



Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций



Международная конвенция по карантину и защите растений
Защита растительных ресурсов мира от вредных организмов

ДП 15: Вирус tristeza цитрусовых

Эта страница намеренно оставлена пустой

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 15: *Вирус tristeza цитрусовых*

Принят в 2016 году; опубликован в 2019 году

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	3
2.	Таксономическая информация	4
3.	Выявление и идентификация.....	4
3.1	Перечень растений-хозяев.....	5
3.2	Симптомы	5
3.3	Метод растений-индикаторов	6
3.4	Отбор и подготовка образцов для серологического и молекулярного анализа	7
3.4.1	Отбор образцов.....	7
3.4.2	Подготовка отпечатков образцов тканей	8
3.4.2.1	Подготовка отпечатков образцов тканей для серологического анализа	8
3.4.2.2	Подготовка отпечатков образцов тканей тли для молекулярного анализа	8
3.4.3	Подготовка растительных экстрактов для серологической или молекулярной амплификации	8
3.5	Серологический анализ	9
3.5.1	Прямой ИФА образцов отпечатков тканей.....	9
3.5.2	ИФА сэндвич-типа	10
3.6	Молекулярный анализ.....	10
3.6.1	Очистка РНК, иммунозахват и синтез комплементарной ДНК.....	11
3.6.1.1	Очистка РНК.....	11
3.6.1.2	Иммунозахват	11
3.6.1.3	Синтез кДНК	11
3.6.2	ОТ-ПЦР с иммунозахватом.....	11
3.6.3	Вложенная ОТ-ПЦР с иммунозахватом в одной закрытой пробирке.....	12
3.6.4	Общие соображения относительно классической и гнездовой ОТ-ПЦР	12
3.6.5	ОТ-ПЦР в реальном времени	13
3.6.7	Интерпретация результатов классической ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени	14
3.6.1	Контроли для молекулярного анализа	14
3.6.7.1	Классическая ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР с иммунозахватом	15
3.6.7.2	ОТ-ПЦР в реальном времени	15
3.7	Валидация путем исследования эффективности анализа.....	15
4.	Идентификация агрессивных штаммов CTV	16

4.1	Метод растений-индикаторов	17
4.2	Серологический анализ с использованием СТВ-специфичного моноклонального антитела МСА13.....	17
4.2.1	Прямой ИФА образцов отпечатков тканей.....	17
4.2.2	ИФА сэндвич-типа	17
5.	Данные	17
6.	Контактные адреса для дополнительной информации	18
7.	Выражение благодарности.....	18
8.	Библиография.....	19
9.	Рисунки.....	22

1. Информация о вредном организме

Вирус тристезы цитрусовых (CTV, *Citrus tristeza virus*) является возбудителем одной из наиболее серьезных болезней цитрусовых, которая изменила ход развития производства данных культур (Moreno *et al.*, 2008). Термин "тристе́за" (от португальского "tristeza" – "грусть, меланхолия") применяется для обозначения увядания многих видов цитрусовых, привитых на подвое *Citrus aurantium* (апельсин горький) или *Citrus limon* (лимон). Несмотря на то что тристе́за поражает главным образом место прививки (Román *et al.*, 2004), некоторые штаммы CTV вызывают другие симптомы, в том числе бороздчатость древесины, карликовость, снижение плодоносности и ухудшение качества плодов у многих товарных сортов, даже когда прививка проводится на подвоях, устойчивых к тристезе.

Местом происхождения CTV, вероятно, является Малайзия и другие страны Юго-Восточной Азии, предполагаемой родины цитрусовых. С течением времени, за счет перемещений зараженного посадочного материала, вирус распространился почти во все страны, выращивающие цитрусовые. В последующем локальное распространение различными видами тлей-переносчиков стало причиной возникновения обширных вспышек данной болезни.

Сообщения о гибели деревьев, привитых на растениях апельсина горького, впервые поступили из Южной Африки в начале XX века и из Аргентины и Бразилии в 1930-х годах. Причиной, по всей вероятности, являлся завоз CTV-инфицированных растений, которые были заражены тлей *Toxoptera citricida* Kirkaldy, являющейся активным переносчиком вируса. Увядание деревьев, привитых на подвое апельсина горького, под воздействием CTV приводило к их гибели или потере плодоносности (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a). Вспышки CTV отмечались в Соединенных Штатах Америки, некоторых странах Карибского бассейна и Средиземноморья (особенно в Италии и Марокко). Ущерб от CTV был причинен около 38 млн деревьев в странах Южной и Северной Америки (в основном в Аргентине, Бразилии, Венесуэле и в штате Калифорния (Соединенные Штаты Америки)), 60 млн деревьев в странах Средиземноморского бассейна (особенно в Испании, где вирус поразил около 50 млн деревьев) и примерно 5 млн деревьев в других регионах. Таким образом, общий ущерб был причинен более 100 млн деревьев. Болезнь тристезы можно регулировать путем использования в качестве подвоя таких видов цитрусовых, которые индуцируют устойчивость к вирусу. Некоторые наиболее агрессивные штаммы CTV вызывают у определенных сортов цитрусовых бороздчатость древесины вне зависимости от использованного подвоя. Заражение данными агрессивными штаммами сильно влияет на качество плодов и урожайность миллионов деревьев в большинстве предприятий по выращиванию цитрусовых по всему миру, за исключением хозяйств в странах Средиземноморского бассейна, где данные агрессивные штаммы отсутствуют или не являются преобладающими. В качестве эффективной меры борьбы с бороздчатостью древесины некоторые цитрусовые хозяйства применяют метод так называемой перекрестной защиты – профилактической инокуляции деревьев штаммами CTV, вызывающими легкую форму болезни (Broadbent *et al.*, 1991; da Graça and van Vuuren, 2010).

CTV – это самый широко распространенный и наиболее сложный по структуре представитель рода *Closterovirus* (Moreno *et al.*, 2008). Вирионы имеют извитую нитчатую форму, длину в 2000 нм и 11 нм в диаметре; геном представлен несегментированной, положительно-полярной, одноцепочечной РНК. Геном CTV содержит 12 открытых рамок считывания, кодирующих не менее 17 белков, и 2 нетранслируемые области. Открытые рамки считывания 7 и 8 кодируют белки с молекулярным весом примерно 27,4 кДа (P27) и 24,9 кДа (P25), идентифицированные как капсидные белки. Разнообразие CTV выражено в большей степени, чем предполагалось ранее; новые генотипы возникли из предковой популяции или образовались в результате рекомбинации с ранее описанными штаммами (Harper *et al.*, 2008). Популяции CTV в цитрусовых деревьях по своей природе являются квазивидами: это сложные комбинации вирусных генотипов и дефектных вирусных РНК, образующиеся в течение длительного процесса вегетативного размножения вирусных изолятов посредством прививки и смешивания данных изолятов с изолятами, которые переносятся тлей. Это приводит к формированию изолятов CTV,

содержащих популяцию с различными вариантами генетической последовательности, одна из которых обычно преобладает (Moreno *et al.*, 2008).

Опытным путем было установлено, что CTV легко передается посредством прививки здорового цитрусового растения на зараженный подвой. В естественных условиях он переносится определенными видами тли полуперсистентно. В мировом масштабе наиболее выраженной способностью к переносу CTV обладает *T. citricida*. Данный вид тли широко распространен в Азии, Австралии, странах Африки к югу от Сахары, в Центральной и Южной Америке, в странах Карибского бассейна, в штате Флорида (Соединенные Штаты Америки), на севере материковой части Испании и Португалии, а также на островах архипелага Мадейра (Itharo *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008). Однако в Испании, Израиле, некоторых цитрусоводческих регионах штата Калифорния (Соединенные Штаты Америки) и на всех территориях, где отсутствует *T. citricida*, основным переносчиком является *Aphis gossypii* Glover (Yokomi *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a; Marroquín *et al.*, 2004). Был проведен сравнительный анализ влияния данных видов тлей-переносчиков на распространение CTV (Gottwald *et al.*, 1997). В качестве переносчиков CTV описаны также другие виды тлей (Moreno *et al.*, 2008), в том числе *Aphis spiraeicola* Patch, *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonsicolombe), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis craccivora* Koch и *Uroleucon jaceae* (Linnaeus). Согласно результатам экспериментальных исследований по переносу, вышеперечисленные виды переносят CTV с меньшей степенью эффективности по сравнению с *T. citricida* и *A. gossypii*, однако в некоторых регионах они являются доминирующими и поэтому, по всей вероятности, активно участвуют в распространении CTV, компенсируя слабую способность к переносу за счет своей численности (Marroquín *et al.*, 2004).

Были исследованы временные и пространственные характеристики распространения CTV в цитрусовых хозяйствах различных стран мира (Gottwald *et al.*, 2002). Результаты данных исследований со всей объективностью свидетельствуют о том, что от инокуляции первичного источника CTV до вспышки тристезы может пройти длительное время (Garnsey and Lee, 1988).

2. Таксономическая информация

Название:	Вирус тристезы цитрусовых (сокр. CTV)
Синонимы:	<i>Citrus tristeza virus</i>
Таксономическое положение:	<i>Closteroviridae</i> , <i>Closterovirus</i>
Общепринятое название:	Тристеза Тристеза, вирус тристезы цитрусовых

3. Выявление и идентификация

Выявление и идентификация CTV производится с помощью методов биологического, серологического и молекулярно-генетического анализа (рис. 1 и 2). Применение любого из методов является минимальным требованием для выявления и идентификации CTV (например, в ходе рутинной диагностики вредного организма при его широкой распространенности в стране). В тех случаях, когда национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) необходимо идентифицировать CTV с высокой достоверностью (например, при выявлении на территории, где вирус ранее не встречался, или в грузе, прибывшем из страны, где по официальным заявлениям данный вид отсутствует), требуется проведение дополнительного анализа. Если первоначально идентификация была проведена посредством молекулярно-генетического анализа, в дальнейшем исследовании необходимо использовать методы серологического анализа, и наоборот. С помощью дополнительного анализа можно также идентифицировать присутствующий штамм CTV, и в таком случае может потребоваться секвенирование ампликонов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для обеспечения достоверности любого анализа следует в обязательном порядке включать положительные и отрицательные контроли в процедуру его проведения. Рекомендуются методы биологического, серологического и молекулярно-генетического анализа описаны в последующих разделах. Схема процесса определения видовой принадлежности CTV приведена на рисунке 2.

В данном диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химических реактивов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут являться подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру утверждения.

3.1 Перечень растений-хозяев

В естественных условиях CTV легко заражает большинство видов *Citrus* и *Fortunella*, а также некоторые восприимчивые к CTV виды, принадлежащие к близким к цитрусовым родам растений семейства Rutaceae, а именно: *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hespertusa*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* и *Swinglea* (Duran-Vila and Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). Большинство клонов понцируса трелисточкового (*Poncirus trifoliata*) и многие его гибриды, а также кинкан толстолистный (*Fortunella crassifolia*) и некоторые разновидности помело (*Citrus grandis*) устойчивы к большинству штаммов CTV (Moreno *et al.*, 2008). Поэтому в данных видах CTV отсутствует или присутствует в крайне низких концентрациях. Среди культурных сортов, наиболее восприимчивых к CTV в естественных условиях, можно отметить мандарин (*Citrus reticulata*), апельсин (*Citrus sinensis*) и персидский лайм (*Citrus latifolia*), за которыми по степени восприимчивости следуют грейпфрут (*Citrus paradisi*), мандарит уншиу (*Citrus unshiu*) и *C. limon*. Среди видов, применяемых в качестве подвоя, высокой восприимчивостью к естественному заражению CTV отличаются *Citrus macrophylla*, *Citrus volkameriana*, *Citrus reshni* (мандарин Клеопатра) и *Citrus limonia* (рангпур), в то время как цитранж Карризо и Тройер (гибриды апельсина и понцируса трехлисткового) и *C. aurantium* подвергаются заражению редко. Подвои *P. trifoliata* и *C. paradisi* × *P. trifoliata* (цитрусовый гибрид) устойчивы к большинству штаммов CTV. В качестве экспериментальных нецитрусовых растений-хозяев применяются *Passiflora gracilis* и *Passiflora coerulea*.

3.2 Симптомы

Выраженность симптоматики у цитрусовых растений, зараженных CTV, варьирует в широких пределах и зависит от условий окружающей среды, вида растения-хозяина и агрессивности штамма CTV. Кроме того, вирус может в течение ряда лет оставаться в латентном состоянии. Некоторые штаммы CTV обладают слабой патогенностью и не вызывают заметных эффектов у большинства коммерческих видов цитрусовых, в том числе прививаемых на *C. aurantium*. В целом, особенно высокую устойчивость к инфекции CTV демонстрируют мандарины. *C. sinensis*, *C. aurantium* (в качестве сеянца, а не подвоя), *Citrus jambhiri* (дикий лимон) и *C. limonia* обычно характеризуются бессимптомным течением инфекции, однако могут реагировать на некоторые агрессивные штаммы. Среди цитрусовых, демонстрирующих симптоматику, можно отметить лайм, грейпфрут, некоторые сорта помело, макрофиллы и апельсина, некоторые гибриды цитрусовых и отдельные родственные цитрусам виды из семейства Rutaceae, упомянутые в разделе 3.1.

В зависимости от штамма CTV, вида цитрусовых или сочетания подвоя и привоя, вирус может либо не вызывать никаких симптомов, либо поражая растения может вызывать развитие одного из трех симптомов: тристезтристеа; ямчатость древесины; желтуха сеянцев, возникающая чаще в тепличных условиях. Проявления этих трех симптомов описаны в последующих пунктах. На рисунке 1 показаны основные симптомы, свойственные инфекции CTV.

Одно из наиболее важных в экономическом отношении проявлений CTV-инфекции – это тристеа ("болезнь места прививки"), которая характеризуется увяданием деревьев, привитых на померанец или лимон. При этом привои апельсина, мандарина и грейпфрута отстают в росте, становятся хлоротичными и нередко погибают через несколько месяцев или лет (то есть медленно увядают), в то время как на других привоях наблюдается быстрое увядание или

коллапса уже в первые дни после проявления симптоматики. Причиной поражения является воздействие вируса на физиологические процессы во флоэме восприимчивого подвоя в непосредственной близости от места прививки. При медленном увядании у деревьев обычно появляется выпуклость над местом прививки, темная линия в месте соединения привоя и подвоя, а также обратная мелкая бороздчатость на внутренней поверхности коры подвоя померанца. У восприимчивых растений часто наблюдаются такие симптомы, как угнетение роста, деформация (вогнутость) листьев, посветление жилок, хлоротичность листьев, бороздчатость древесины и уменьшение размеров плодов. Однако некоторые изоляты вируса, особенно в citrusовых хозяйствах стран Средиземноморского бассейна, не вызывают симптомов увядания в течение многих лет после заражения, даже на деревьях, привитых на померанце.

Агрессивные штаммы CTV могут обуславливать тяжелое поражение деревьев, индуцируя ямчатость древесины ствола и ветвей лайма, грейпфрута и апельсина. Бороздчатость древесины иногда приводит к бугристой или жилистой деформации ствола и ветвей взрослых деревьев, появлению глубоких борозд под деформированными участками коры, а также к снижению урожайности и качества плодов. Подвой *Citrus macrophylla* тяжело поражаются большинством штаммов CTV: развивается бороздчатость древесины, уменьшающей уровень жизнеспособности деревьев.

Синдром пожелтения сеянцев характеризуется угнетением роста, появлением хлоротичных или бледных листьев, недоразвитой корневой системой и прекращением роста деревьев, привитых на сеянцах померанца, грейпфрута и лимона, выращенных в тепличных условиях (20–26 °C).

3.3 Метод растений-индикаторов

Задачей метода растений-индикаторов является выявление CTV в новых партиях или выборках растений или в отдельных образцах растений в ходе оценки их санитарного состояния, а также оценка уровня агрессивности изолята на сеянцах *Citrus aurantifolia* (лайм), *C. macrophylla* или *Citrus paradisi* Macfadyen (грейпфрут Дункан). Индикатором является привой, инокулированный по обычной методике и хранящийся в обычных условиях (Roistacher, 1991) в 4–6 экземплярах (или в 2–3 экземплярах при невозможности отбора достаточного числа образцов). Появление на этих чувствительных индикаторных растениях после их прививки любого из таких симптомов, как посветление жилок молодых листьев, вогнутость или деформация листьев, укороченность междоузлий, бороздчатость древесины или пожелтение сеянцев, является свидетельством CTV-инфекции. Появление симптомов сравнивается у растений с положительными и отрицательными контролями. С изображениями симптомов, вызываемых CTV на индикаторных растениях, можно ознакомиться в работах Roistacher (1991) и Moreno *et al.* (2008).

Метод растений-индикаторов широко применяется в сертификационных схемах, поскольку считается точным и достоверным методом выявления новых или необычных штаммов вируса. Однако данный метод имеет определенные недостатки: он не относится к числу ускоренных методов анализа (развитие симптомов происходит в течение 3–6 месяцев после инокуляции); его можно использовать только для анализа привоя; он требует наличия специальных помещений, таких как изолированная от доступа насекомых теплица с регулируемой температурой; необходимо наличие персонала для выращивания здоровых и сильных растений-хозяев, на которых появятся соответствующие симптомы, а также опытных сотрудников для точной оценки симптоматики, которую легко спутать с проявлениями других болезней, передаваемых патогенами при прививке. Кроме того, использование индикаторных растений не позволяет выявлять бессимптомные (латентные) штаммы CTV (например, К-штамм CTV, описанный в работе Albertini *et al.* (1988)).

Имеется мало опубликованных количественных данных о специфичности, чувствительности и других диагностических параметрах, а также о достоверности биологических методов биологического анализа для выявления, диагностики или идентификации CTV при привое растений-индикаторов (индикации). В работах Cambra *et al.* (2002) в рамках проекта "Европейские диагностические протоколы" (DIAGPRO), а также Vidal *et al.* (2012) было

проведено сравнение индикации на лайме с прямым иммуноферментным анализом (ИФА) тканевого отпечатка (раздел 3.5.1) (с использованием моноклональных антител 3DF1 + 3CA5) и с ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени на тканевом отпечатке (раздел 3.6.5). В работах было сделано заключение о том, что каждый из данных двух лабораторных методов анализа можно применять вместо традиционного метода растений-индикаторов с на лайме для выявления CTV.

3.4 Отбор и подготовка образцов для серологического и молекулярного анализа

3.4.1 Отбор образцов

Общие рекомендации по методикам отбора образцов содержатся в МСФМ 31 (*Методики отбора образцов от грузов*), а применительно к отбору образцов для анализа на CTV – в работе Cambra *et al.* (2002). Отбор образцов соответствующим образом имеет важнейшее значение для выявления и идентификации CTV с помощью методов биологического, серологического или молекулярно-генетического анализа. При отклонении от принятой схемы отбора образцов при применении эффективного диагностического протокола могут генерироваться ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Применительно ко взрослым деревьям стандартный образец включает 5 молодых побегов или плодоножек, 10 полностью распустившихся листьев или 5 цветков либо плодов, собранных с каждой маточной ветви каждого дерева. Для получения высоких концентраций CTV образцы (побеги или полностью распустившиеся листья и плодоножки) с растений апельсина, мандарина, лимона и грейпфрута, произрастающих в зоне умеренного средиземноморского климата, можно отбирать в любое время года, а в тропических и субтропических зонах – лучше всего весной и осенью. В этих климатических зонах летом отмечается пониженная концентрация CTV у растений мандарина уншиу; соответственно, рекомендуемый период отбора образцов включает все периоды вегетации, за исключением наиболее жарких (35–40 °C) летних дней. Однако при необходимости образцы корней можно отбирать и во время жарких периодов. Для отбора образцов подходят также цветки и плоды (если имеются) (Cambra *et al.*, 2002). Наиболее подходящим образцом является ткань плодоножки в области альбеда (в месте соединения ножки с плодом) либо первичный корень. Стандартные требования к отбору образцов включают себя отбор двух молодых побегов или четырех листьев с каждого растения. Для индикации по Ройстакеру (Roistacher, 1991) в любое время года (но желательно в период вегетации) обычно отбирают щепу без почек или даже листья зараженных растений с побегов или ветвей дерева в возрасте не менее года.

Побеги, черешки листьев, плодоножки и цветки до обработки можно хранить при температуре около 4 °C вплоть до 7 дней. Плоды могут храниться в течение месяца. Использование образцов, не соответствующих данным срокам, может привести к снижению концентрации и риску получения ложноотрицательных результатов анализа.

Комбинированные образцы, которые исследуются как один образец при проведении серологического или молекулярно-генетического анализа, можно отбирать совместно (например, два листа или один побег от с 1–10 саженцев либо 10 листьев или 5 побегов с различных участков кроны каждого взрослого дерева). В некоторых ситуациях (например, для рутинного обследования на CTV при его значительной распространенности в стране или регионе) можно одновременно проводить анализ многих видов растений, используя комбинированный образец ряда растений. Выбор метода исследования – индивидуального растения или комбинированных образцов с применением серологического или молекулярно-генетического анализа – зависит от концентрации вируса в растениях, ожидаемой распространенности CTV на изучаемой территории (Vidal *et al.*, 2012), порога выявления, свойственного тому или иному методу анализа, а также уровня достоверности, которого требует НОКЗР.

Тлей (нативных или фиксированных в 70%-м растворе спирта) также можно исследовать на наличие CTV. Насекомых собирают непосредственно из сформировавшихся колоний или из ловушек: рекомендуется использовать всасывающие ловушки, классические желтые чашки

Мерике или клеевые ловушки. Собранные образцы предпочтительно исследовать посредством метода ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием отпечатков образцов тканей (Bertolini *et al.*, 2008) либо других методов молекулярной амплификации (Marroquín *et al.*, 2004).

3.4.2 Подготовка отпечатков образцов тканей

3.4.2.1 Подготовка отпечатков образцов тканей для серологического анализа

Молодые побеги, черешки листьев, плодоножки или завязи аккуратно срезают. Свежесрезанные участки осторожно прижимают к нитроцеллюлозной или эфироцеллюлозной мембране (0,45 мм) и дают полученному отпечатку высохнуть в течение 2–5 мин. Для рутинного серологического анализа следует изготавливать не менее двух отпечатков от каждого отобранного побега (по одному с каждого конца) и каждой плодоножки, а также по одному от каждого черешка листа или завязи. Мембраны с отпечатками можно хранить в сухом и темном месте в течение нескольких месяцев.

3.4.2.2 Подготовка отпечатков образцов тканей тли для молекулярного анализа

Сбор растительного материала рекомендуется производить вручную при помощи ножниц во избежание заражения образцов. С различных участков кроны собирают молодые побеги с полностью раскрывшимися зрелыми листьями. Черешки с двух листьев или побегов придавливают к листу ватмана¹ 3ММ (0,45 мм) или к положительно заряженной нейлоновой мембране. По методике Bertolini *et al.* (2008) несколько частично наслаивающихся друг на друга отпечатков различных листьев помещают на площади примерно 0,5 см² бумаги или мембраны. Отпечаток или след высушивают на воздухе в течение 2–5 мин. Для рутинного анализа методом молекулярной амплификации делают по одному отпечатку каждого отобранного черешка листа. Отдельные особи тлей раздавливают непосредственно на листе ватмана¹ 3ММ или на положительно заряженной нейлоновой мембране с помощью закругленного доньшка пробирки Эппендорфа¹ так, чтобы ткани образца были полностью разрушены (Bertolini *et al.*, 2008). Мембраны с отпечатками или раздавленным биоматериалом можно хранить в сухом и темном месте в течение нескольких месяцев.

В качестве альтернативы традиционному методу приготовления экстракта для подготовки образца были валидированы методы прямого приготовления образца (образцов отпечатков тканей) без приготовления экстракта (Vidal *et al.*, 2012).

3.4.3 Подготовка растительных экстрактов для серологической или молекулярной амплификации

0,2–0,5 г свежего растительного материала режут на мелкие фрагменты с помощью одноразовых бритвенных лезвий или ножниц, обработанных дезинфицирующим раствором во избежание перекрестного заражения образцов, и помещают в подходящую пробирку или пластиковый пакет. Экстракты для серологического анализа можно приготавливать в пробирках или пластиковых пакетах. Образцы для молекулярного анализа следует приготавливать только в индивидуальных пластиковых пакетах во избежание перекрестного заражения. Образец тщательно гомогенизируют в 4–10 мл экстракционного буфера (1:20 масса/объем, если нет иных указаний изготовителя) с помощью электрического гомогенизатора, ручной роликовой мельницы, молотка или иного подходящего инструмента. Для экстракции применяется фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,2–7,4 (NaCl₂, 8 г; KCl, 0,2 г; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г; KH₂PO₄,

¹ В данном диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий реагентов, химикатов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые также могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

0,2 г; дистиллированная вода, 1 л), с добавлением 0,2% натрия диэтилдитиокарбамата (DIECA) или 0,2% меркаптоэтанола, либо другой надлежащим образом валидированный буфер.

3.5 Серологический анализ

Для исследования большого числа образцов в целях выявления и идентификации CTV настоятельно рекомендуется использовать ИФА с применением валидированных моноклональных или поликлональных антител. Производство моноклональных антител, специфичных к CTV (Vela *et al.*, 1986; Pergmar *et al.*, 1990), и других, которые рассматриваются в работе Nikolaeva *et al.*, 1996), решило проблему недостаточной диагностической специфичности, характерную для поликлональных антител (Cambra *et al.*, 2011), и, таким образом, повысило диагностическую чувствительность серологического анализа. Смесь двух моноклональных антител – 3DF1 и 3CA5 – или их рекомбинантных версий (Terrada *et al.*, 2000) позволяет выявить все изоляты CTV, взятые из различных международных коллекций (Cambra *et al.*, 1990). Подробное описание, определение характеристик и валидация этих моноклональных антител приведены в работе Cambra *et al.* (2000a). Как сообщается (Zebzami *et al.*, 1999), в Марокко были получены моноклональные антитела 4C1 и 1D12, смесь которых реагирует на широкий спектр штаммов CTV, однако данных о валидации этого метода не имеется.

3.5.1 Прямой ИФА образцов отпечатков тканей

Прямой ИФА образцов отпечатков тканей (другие названия: ИФА иммунофиксированных отпечатков, DTBIA) выполняют по следующей методике, описанной в работах Garnsey *et al.* (1993) и Cambra *et al.* (2000b). Компания Plant Print Diagnostics SL¹ предоставляет полный набор для данного анализа (валидирован при проведении исследований и в ряде опубликованных работ) на основе моноклональных антител 3DF1 + 3CA5, специфичных к CTV (Vela *et al.*, 1986), включая готовые мембраны с положительными и отрицательными контролями и все необходимые реагенты. Аналогичный, но невалидированный набор на основе антител 4C1 и 1D12 (по Zebzami *et al.*, 1999) доступен от компании Agdia¹.

Мембраны с образцами отпечатков тканей (рекомендуемый размер – примерно 7 × 13 см) помещают в подходящую емкость (кювету, герметичный контейнер или пластиковый пакет), заливают 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в дистиллированной воде и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре или оставляют на ночь (около 16 ч) при 4 °C (последний вариант предпочтителен). На этом этапе рекомендуется осторожно перемешивать смесь. Затем раствор БСА сливают, а мембраны оставляют в той же емкости. Приготавливают конъюгирующий раствор, состоящий из моноклональных антител 3DF1 + 3CA5 в равных концентрациях, связанных с алкалинфосфатазой (примерно 0,1 мкг/мл каждого антитела в PBS), или из гибридных белков 3DF1 scFv-AP/S + 3CA5 scFv-AP/S, экспрессированных в *Escherichia coli* (разведена в соответствующей пропорции в фосфатно-солевом буфере) (Terrada *et al.*, 2000). Конъюгирующий раствор наливают на мембраны, так чтобы он полностью покрыл их, и затем мембраны выдерживают 3 ч при комнатной температуре, слегка взбалтывая. После этого конъюгирующий раствор сливают. Мембраны и контейнер заливают промывным буфером (PBS, pH 7,2–7,4, с 0,05% Твин-20) и промывают встряхиванием (вручную или механическим путем) в течение 5 мин. Промывной буфер сливают, и промывку повторяют дважды. Затем мембраны заливают субстратом для алкалинфосфатазы (таблетки SigmaFast¹ 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат / нитросиний тетразолиевый (BCIP/NBT) в соответствии с инструкцией изготовителя до 0,33 мг/мл NBT и 0,175 мг/мл BCIP) и выдерживают до появления пурпурно-фиолетового окраски положительных контролей (около 10–15 мин). Реакцию останавливают путем промывания мембран обычной водой. Мембраны расправляют на фильтровальной бумаге и оставляют до высыхания. Затем отпечатки изучают под микроскопом при малом увеличении (×10 – ×20). Образование пурпурно-фиолетового преципитата в васкулярных участках растительного материала указывает на наличие CTV.

3.5.2 ИФА сэндвич-типа

ИФА сэндвич-типа выполняют по следующей методике, описанной в работе Garnsey и Cambra (1991). Имеются полные наборы для анализа на основе валидированных моноклональных антител 3DF1 + 3CA5, специфичных к CTV (Plant Print Diagnostics SL¹), и на основе различных поликлональных антител (Agdia¹, Agritest¹, Bioreba¹, Loewe¹, Sediag¹).

Две лунки микротитрационного планшета используются для каждого образца и не менее двух лунок – для положительного и отрицательного контролей. Приготавливают раствор поликлональных или моноклональных (3DF1 + 3CA5) антител (обычно с общей концентрацией иммуноглобулинов 1–2 мкг/мл) в карбонатном буфере, pH 9,6 (Na₂CO₃, 1,59 г; NaHCO₃, 2,93 г; дистиллированная вода, 1 л) и добавляют по 200 мкл в каждую лунку. Планшет выдерживают в течение 4 ч при 37 °С или до следующего дня (около 16 ч) при 4 °С. Лунки троекратно промывают соответствующим буфером (PBS, pH 7,2–7,4, с 0,05% Твин-20). Затем в каждую лунку добавляют по 200 мкл тканевого экстракта (см. раздел 3.4.3). После выдерживания в течение 16 ч при 4 °С планшеты троекратно промывают, как описано в методике прямого ИФА образцов отпечатков тканей (раздел 3.5.1). Приготавливают смеси специфических поликлональных или моноклональных (3DF1 + 3CA5) антител, связанных с алкалинфосфатазой при разведении в необходимой пропорции (примерно 0,1 мкг/мл в PBS с 0,5% БСА) и добавляют по 200 мкл в каждую лунку. После выдерживания в течение 3 ч при 37 °С планшеты вновь промывают, как описано в методике прямого ИФА отпечатков растительных тканей (раздел 3.5.1). Приготавливают 1 мг/мл раствор алкалинфосфатазы (p-нитрофенилфосфат) в субстратном буфере (97 мл диэтаноламина в 800 мл дистиллированной воды, pH доводят до 9,8 с помощью концентрированной соляной кислоты и разбавляют раствор дистиллированной водой до 1000 мл); добавляют по 200 мкл в каждую лунку. Планшеты выдерживают при комнатной температуре и через регулярные промежутки времени считывают результаты при длине волны 405 нм в течение 120 мин, либо следуя инструкциям изготовителя используемых поликлональных антител.

Результат ИФА считается отрицательным, если средняя величина оптического поглощения в каждой из двух лунок, содержащих исследуемый субстрат, составляет <0,1 или <2× от среднего значения поглощения отрицательного контроля экстракта здоровых растений. Результат ИФА считается положительным, если средняя величина оптического поглощения в каждой из двух лунок, содержащих исследуемый субстрат, составляет ≥2× от среднего значения поглощения отрицательного контроля экстракта здоровых растений. При использовании поликлональных антител важно, чтобы отрицательные контроли в максимальной степени соответствовали матрице, исследуемой в том же планшете.

Метод, основанный на применении моноклональных антител 3DF1 + 3CA5, был валидирован в рамках сличительного межлабораторного испытания по программе DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение этого метода с другими методиками и его диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

В то время как определенные комбинации моноклональных антител обладают специфичностью, чувствительностью и достоверностью в выявлении всех штаммов CTV некоторые поликлональные антитела неспецифичны и обладают ограниченной чувствительностью (Cambra *et al.*, 2011). Поэтому в ситуациях, когда для исследования применялись поликлональные антитела, но НОКЗР требует достижения высокой степени достоверности в идентификации CTV, рекомендуется применять дополнительные методы анализа.

3.6 Молекулярный анализ

После того как стала известна полная нуклеотидная последовательность геномной РНК CTV, были разработаны различные диагностические процедуры на основе специфического выявления вирусной РНК, включая молекулярную гибридизацию с комплементарными зондами (к)ДНК или кРНК и ряд методов на основе ОТ-ПЦР (Moreno *et al.*, 2008). Применение методов на основе

ОТ-ПЦР резко повысило чувствительность выявления, позволив проводить количественный анализ копий вирусной РНК в зараженной ткани цитрусового растения или в особях тлей-переносчиков CTV (Bertolini *et al.*, 2008). Использование методик с высокой пропускной способностью, таких как ОТ-ПЦР в реальном времени, не требует какой-либо постамплификационной обработки (например, гель-электрофореза) и поэтому занимает меньше времени и в меньшей степени связано с риском перекрестного заражения по сравнению с классической ПЦР.

Во всех методиках выделения РНК (за исключением ОТ-ПЦР с иммунозахватом, где выделять РНК не требуется) следует использовать надлежащим образом валидированные протоколы. Образцы следует помещать в отдельные пластиковые пакеты во избежание перекрестного заражения во время выделения. В качестве альтернативного варианта можно фиксировать маркированные растительные экстракты, отпечатки растительных тканей или раздавленные ткани растения на бумаге или нейлоновой мембране и проводить ОТ-ПЦР в реальном времени (Bertolini *et al.*, 2008). Не рекомендуется использовать маркированные образцы или отпечатки для проведения классической ПЦР, поскольку она обладает более низкой чувствительностью по сравнению с ОТ-ПЦР в реальном времени, что может стать причиной получения ложноотрицательных результатов.

3.6.1 Очистка РНК, иммунозахват и синтез комплементарной ДНК

3.6.1.1 Очистка РНК

Очистку РНК следует проводить с использованием надлежащим образом валидированных протоколов или готовых наборов реагентов в соответствии с инструкциями изготовителя. Выделенную РНК до ее применения в качестве матрицы можно хранить не более года при -70°C (предпочтительно) или при -20°C . РНК должна храниться в небольших количествах во избежание ее деградации при повторных циклах заморозания-оттаивания.

3.6.1.2 Иммунозахват

Иммунозахват применяют в качестве альтернативы очищению РНК. Для этого приготавливают разведенную смесь антител, содержащую 1 мкг/мл поликлональных антител, специфичных к CTV, или разведение моноклональных антител (3DF1 + 3CA5, 0,5 мкг/мл + 0,5 мкг/мл) в карбонатном буфере, pH 9,6 (см. состав карбонатного буфера в разделе 3.5.2). Смесь антител затем разливают по микропробиркам (100 мкл в каждую), и пробирки выдерживают в течение 3 ч при 37°C . Пробирки с антителами дважды промывают с использованием 150 мкл стерильного промывного буфера (PBS, pH 7,2–7,4, с 0,05% Твин-20; см. состав PBS в разделе 3.4.3). Растительный экстракт (100 мкл) можно просветлить путем центрифугирования или фильтрования через бумажный фильтр или использовать в исходном виде; аликвоты разливают по микропробиркам с антителами. Пробирки выдерживают не менее 2 ч на льду или, альтернативно, в течение 2 ч при 37°C . После этого микропробирки троекратно промывают с использованием 150 мкл стерильного промывного буфера. В промытых пробирках проводят синтез кДНК и амплификацию с помощью ПЦР.

3.6.1.3 Синтез кДНК

Поскольку сохранить исходную структуру РНК во время хранения сложно, рекомендуется синтезировать кДНК, которая может дольше храниться при минимальных температурных требованиях по сравнению с РНК. Имеется ряд коммерческих наборов для синтеза кДНК.

3.6.2 ОТ-ПЦР с иммунозахватом

Согласно методу, указанному в работе Olmos *et al.* (1999), применяются следующие праймеры:

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA -3'

Смесь для ОТ-ПЦР состоит из следующих компонентов: сверхчистая вода, 14,3 мкл; 10× Taq-ДНК-полимеразный буфер, 2,5 мкл; 25 mM MgCl₂, 1,5 мкл; 5 mM дНТП, 1,25 мкл; 4% Triton X-100, 2 мкл; 25 мкМ праймер PIN1, 1 мкл; 25 мкМ праймер PIN2, 1 мкл; диметилсульфоксид (ДМСО), 1,25 мкл; 10 ед/мкл обратная транскриптаза AMV, 0,1 мкл; 5 ед/мкл Taq-ДНК-полимераза, 0,1 мкл. Реакционную смесь (25 мкл) добавляют непосредственно в промытые микропробирки с антителами. Параметры циклов ОТ-ПЦР: 45 мин при 42 °С и 2 мин при 92 °С, затем 40 циклов (при 92 °С в течение 30 с, при 60 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 1 мин); завершающий этап – элонгация при 72 °С в течение 10 мин с последующим охлаждением при 8 °С. Ожидаемая длина ампликона – 131 пара оснований (п.о.).

Метод был валидирован в рамках сличительного межлабораторного испытания по программе DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение с другими методами и диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

3.6.3 Вложенная ОТ-ПЦР с иммунозахватом в одной закрытой пробирке

Согласно методу, указанному в работе Olmos *et al.* (1999), применяются следующие праймеры:

PEX1: 5'-TAA ACA ACA CAC ACT CTA AGG-3'

PEX2: 5'-CAT CTG ATT GAA GTG GAC-3'

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3'

Устройство для разделения микропробирки 0,5 мл для проведения гнездовой ОТ-ПЦР в одной закрытой пробирке соответствует методу, указанному в работе Olmos *et al.* (1999). Мастер-микс для ОТ-ПЦР состоит из двух реакционных смесей:

А (вносят на дно микропробирки): сверхчистая вода, 15,8 мкл; 10× Taq-ДНК-полимеразный буфер, 3 мкл; 25 mM MgCl₂, 3,6 мкл; 5 mM дНТП, 2 мкл; 4% Triton X-100, 2,2 мкл; 25 мкМ праймер PEX1, 0,6 мкл; 25 мкМ праймер PEX2, 0,6 мкл; ДМСО, 1,5 мкл; 10 ед/мкл обратная транскриптаза AMV, 0,2 мкл; 5 ед/мкл Taq-ДНК-полимераза, 0,5 мкл.

В (помещают в верхнюю часть пробирки): сверхчистая вода, 2,6 мкл; 10× Taq-ДНК-полимеразный буфер, 1 мкл; 25 мкМ праймер PIN1, 3,2 мкл; 25 мкМ праймер PIN2, 3,2 мкл.

Параметры циклов ОТ-ПЦР: 45 мин при 42 °С и 2 мин при 92 °С, затем 25 циклов (при 92 °С в течение 30 с, при 45 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 1 мин). По завершении данного первого этапа пробирку встряхивают на вортексе и центрифугируют (6000 об/мин в течение 5 с) для смешивания смеси В с продуктами первой амплификации. Затем пробирку вновь помещают в амплификатор и проводят реакцию со следующими параметрами: 40 циклов (при 92 °С в течение 30 с, при 60 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 1 мин); завершающий этап – элонгация при 72 °С в течение 10 мин с последующим охлаждением при 8 °С. Ожидаемый размер ампликона составляет 131 п.о.

Метод был валидирован в рамках сличительного межлабораторного испытания по программе DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение с другими методами и диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

3.6.4 Общие соображения относительно классической и гнездовой ОТ-ПЦР

В зависимости от используемых реагентов или моделей амплификатора может потребоваться модифицировать и оптимизировать протоколы ОТ-ПЦР.

Если для выявления СТВ применяется классическая ОТ-ПЦР, рекомендуется использовать ее вариант с иммунозахватом. Классическая ОТ-ПЦР без иммунозахвата не обладает достаточной чувствительностью и может давать ложноотрицательные результаты. Не исключено, что на чувствительность стандартной ОТ-ПЦР влияет присутствие ингибиторов.

Результат исследования образца считается отрицательным, если специфичный для СТВ ампликон ожидаемого размера в исследуемом образце не обнаруживается, но выявляется во всех положительных контролях. Результат исследования образца считается положительным, если специфичный для СТВ ампликон ожидаемого размера обнаруживается в исследуемом образце при условии отсутствия амплификации в любом из отрицательных контролей.

3.6.5 ОТ-ПЦР в реальном времени

Описаны два метода ОТ-ПЦР: одна в работе Bertolini *et al.* (2008), вторая – в работе Saponari *et al.* (2008).

Согласно методу, указанному в работе Bertolini *et al.* (2008), применяются следующие праймеры и зонд:

3'UTR1: 5'-CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC-3'

3'UTR2: 5'-ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T-3'

181T: FAM-TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG-TAMRA

Окончательный объем реакционной смеси – 25 мкл. Состав смеси для ОТ-ПЦР в реальном времени: сверхчистая вода, 0,95 мкл; 2× мастер-микс для одноэтапной ОТ-ПЦР AgPath-ID (Applied Biosystems¹), 12,5 мкл; 25× ферментная смесь для ОТ-ПЦР, 1 мкл; 10 мкМ праймер 3'UTR1, 2,4 мкл; 10 мкМ праймер 3'UTR2, 2,4 мкл; 5 мкМ зонд FAM-labelled 181T, 0,75 мкл; 5 мкл РНК, выделенной или высвобожденной с мембраны, добавляют к 20 мкл смеси для ОТ-ПЦР в реальном времени. Параметры циклов реакции: 10 мин при 45 °С и 10 мин при 95 °С, затем 45 циклов (при 95 °С в течение 15 с и при 60 °С в течение 1 мин). Ожидаемый размер ампликона составляет 95 п.о.

Для исследования отпечатков образцов тканей методом ОТ-ПЦР в реальном времени была определена диагностическая чувствительность 0,98, специфичность 0,85, отношение правдоподобия положительного и отрицательного результата исследования – 6,63 и 0,021 соответственно (Vidal *et al.*, 2012). Данные диагностические параметры свидетельствуют о том, что исследование образцов отпечатков тканей при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени является наиболее чувствительным методом анализа по сравнению с прямым ИФА образцов отпечатков тканей, валидируют применение ОТ-ПЦР для рутинного выявления и идентификации СТВ и убедительно подтверждают предпочтительность данного метода для проверки любого растительного материала на предмет отсутствия СТВ. Высокая чувствительность этого метода позволяет точно анализировать комбинированные образцы (до 10 деревьев или саженцев) в качестве одного диагностического образца при проведении анализа в любое время года, а также позволяет исследовать различные виды тлей для выявления низких концентраций СТВ. Дополнительные диагностические параметры валидации ОТ-ПЦР в реальном времени для исследования отпечатков образцов тканей приведены в разделе 3.7.

Согласно методу, указанному в работе Saponari *et al.* (2008), применяются следующие праймеры и зонд:

P25F: 5'-AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC-3'

P25R: 5'-TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA-3'

CTV-CY5: CY5-CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G

Окончательный объем реакционной смеси – 25 мкл. Состав смеси для ОТ-ПЦР в реальном времени: сверхчистая вода, 6,6 мкл; 2× набор для одноэтапной ОТ-ПЦР для проб iScript (Bio-Rad¹), 12,5 мкл; супермикс обратной транскриптазы iScript, 0,5 мкл; 10 мкМ праймер P25F, 1 мкл; 10 мкМ праймер P25R, 2 мкл; 5 мкМ зонд CTV-CY5, 0,4 мкл; 2 мкл РНК, выделенной или высвобожденной с мембраны, добавляют к 23 мкл смеси для ОТ-ПЦР в реальном времени.

Параметры циклов: 2 мин при 55 °С и 5 мин при 95 °С, затем 40 циклов (при 95 °С в течение 15 с и при 59 °С в течение 30 с). Ожидаемый размер ампликона составляет 101 п.о.

Диагностические параметры (чувствительность, специфичность, точность, отношение правдоподобности положительного и отрицательного результата исследования и положительное предсказательное значение заболевания) для данного протокола ОТ-ПЦР в реальном времени не сообщаются.

3.6.7 Интерпретация результатов классической ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени

3.6.1 Контроли для молекулярного анализа

Чтобы результат анализа считался достоверными, в каждой серии изоляции и амплификации нуклеиновых кислот целевого вредного организма или целевой нуклеиновой кислоты должна использоваться соответствующие контроли, выбор которых зависит от типа анализа и требуемого уровня достоверности. Для ОТ-ПЦР, как минимум, следует использовать положительный контроль нуклеиновой кислоты и отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы).

Положительный контроль нуклеиновой кислоты. Данный контроль предназначен для отслеживания эффективности метода анализа (помимо выделения) и, в частности, процесса амплификации при ОТ-ПЦР. Можно использовать предварительно подготовленную (сохраненную) РНК и отпечатки инфицированного CTV растительного материала на мембране. Находящиеся на хранении препараты РНК и CTV следует периодически проверять для определения качества контролей при длительном хранении.

Внутренний контроль. Для ОТ-ПЦР в реальном времени по методу, указанному в работе Saponari *et al.* (2008), в качестве внутреннего контроля в протокол ОТ-ПЦР можно включить мРНК митохондриального гена NADH-дегидрогеназы 5 (*nad5*), чтобы исключить возможность ложноотрицательных результатов в связи с неудачей при извлечении нуклеиновой кислоты или из-за деградации или присутствия ингибиторов ОТ-ПЦР. Поскольку речь идет о целевом растении-хозяине, необходимо следить за тем, чтобы лаборатория не была загрязнена ДНК *nad5*, что привело бы к ложной достоверности при проведении реакции внутреннего контроля.

Отрицательный контроль амплификации (без матрицы). Данный контроль необходим для классической ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Для этого на этапе амплификации добавляют свободную от рибонуклеазы воду для ПЦР, которую использовали при подготовке реакционной смеси.

Положительный контроль выделения. Данный контроль используется для подтверждения достаточного количества и качества выделенной целевой нуклеиновой кислоты для ОТ-ПЦР и того, что целевой вирус поддается обнаружению. Нуклеиновую кислоту выделяют из ткани инфицированного растения-хозяина, из ткани здорового растения или из тканей насекомого, в которые внесли CTV.

При проведении ОТ-ПЦР следует принять меры для предотвращения перекрестного загрязнения посредством жидких и твердых частиц положительного контроля или положительных образцов в воздухе.

Отрицательный контроль выделения. Этот контроль используют для отслеживания заражения во время выделения нуклеиновых кислот и/или перекрестного взаимодействия с тканью растения-хозяина. Контроль включает нуклеиновую кислоту, выделенную из ткани здорового растения-хозяина и затем амплифицированную. Рекомендуются использовать несколько контролей в тех случаях, когда ожидается большое количество положительных образцов.

3.6.7.1 Классическая ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР с иммунозахватом

Патоген-специфичная ОТ-ПЦР считается достоверной только при наличии следующих условий:

- 1) положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит ампликон правильного размера для вируса;
- 2) отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не производят ампликонов правильного размера для вируса.

Если также используются праймеры внутреннего контроля на основе мРНК митохондриального гена NADH (nad5) (прямой: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3', обратный: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3'; продукт – 181 п.о.), то отрицательный контроль выделения (ткань здорового растения) (если используется), положительный контроль и каждый из исследуемых образцов должны производить ампликон длиной 115 п. о. Если образцы не приводят к амплификации с праймерами внутреннего контроля, это может свидетельствовать, например, о том, что выделить РНК не удалось, что нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, что в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, ингибирующие ОТ-ПЦР, либо что РНК деградировала.

Результаты анализа образца считаются положительными, если был произведен ампликон правильного размера.

3.6.7.2 ОТ-ПЦР в реальном времени

Патоген-специфичная ОТ-ПЦР в реальном времени считается достоверной только при наличии следующих условий:

- 1) положительный контроль производит кривую амплификации со специфичными для вируса праймерами;
- 2) отрицательный контроль выделения и отрицательный контроль амплификации не производят кривую амплификации со специфичными для вируса праймерами.

Результаты анализа образца считаются положительными, если была получена типичная кривая амплификации в виде экспоненты. Значение порогового цикла (Ct) необходимо подтверждать в каждой лаборатории при первом проведении анализа.

3.7 Валидация путем исследования эффективности анализа

В рамках сличительного межлабораторного испытания в рамках проекта DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002), проведенного десятью лабораториями с использованием десяти кодированных образцов, включая образцы, инфицированные CTV и образцы, взятые со здоровых растений из коллекции Валенсийского института сельскохозяйственных исследований (IVIA), точность прямого ИФА отпечатков образцов тканей с моноклональными антителами 3DF1 + 3CA5 составила 99% (суммарная доля истинно положительных и истинно отрицательных результатов применения тестируемого метода среди общего числа исследованных образцов). Данный показатель точности был выше, чем при использовании ИФА сэндвич-типа (точность 98%), ОТ-ПЦР с иммунозахватом (94%) и гнездовой ОТ-ПЦР с иммунозахватом в одной закрытой пробирке (89%). Чувствительность прямого ИФА отпечатков образцов тканей составила 0,98, а чувствительность остальных трех вышеперечисленных методов – 0,96, 0,96 и 0,93 соответственно (Vidal *et al.*, 2012). Диагностическая специфичность прямого ИФА отпечатков образцов тканей составила 1,0, а чувствительность остальных трех методов – 1,0, 0,91 и 0,82 соответственно. Положительная прогностическая ценность (доля положительных результатов анализа, при которых действительно было выявлено присутствие болезни; Sackett *et al.*, 1991) прямого ИФА отпечатков образцов тканей составила 1,0, для остальных методов данный показатель составил 1,0, 0,94 и 0,89 соответственно. Отрицательная прогностическая ценность (Sackett *et al.*, 1991) прямого ИФА образцов отпечатков тканей составила 0,97, для остальных методов данный показатель составил 0,95, 0,94 и 0,88 соответственно (Harju *et al.*, 2000).

Было показано, что прямой ИФА тканевых отпечатков с использованием моноклональных антител 3DF1 + 3CA52 является наиболее надежным, простым и экономичным методом рутинного анализа растительного материала для обнаружения CTV, в сравнении с методом растений-индикаторов на мексиканском лайме, ИФА, ОТ-ПЦР с иммунозахватом и гнездовой ОТ-ПЦР с иммунозахватом (Cambra *et al.*, 2002). Метод прямого ИФА тканевых отпечатков был также валидирован Ruiz-García *et al.* (2005). Эти авторы проанализировали метод и показали, что он не менее чувствителен, чем ИФА сэндвич-типа (система позволила выявить 97% инфицированных растений с использованием четырех черешков листьев), но при этом более прост в проведении и является менее затратным. Было проведено сравнение метода прямого ИФА тканевых отпечатков с использованием моноклональных антител 3DF1 + 3CA52 с такими методами, как диагностика при помощи растений-индикаторов на мексиканском лайме и ОТ-ПЦР тканевых отпечатков в реальном времени для выявления CTV (Vidal *et al.*, 2012). По итогам оценки различных диагностических параметров было показано, что наиболее специфичным и точным методом с наивысшей вероятностью послетестового обнаружения заболевания при любом уровне распространенности CTV является метод прямого ИФА тканевых отпечатков.

4. Идентификация агрессивных штаммов CTV

Идентификация штаммов CTV требует проведения биологического, серологического или молекулярно-генетического анализа.

Однако провести достоверную типизацию агрессивности штаммов CTV на основе нуклеиновых кислот не удастся, поскольку CTV является фенотипом. Генетическая природа высокой биологической вариабельности CTV все еще недостаточно изучена (Moreno *et al.*, 2008). Также мало известно о биологической роли данного разнообразия и в особенности об эффектах рекомбинации. Кроме того, не была стандартизирована классификация генотипа (Harper, 2013). Для дифференцирования различных штаммов CTV использовали широкий спектр методов молекулярного анализа, в том числе такие, как молекулярная гибридизация, характеристика двухцепочечной РНК, анализ рестрикционных фрагментов амплифицированной кДНК CTV, амплификация различных участков генома с помощью ПЦР, ПЦР в реальном времени (Moreno *et al.*, 2008; Yokomi *et al.*, 2010), секвенирование генома и повторное секвенирование на микроматрицах. В более недавний период осуществлялись попытки анализа геномной последовательности с помощью иммуноферментного анализа и конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК с помощью капиллярного электрофореза (Licciardello *et al.*, 2012). Однако ни один из этих методов не приобрел практического значения для достоверной классификации распространяющихся в естественных условиях штаммов CTV, и ни один из них не был валидирован; таким образом, применение данных методов ограничено научно-исследовательскими задачами.

Ввиду генетической и биологической вариабельности CTV применение для идентификации штаммов данного вируса иных методов, помимо секвенирования, может давать ошибочные результаты. Методика глубокого секвенирования (другое название – секвенирование нового поколения) может быстро дать информацию о геномной последовательности. Однако нуклеотидную последовательность CTV все еще невозможно соотнести с биологическими свойствами и поведением конкретных штаммов (то есть с их агрессивностью и способностью к передаче). Даже несмотря на то, что штаммы CTV были классифицированы и сгруппированы по параметрам фенотипа, вирулентности, круга растений-хозяев, состава эпитопа и, в более недавний период, по идентичности одного и более генов в геномной последовательности (Moreno *et al.*, 2008), четкой взаимосвязи с биологическим поведением не было найдено (Harper, 2013).

Для получения информации о биологических свойствах конкретного штамма CTV рекомендуется применять следующие методы (рис. 2).

- 1) Метод диагностики с использованием различных растений-индикаторов, таких как *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. sinensis* или *C. paradisi* (сорт Дункан) для оценки

бороздчатости древесины; сеянцы *C. aurantium* или *C. limon* для оценки пожелтения сеянцев (Roistacher, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993).

- 2) Реакция с моноклональными антителами МСА13 (Permar *et al.*, 1990), которые распознают эпитоп, хорошо сохраняющийся в "тяжелых" (агрессивных) штаммах СТВ, но отсутствующий в "легких" (менее агрессивных) штаммах (Parrу, *et al.*, 1993). Реакция с МСА13 сильно взаимосвязаны со способностью вируса вызывать увядание деревьев, привитых на корневых побегах померанца или лимона. Большинство штаммов СТВ, вызывающих ямчатость древесины грейпфрута и апельсина, являются МСА13-положительными.

4.1 Метод растений-индикаторов

Метод растений-индикаторов агрессивных штаммов СТВ применяется согласнометодике, описанной в разделе 3.3.

4.2 Серологический анализ с использованием СТВ-специфичного моноклонального антитела МСА13

4.2.1 Прямой ИФА образцов отпечатков тканей

Компания Plant Print Diagnostics SL¹ предоставляет полный набор для анализа на основе моноклональных антител МСА13, специфичных к СТВ, включая готовые мембраны с положительными и отрицательными контролями и все необходимые реагенты, буферы и субстрат. Анализ проводят следующим образом.

На мембраны наносят и фиксируют тканевые отпечатки, как описано в разделе 3.5.1. Приготавливают раствор специфичных к СТВ моноклональных антител МСА13, связанных с алкалинфосфатазой (примерно 0,1 мкг/мл в PBS), и заливают им мембраны, так чтобы он полностью покрыл их, и затем мембраны выдерживают 3 ч при комнатной температуре, слегка взбалтывая. Промывку и проявление мембран, а также считывание и интерпретацию результатов проводят по методу, описанной в разделе 3.5.1. Как правило, присутствие мелких пурпурно-фиолетовых частиц в васкулярных участках растительного материала указывает на наличие штамма СТВ, обладающего повышенной агрессивностью.

4.2.2 ИФА сэндвич-типа

ИФА сэндвич-типа выполняют по следующему методу, описанному в работе Garnsey и Cambra (1991). Набор для анализа на основе моноклональных антител МСА13, специфичных к СТВ, предоставляет компания Plant Print Diagnostics SL¹.

Нанесение жидкой фазы проводится по методу, описанному в разделе 3.5.2. Специфичные к СТВ моноклональные антитела МСА13, связанные с алкалинфосфатазой, добавляют в качестве конъюгата в надлежащем пропорции (примерно 0,1 мкг/мл в PBS с 0,5% БСА). Выдерживание, промывку, добавление субстрата и интерпретацию результатов проводят по методу, описанной в разделе 3.5.2.

5. Данные

Данные результатов исследований и лабораторные материалы должны храниться, как описано в разделе 2.5 МСФМ 27 (Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут затрагивать интересы других договаривающихся сторон, в особенности при выявленных несоответствиях, а также если вирус выявлен на данной территории впервые, нижеперечисленные дополнительные материалы подлежат хранению с соблюдением отслеживаемости:

- исходный образец (хранить замороженным при –80 °С либо лиофилизировать и хранить при комнатной температуре);

- экстракты РНК (хранить при -80°C) и/или отпечатки образцов тканей и/или маркированные растительные экстракты на бумаге или нейлоновых мембранах (хранить при комнатной температуре);
- продукты амплификации ОТ-ПЦР (хранить при температуре -20°C).

6. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить, обратившись в следующие учреждения:

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) [Центр защиты растений и биотехнологии, Валенсийский институт сельскохозяйственных исследований], Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Mariano Cambra; e-mail: mcambra@ivia.es или mcambra@mcambra.es).

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) [Кафедра здоровья растений, Агрономический факультет, Федеральный университет Риу-Гранди-ду-Сул], Avenida Bento Gonçalves 7712, 91540-000 Porto Alegre, Brazil (Edson Bertolini; e-mail: edson.bertolini@ufrgs.br; тел.: +55 (51) 3308 8100).

APHIS-USDA-PPQ-CPHST, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737, United States (Laurene Levy; e-mail: laurene.levy@aphis.usda.gov; тел.: +1 301 851 2078; факс: +1 301 734 8724).

Citrus Research International (CRI), PO Box 28, 1200 Nelspruit, Mpumalanga, South Africa (S.P. Fanie van Vuuren; e-mail: faniev@cri.co.za).

Alico, Inc., Suite 100, 10070 Daniels Interstate Court, Fort Myers, FL 33913, United States (Marta Isabel Francis; e-mail: mfrancis@alicoinc.com; тел.: +1 863 673 4774).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который, в свою очередь, направит его в Техническую группу по разработке диагностических протоколов (ТГДП).

7. Выражение благодарности

Авторы первого проекта настоящего протокола: М. Cambra (IVIA, Испания (см. предыдущий раздел)), Е. Bertolini (IVIA, Испания (см. предыдущий раздел: адрес в настоящее время – UFRGS)), L. Levy (APHIS-USDA, Соединенные Штаты (см. предыдущий раздел)); S.P.F. van Vuuren (CRI, Южная Африка (см. предыдущий раздел)) и M.I. Francis, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (Уругвай (см. предыдущий раздел: адрес в настоящее время Alico, Inc.)).

Преобладающая часть описанных методик была апробирована в рамках сравнительного межлабораторного испытания по программе DIAGPRO, осуществленного при финансовой поддержке со стороны Европейского союза, или оценена в проектах, финансируемых Национальным научно-исследовательским институтом по сельскохозяйственным и продовольственным технологиям (INIA) и Министерством сельского хозяйства, продовольствия и окружающей среды, Испания.

8. Библиография

Настоящее приложение относится к международным стандартам по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/ru/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Albertini, D., Vogel, R., Bové, C. & Bové, J.M.** 1988. Transmission and pp. preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey & L. Navarro, eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 17–21. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L.** 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219–229.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R. & Lee, R.F.** 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291–316.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.
- Broadbent, P., Bevington, K.R. & Coote, B.G.** 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. In R.H. Bransky, R.F. Lee & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 64–70. Riverside, CA (www.iocv.org/proceedings.html).
- Cambra, M., Boscia, D., Gil, M., Bertolini, E. & Olmos, A.** 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. In A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*, pp. 303–313. St Paul, MN, APS Press. 429 pp.
- Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Gumph, D. & Vela, C.** 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A. & Navarro, L.** 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85–95.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A. & Colomer, M.** 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. In J. da Graça, R.F. Lee & R.K. Yokomi, eds. *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 34–41. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López, A. & Carbonell, E.A.** 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. In J. da Graça, R. Milne & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 69–77. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html).
- Duran-Vila, N. & Moreno, P.** 2000. *Enfermedades de los cítricos*. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) N° 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros and SEF (www.sef.es). 165 pp.
- Garnsey, S.M. & Cambra, M.** 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In C.N. Roistacher, ed. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*, pp. 193–216. Rome, FAO. 286 pp.
- Garnsey, S.M. & Lee, R.F.** 1988. Tristeza. In J.O. Whiteside, S.M. Garnsey & L.W. Timmer, eds. *Compendium of citrus diseases*, pp. 48–50. APS Press. St. Paul, MN. 80 pp.
- Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M. & Henderson, C.T.** 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In P. Moreno, J. da Graça and L.W.

- Timmer, eds. *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 39–50. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. & Borbón, J. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397–404.
- Gottwald, T.R., Polek, M.L. & Riley, K. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. In N. Duran-Vila, R. G. Milne & J.V. da Graça, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 83–94. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html).
- da Graça, J.V. & van Vuuren, S.P. 2010. Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. In A.V. Karasev & M.E. Hilf, eds. *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*, pp. 247–260. Eagan, MN, APS Press. 304 pp.
- Harju, V.A., Henry, C.M., Cambra, M., Janse, J. & Jeffries, C. 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants-DIAGPRO. *EPPO Bulletin*, 30: 365–366.
- Harper, S.J. 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00093.
- Harper, S.J., Dawson, T.E. & Pearson, M.N. 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Australian Plant Pathology*, 37: 379–386.
- Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R. & Alvarez-Alvarez, A. 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana*, 51: 19–21.
- Licciardello, G., Raspagliesi, D., Bar-Joseph, M. & Catara, A. 2012. Characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. *Journal of Virological Methods*, 181: 139–147.
- Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martínez, M.C., Carbonell, E.A., Hermoso de Mendoza, A.H. & Cambra, M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 100: 101–108.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. & Peña, L. 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Powell, C.A., Gumpf, D.J., Garnsey, S.M. & Lee, R.F. 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974–979.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. & Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27: 1564–1565.
- Pappu, H.R., Manjunath, K.L., Lee, R.F. & Niblett, C.L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3641–3644.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. & Lee, R. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224–228.
- Roistacher, C.N. 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*. Rome, FAO. 286 pp.
- Román, M.P., Cambra, M., Juárez, J., Moreno, P., Durán-Vila, N., Tanaka, F.A.O., Alves, E., Kitajima, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Jesús Jr, W.C., Ayres, J.A., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F. & Bové, J.M. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft transmissible, bud union disease. *Plant Disease*, 88: 453–467.
- Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Ochoa-Martínez, D., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E.M., Gutiérrez-E, A., Ramírez-Valverde, G. & Álvarez-Ramos, R. 2005.

- Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. In M.E. Hilf, N. Duran-Vila & M. A. Rocha-Peña, eds. *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 196–204. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Sackett, D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H. & Tugwell, P.** 1991. *Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine*, 2nd edn. Boston, MA, Little Brown and Co. 441 pp.
- Saponari, M., Manjunath, K. & Yokomi, R.K.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 147: 43–53.
- Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. & Cambra, M.** 2000. Fully “Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays” using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337–1344.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M. & Graham, J.H.** 2000. *Compendium of citrus diseases*. St Paul, MN, APS Press. 92 pp.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C. & Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91–96.
- Vidal, E., Yokomi, R.K., Moreno, A., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2012. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*. A model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102: 611–619.
- Yokomi, R.K., Garnsey, S.M., Civerolo, E.L. & Gumpf, D.** 1989. Transmission of exotic citrus tristeza isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease*, 73: 552–556.
- Yokomi, R.K., Saponari, M. & Sieburth, P.J.** 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319–327.
- Zebzami, M., Garnsey, S.M., Nadori, E.B. & Hill, J.H.** 1999. Biological and serological characterization of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 38: 95–100.

9. Рисунки

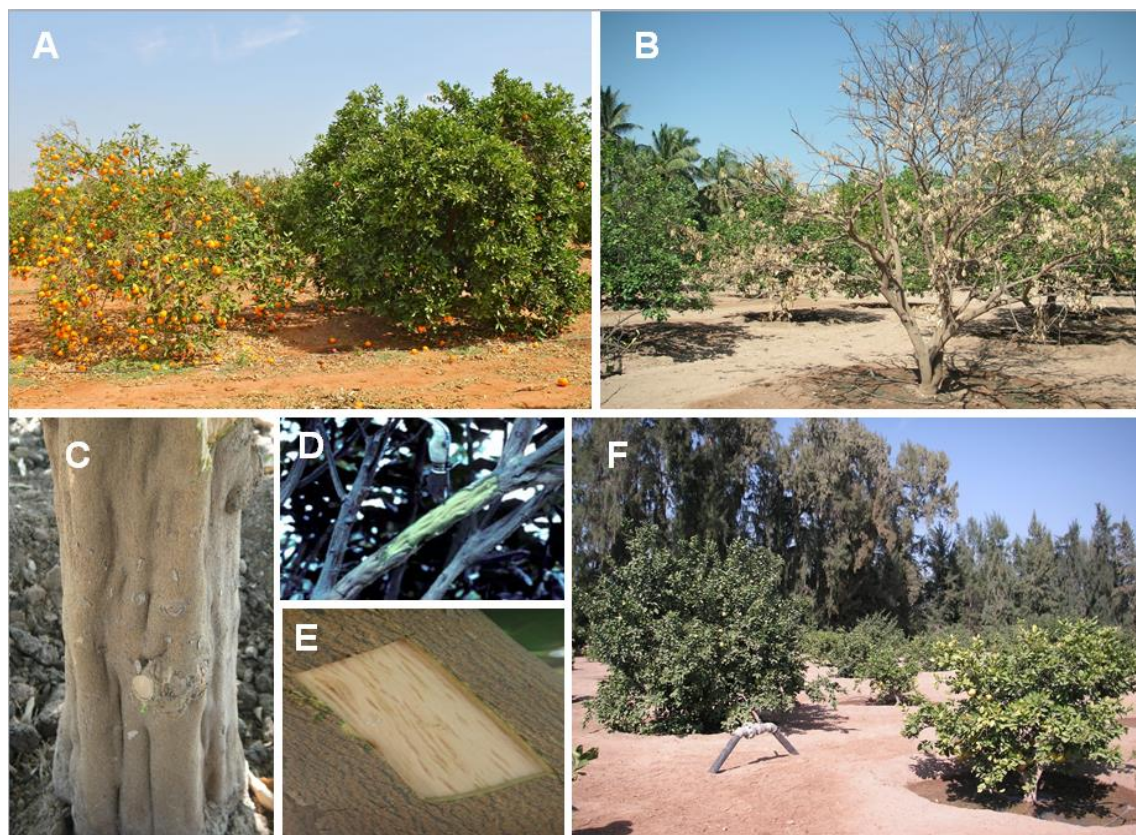


Рисунок 1. Симптомы инфекции, вызванной *вирусом тристезы цитрусовых* (CTV): А – синдром тристезы: угнетение жизнедеятельности апельсинового дерева, привитого на померанце, инфицированном CTV (слева), и здоровое дерево (справа); В – стремительное увядание грейпфрута, привитого на померанце; С – вызванная агрессивным штаммом CTV ямчатость древесины на стволе грейпфрута, привитого на цитранже Тройер; D – резко выраженная ямчатость (бороздчатость) древесины на ветвях грейпфрута; Е – ямчатость древесины на стволе апельсина, привитого на мандарине Клеопатра; F – выраженная низкорослость цитранжа Карризо (справа), в сравнении со здоровым деревом (слева).
 Фотографии любезно предоставили: (А) P. Moreno; (В, С, Е) M. Cambra; (D) L. Navarro; (F) M. Cambra и J.A. Pina. Все авторы – из Валенсийского института сельскохозяйственных исследований (IVIA), Монкада, Испания.

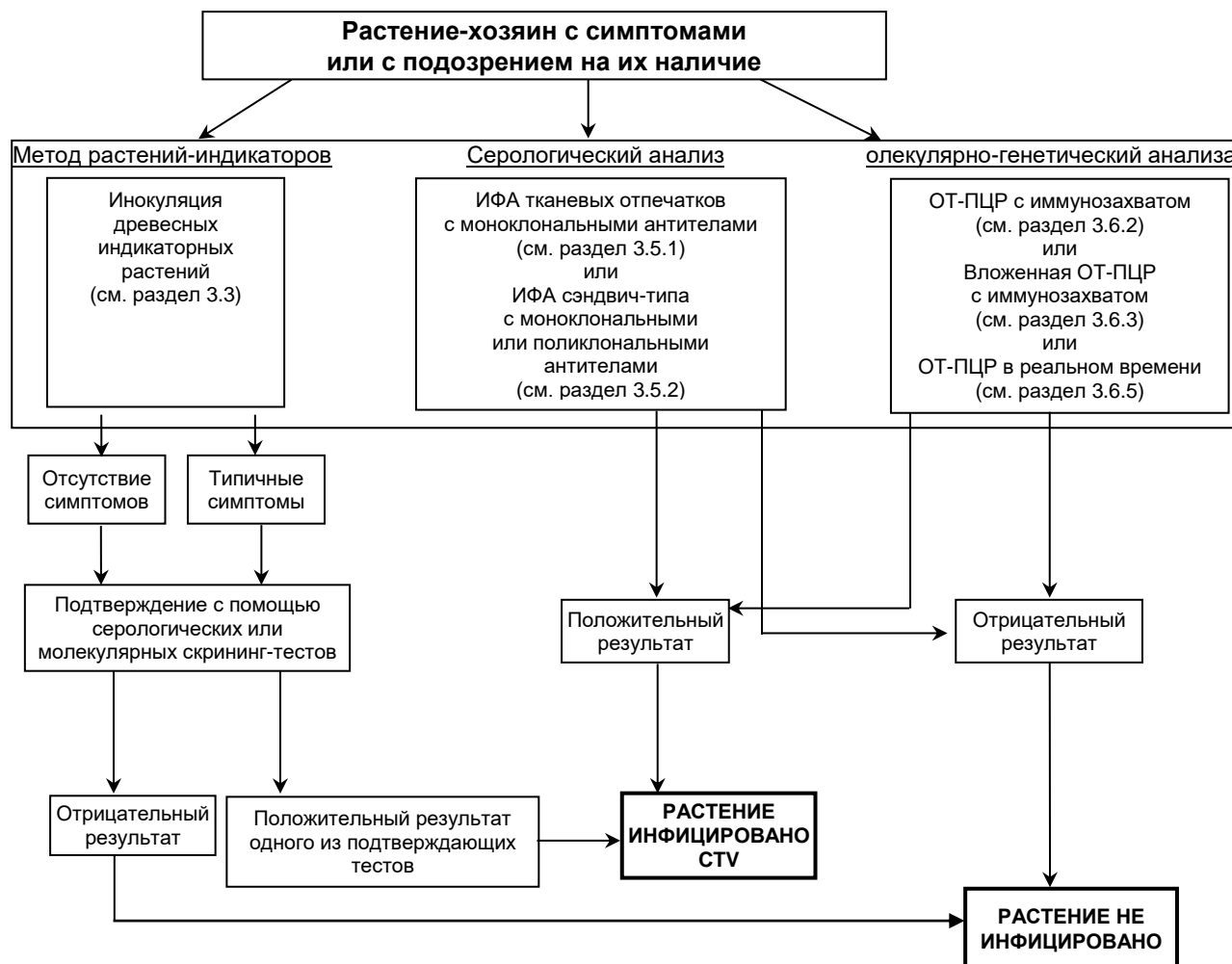


Рисунок 2. Блок-схема процесса выявления и идентификации *вируса tristeza цитрусовых* (CTV). ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскриптаза.

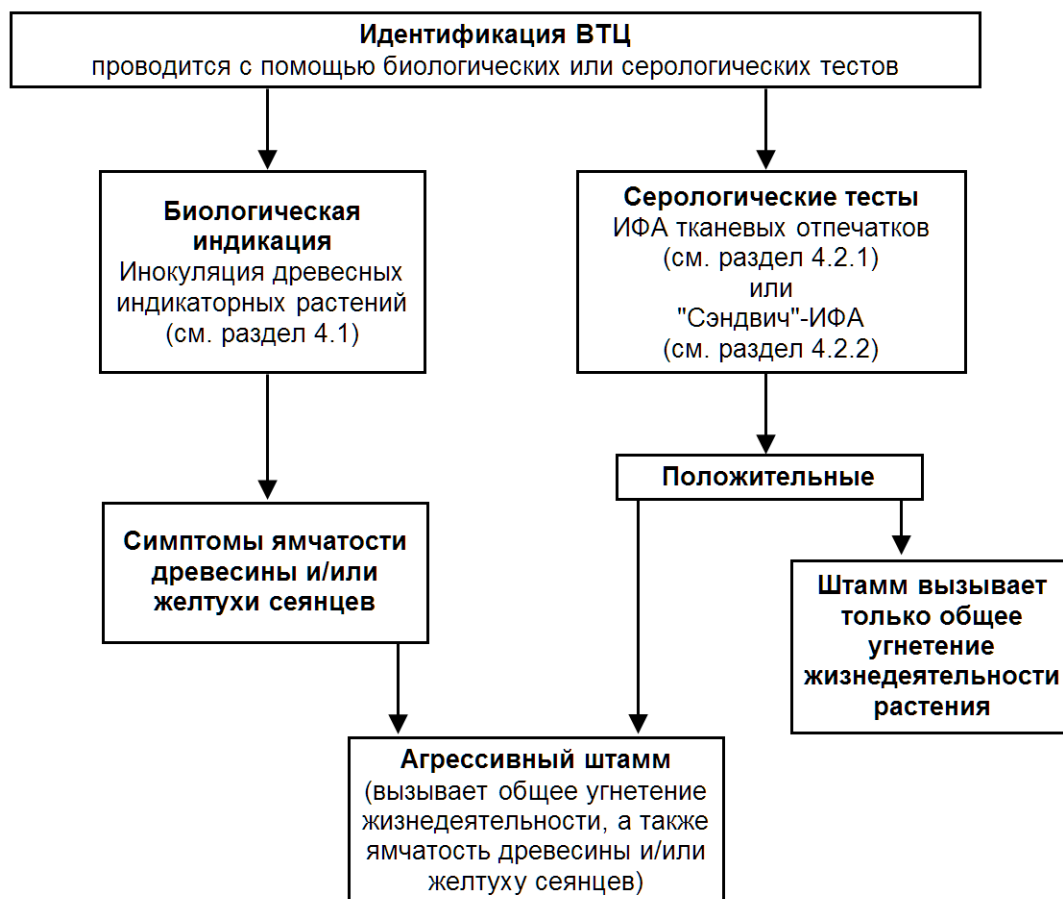


Рисунок 3. Блок-схема процесса идентификации агрессивных штаммов вируса тристезы цитрусовых (CTV). ИФА – иммуноферментный анализ.

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2004-11 КС внес новую тему: *Вирус тристезы цитрусовых* (2004-021).

2006-04 КФМ-1 включила тему в программу работы по теме "Вирусы и фитоплазмы" (2006-009).

2006-04 КФМ-1 (2006 г.) включила в программу работы тему "Нематоды (2006-008)".

2014-04 Консультация с экспертами.

2015-01 КС одобрил текст для проведения консультации с членами (2015_eSC_May_02).

2015-02 Консультация с членами.

2015-12 Редакционная группа рассмотрела проект ДП и учла замечания членов.

2015-11 Представлено в КС для утверждения периода нотификации ДП. (2016_eTPDP_Feb_02).

2016-03 КС через электронную систему принятия решений утвердил текст для 45-дневного периода нотификации (2016_eSC_May_10).

2016-08 КС утвердил ДП от лица КФМ (возражений не получено).

МСФМ 27. Приложение 15. Вирус тристезы цитрусовых (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

2018-01 ГЛА для Русского языка и Служба письменного перевода ФАО пересмотрели данный ДП и Секретариат МККЗР внес соответствующие изменения.

2018-04: СРМ-13 (2018) Принято к сведению, что группа по проверке русских переводов пересмотрела это приложение.

2019-01: Секретариат МККЗР исправил ошибку в рисунке 2.

История публикации последний раз обновлена: 2019-01.

МККЗР

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР) представляет собой международное соглашение по защите растений, целью которого является защита культивируемых и дикорастущих растений за счет предотвращения интродукции и распространения вредных организмов. Сегодня международные поездки и торговля имеют большее значение, чем когда либо раньше. По мере того, как люди и товары перемещаются по миру, они переносят с собой опасные для растений организмы.

Организация

- ◆ Более 180 стран являются договаривающимися сторонами МККЗР.
- ◆ У всех членов Конвенции имеется национальная организация по карантину и защите растений (НОКЗР) и официальный контактный адрес МККЗР.
- ◆ Девять региональных организаций по карантину и защите растений (РОКЗР) содействуют внедрению положений МККЗР в странах.
- ◆ НОКЗР взаимодействуют с профильными международными организациями с целью содействия развитию регионального и национального потенциала.
- ◆ Деятельность секретариата МККЗР обеспечивается Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО).

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy

Тел.: +39 06 5705 4812

Эл. почта: ippc@fao.org | Сайт: www.ippc.int