<sup>7</sup> и 0,1 мкл высококачественной полимеразы ДНК Platinum® Taq (Invitrogen). Реакционную смесь и 1 мкл разбавленной кДНК (1:4) помещают в стерильную пробирку PCR. PCR проводится при следующих термоциклических условиях: 2 минуты при 95 °С, 39 циклов по 15 секунд при 95 °С и 60 секунд при 60 °С. Анализ кривой плавления производится путем инкубирования от 60 °С до 95 °С с шагом 0,1 °С s<sup>-1</sup> с усреднённым показателем сглаживания кривой равным 1 единице. В соответствии с условиями Varga & James (2005), температура плавления для каждого из продуктов следующая:

Универсальная детекция PPV (фрагмент 74 bp): 80,08–81,52 °С

Штамм D (фрагмент 114 bp): 84,3–84,43 °С

Штамм M (фрагмент 380 bp): 85,34–86,11 °С

Внутренний контроль (фрагмент 181 bp): 82,45–82,63 °С.

[54] Метод Varga & James (2005) был апробирован с использованием изолятов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-M, а также неохарактеризованных изолятов PPV с видов *Nicotiana* и *Prunus*.

#### [55] 4. Идентификация штаммов

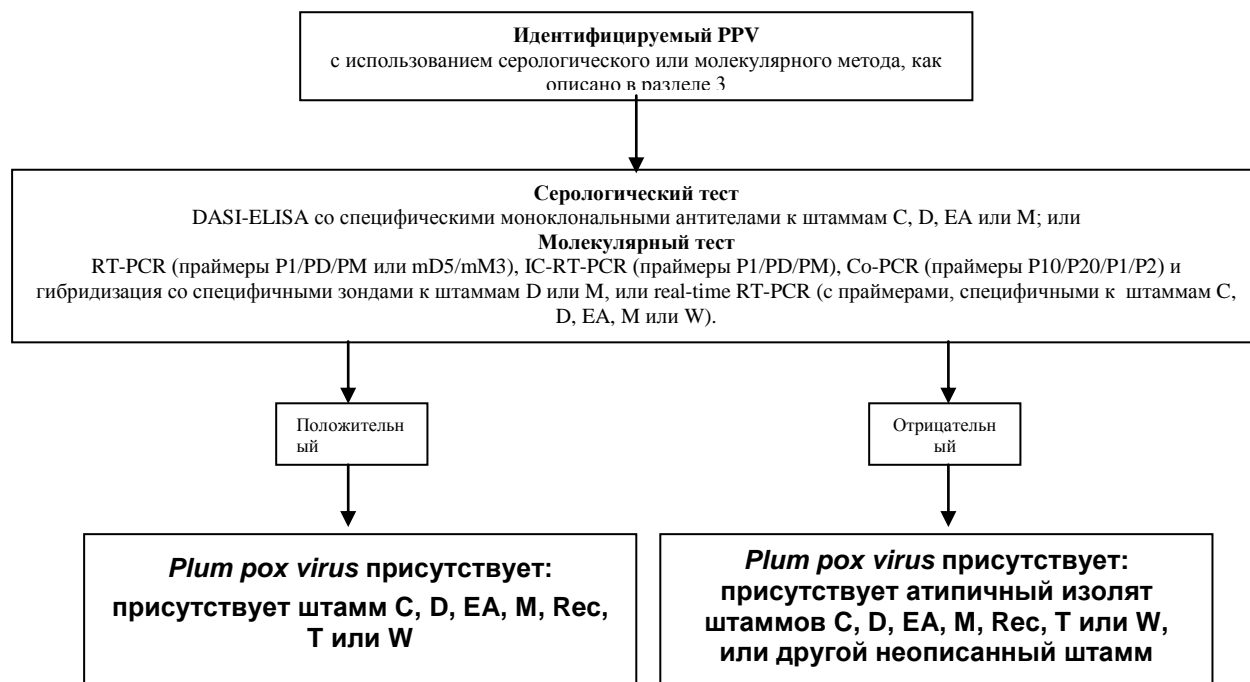
[56] В этом разделе описаны дополнительные методы (с использованием DASI-ELISA, RT-PCR, Co-RT-PCR и RT-PCR в реальном времени) для идентификации штаммов PPV (см. Схему 1). При идентификации PPV установление штамма не является обязательным, однако НОКЗР могут изъявить желание провести идентификацию штамма, например для прогноза его эпидемиологических свойств.

[57] Учитывая вариабельность PPV, используемые методы, за исключением секвенирования или некоторых тестов на основе PCR (см. ниже), могут дать ошибочные результаты при небольшом количестве изолятов. Однако, как правило, описанные ниже серологический и молекулярный методы позволяют надежно дифференцировать штаммы PPV-D и PPV-M (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse & Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006).

---

<sup>6</sup> См. сноску **Error! Bookmark not defined.**

<sup>7</sup> Использование бренда Sigma для SYBR Green I в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.



[58] **Схема 1:** Методы идентификации штаммов *Plum pox virus*.

[59] Дальнейшие исследования могут проводиться в случаях, если НОКЗР потребует дополнительного подтверждения идентификации штамма PPV. Также должно быть произведено полное секвенирование гена PPV или полное или частичное секвенирование белка оболочки, Р3-6К1 и цитоплазматическое включение генов белка в случае присутствия атипичных или неописанных изолятов вируса.

#### [60] 4.1 Серологическая идентификация штаммов

[61] DASI-ELISA с целью дифференциации двух основных штаммов PPV (M и D) должен осуществляться согласно Cambra *et al.* (1994) с использованием моноклональных антител, специфичных к штаммам D и M (Cambra *et al.*, 1994; Boscia *et al.*, 1997) в соответствии с инструкциями производителей.

[62] Данный метод был апробирован в ринг-тесте DIAGPRO, продемонстрировав точность 84% при обнаружении штамма PPV-D и 89% - штамма PPV-M (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). Моноклональные антитела 4D являются специфичными к штамму PPV-D, однако они не реагируют со всеми изолятами штамма PPV-D. Кроме того, моноклональные антитела AL, используемые для выявления PPV-M, реагируют с изолятами, относящихся к штаммам M, Res и T, так как у этих штаммов аналогичная последовательность нуклеотидов в гене белка оболочки. Поэтому необходимы молекулярные методы для дифференциации штаммов M, Res и T, выявленных моноклональными антителами, специфичными к штамму PPV-M.

[63] Серологическая идентификация изолятов PPV штаммов EA и C может осуществляться методом DASI-ELISA с использованием моноклональных антител специфичных к штаммам EA и/или C, описанных Murta *et al.* (1998, 2000). Однако, эти тесты следует валидировать.

#### [64] 4.2 Идентификация штаммов с использованием молекулярных методов

##### [65] 4.2.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

[66] Штаммы PPV-D и PPV-M идентифицируются с использованием праймеров, описанных Olmos *et al.* (1997):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') or PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3').

[67] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкм праймера P1, 1 мкм праймеров PD или PM, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0,5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 1,5 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 0,3% Triton X-100, 2% формамида и 5 мкл образца РНК. RT-PCR проводится при следующих термоциклических условиях: 45 минут при 42°C, 2 минуты при 94°C, 40 циклов по 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 60°C и 1 минута при 72°C с последующим выдерживанием в течение 10 минут при температуре 72°C. Результаты PCR анализируются с помощью гель-электрофореза. Праймеры P1/PD и P1/PM образуют ампликон 198 бп. Метод был апробирован с использованием шести изолятов PPV-D и четырех изолятов PPV-M.

[68] Штамм PPV-Rec идентифицируется с использованием праймеров mD5/mM3, специфичных к штамму PPV-Rec и описанных Šubr *et al.* (2004):

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3').

[69] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав (в модификации Šubr *et al.*, 2004): по 1 мкм каждого праймера, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0,5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3% Triton X-100 и 5 мкл выделенной РНК (см. раздел 3.3). Продукт PCR величиной 605 бп анализируется с помощью гель-электрофореза.

#### [70] 4.2.2 Метод иммуноспецифической полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией

[71] Фаза иммунозахвата должна проходить, как описано в разделе 3.3.2. Реакционная смесь для PCR добавляется непосредственно в покрытые антителами пробирки PCR. Идентификация штаммов PPV-D и PPV-M осуществляется в соответствии с описанием в разделе 4.2.1.

#### [72] 4.2.3 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией

[73] Идентификацию штаммов PPV-D или PPV-M следует осуществлять в соответствии с описанием в разделе 3.3.3, используя зонды, меченные 3'DIG, специфичные для штаммов D и M (Olmos, Bertolini & Cambra *et al.*, 2002):

Зонд, специфичный к штамму PPV-D: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'

Зонд, специфичный к штамму PPV-M: 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'.

[74] Этапы прегибридизации и гибридизации выполняются при 50° С со стандартными буферами для прегибридизации и гибридизации + 30% формамид (для обнаружения штамма PPV-D) и + 50% формамид (для идентификации штамма PPV-M). Используется 2% блокирующий раствор (масса/объем).

#### [75] 4.2.4 Метод полиразмерной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

[76] Штаммы PPV-D и PPV-M специфически идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методике Varga & James (2005) (см. раздел 3.3.4) или методике с красителем TaqMan, описанной Capote *et al.* (2006).

[77] В методе Capote *et al.* (2006) используются следующие праймеры и зонды TaqMan:

PPV-MGB-F праймер (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

PPV-MGB-R праймер (5'-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

MGB-D зонд (5'- FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

MGB-M зонд (5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3').

[78] 25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкМоль каждого праймера, 150 наноМоль FAM зонда MGB-D или MGB-M, 1× TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)<sup>8</sup>, 1× MultiScribe и RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems)<sup>9</sup> и 5 мкл образца РНК (см. Раздел 3.3). RT-PCR проводится при следующих термоциклических условиях: 30 минут при 48°C, 10 минут при 95°C, 40 циклов по 15 секунд при 95°C, 60 секунд при 60°C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей. Метод был апробирован с использованием 12 изолятов PPV-D и PPV-M, а также 14 образцов зараженных обоими штаммами одновременно.

[79] Штаммы PPV-C, PPV-EA и PPV-W специфически идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методу Varga & James (2006):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').

[80] Для обеспечения правильности выполнения анализа рекомендуется использовать следующие праймеры внутреннего контроля:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').

[81] 25 мкл реакционной смеси для RT-PCR имеет следующий состав: 2,5 мкл 1:10 (объем/объем) разведенной в воде выделенной РНК (см. раздел 3.3) и 22,5 мкл мастер-микса. Мастер-микс состоит из следующих компонентов: 2,5 мкл буфера Karsai (Karsai *et al.*, 2002); по 0,5 мкл из 5 мкМ праймеров PPV-U, PPV-RR или P1, Nad5R и Nad5F; 0,5 мкл из 10 мМоль dNTPs; 1 мкл из 50 мМоль MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мкл RNaseOUT™ (40 единиц/μl<sup>-1</sup>; Invitrogen)<sup>10</sup>; 0,1 мкл Superscript™ III (200 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Invitrogen)<sup>11</sup>; 0,1 мкл Platinum® Taq DNA полимеразы с высокой точностью (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>, Invitrogen)<sup>12</sup> и 1 мкл SYBR Green I (Sigma)<sup>13</sup> в 16.1 мкл воды. Реакция проходит при следующих термоциклических условиях: 10 минут при 50°C, 2 минуты при 95°C, 29 циклов по 15 секунд при 95°C и 60 секунд при 60°C. Анализ кривой плавления производится путём выдерживания при температуре от

<sup>8</sup> Использование бренда Applied Biosystems для TaqMan Universal PCR Master Mix и MultiScribe и RNase Inhibitor Mix в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.

<sup>9</sup> См. сноску 8.

<sup>10</sup> Использование бренда Invitrogen для RNaseOUT™, Superscript™ II и Platinum® Taq полимеразы ДНК с высокой точностью в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.

<sup>11</sup> См. сноску 10.

<sup>12</sup> См. сноску 10.

<sup>13</sup> Использование бренда Sigma для SYBR Green I в этом диагностическом протоколе не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не является одобрением КФМ того или иного упомянутого химиката, реагента и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они приводят к тем же результатам.



60 °C до 95 °C с шагом 0.1 °C s<sup>-1</sup> с усреднённым показателем сглаживания кривой равным 1 единице. Температура плавления для каждого из продуктов следующая:

Штамм С (фрагмент 74 bp): 79,84 °C

Штамм ЕА (фрагмент 74 bp): 81,27 °C

Штамм W (фрагмент 74 bp): 80,68 °C

[82] Данный метод был апробирован с использованием изолятов штаммов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-W.

## [83] 5. Учет

[84] Данные, подлежащие учету, перечислены в разделе 2.5 МСФМ 27:2006.

[85] В случаях, когда результаты диагностики имеют значение для других договаривающихся сторон, в частности в случаях несоответствия, и тогда, когда вирус обнаружен на территории впервые, следующая дополнительная информация должна быть сохранена:

- Исходный образец (помеченный таким образом, чтобы обеспечить его отслеживаемость) необходимо хранить в замороженном виде при температуре -80 °C или в лиофилизированном состоянии при комнатной температуре.
- Если возможно, образцы РНК необходимо хранить при температуре -80 °C, а отпечатки растительных экстрактов или срезов тканей – на бумаге или нейлоновых мембранах при комнатной температуре.
- Если возможно, продукты амплификации RT-PCR необходимо хранить при температуре -20 °C.

## [86] 6. Контактные лица для получения дальнейшей информации

APHIS PPQ PHP RIPPS, Molecular Diagnostic Laboratory, BARC Building 580, Powder Mill Road, Beltsville, Maryland 20705, United States of America (Dr. Laurene Levy, e-mail: Laurene.Levy@aphis.usda.gov; Тел.: +1 3015045700; Факс: +1 3015046124).

Equipe de Virologie Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Bordeaux, UMR GD2P, IBVM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France (Dr. Thierry Candresse, e-mail: tc@bordeaux.inra.fr; Тел.: +33 557122389; Факс: +33 557122384).

Faculty of Horticultural Science, Department of Plant Pathology, Corvinus University, Villányi út 29-43, H-1118 Budapest, Hungary (Dr. Laszlo Palkovics, e-mail: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; Тел.: +36 14825438; Факс: +36 14825023).

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská, 84505 Bratislava, Slovakia (Dr. Miroslav Glasa, e-mail: virumig@savba.sk; Тел.: +421 259302447; Факс: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Plant Protection and Biotechnology Centre, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Dr. Mariano Cambra, e-mail: mcambra@ivia.es; Тел.: +34 963424000; Факс: +34 963424001).

Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Italy (Dr. Donato Boscia, e-mail: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; Тел.: +39 0805443067; Факс: +39 0805442911).

Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency (CFIA), British Columbia, V8L 1H3 Sidney, Canada (Dr. Delano James, e-mail: Delano.James@inspection.gc.ca; Тел.: +1 250 3636650; Факс: +1 250 3636661).

Virology Laboratory, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL), BP 21 Lanxade, F-24130 La Force, France (Dr. Pascal Gentit, e-mail: gentit@ctifl.fr; Тел.: +33 553580005; Факс: +33 553 581742).

**[87] 7. Выражение признательности**

**[88]** Проект данного диагностического протокола составили д-ра М. Cambra, А. Olmos и N. Capote, IVIA (смотрите предыдущий раздел); Mr. N.L. Africander, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Private Bag X 5015, Stellenbosch, 75999, South Africa; Dr. L. Levy (смотрите предыдущий раздел); Dr. S.L. Lenardon, IFFIVE-INTA, Cno. 60 Cuadras Km 51/2, Córdoba X5020ICA, Argentina; Dr. G. Clover, Plant Health & Environment Laboratory, Ministry of Agriculture and Forestry, PO Box 2095, Auckland 1140, New Zealand; и Ms. D. Wright, Plant Health Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ, United Kingdom.

**[89] 8. Справочные материалы**

- Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. & Cambra, M.** 2011. *Plum pox virus*. In: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chapter 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 pp.
- Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta, A., DiTerlizzi, B. & Savino, V.** 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477–480.
- CABI.** 2011. Crop Protection Compendium. <http://www.cabi.org/cpc/>, accessed 26 October 2011.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. & Sanz, A.** 1994. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 569–577.
- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T. & Capote, N.** 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 254–261.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G.** 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 202–204.
- Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M.T., Africander, N.L., Levy, L., Lenardon, S.L., Clover, G. & Wright, D.** 2006c. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–191.
- Candresse, T. & Cambra, M.** 2006. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 239–246.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C. & Cambra, M.** 2009. Direct sample preparation methods for detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1–6.
- Capote, N., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Asensio, M., Olmos, A. & Cambra, M.** 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320–325.
- Damsteegt, V.D., Scorza, R., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M. & Gildow, F.E.** 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18–23.
- Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E. & Levy, L.** 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329–332.
- Desvignes, J.C.** 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, CTIFL, Centr'imprint. 202 pp.
- EPPO.** 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 247–256.
- EPPO.** 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 205–218.

- García, J.A. & Cambra, M.** 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. *Plant Viruses*, 1: 69–79.
- Gentit, P.** 2006. Detection of *Plum pox virus*: biological methods. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 251–253.
- ISPM 27.** 2006. *Diagnostic protocols for regulated pests*. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 31.** 2008. *Methodologies for sampling of consignments*. Rome, IPPC, FAO.
- James, D. & Glasa, M.** 2006. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 247–250.
- Karsai, A., Müller, S., Platz, S. & Hauser, M.T.** 2002. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–796.
- Levy, L. & Hadidi, A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 595–604.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. & Savino, V.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of plum pox virus. *Acta Virologica*, 42: 248–250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D.** 2000. Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–103.
- Olmos, A., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51–59.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. & Cambra, M.** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. & Asensio, M.** 1997. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127–137.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Z.K. Punja, S. DeBoer and H. Sanfacon, eds. *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227–249. Wallingford, UK and Cambridge, USA, CAB International. 574 pp.
- Osman, F. & Rowhani, A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.
- PaDIL.** 2011. <http://old.padil.gov.au/pbt/>, accessed 26 October 2011.
- Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. & Frederick, R.D.** 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–105.
- Šubr, Z., Pittnerova, S. & Glasa, M.** 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173–176.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. & Çağlayan, K.** 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121–126.
- Varga, A. & James, D.** 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213–220.
- Varga, A. & James, D.** 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146–153.

- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J.** 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27–37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. & Dunez, J.** 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355–365.