

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 13: *Erwinia amylovora*

(Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году)

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	3
2.	Таксономическая информация	3
3.	Выявление	4
3.1	Выявление в растениях с симптомами	4
3.1.1	Симптомы	4
3.1.2	Отбор и подготовка проб.....	5
3.1.3	Изоляция	6
3.1.3.1	Изоляция из образцов растений с симптомами	6
3.1.3.2	Изоляция с обогащением.....	7
3.1.4	Серологические методы определения	7
3.1.4.1	DASI-ELISA с обогащением	7
3.1.4.2	Прямой иммуноферментный анализ отпечатка ткани.....	8
3.1.4.3	Иммунофлуоресцентный анализ	8
3.1.4.4	Иммунохроматографический анализ	9
3.1.5	Молекулярное определение	9
3.1.5.1	Контроли молекулярных анализов	10
3.1.5.2	Выделение ДНК.....	11
3.1.5.3	Аmplификация ДНК методом ПЦР	11
3.1.5.4	Общие положения по постановке ПЦР	13
3.1.5.5	ПЦР в режиме реального времени.....	14
3.1.5.6	Интерпретация результатов ПЦР	15
3.1.5.7	Петлевая изотермическая амплификация	16
3.2	Выявление в бессимптомных растениях.....	16
3.2.1	Отбор и подготовка проб.....	17
3.2.2	Скрининговые тесты	17
4.	Идентификация	18
4.1	Идентификация по питательной среде и идентификация по ферментативной активности	18
4.1.1	Биохимическая характеристика	19
4.1.1.1	Определение профилей ферментативной активности и утилизации углеводов	19
4.1.1.2	Автоматизированная идентификация	20
4.1.1.3	Анализ профиля жирных кислот	20

4.2	Серологическая идентификация	20
4.2.1	Агглютинация.....	20
4.2.2	Иммунофлуоресценция	20
4.2.3	Иммуноферментный анализ.....	20
4.2.4	Иммунохроматографический анализ	21
4.3	Молекулярная идентификация	21
4.3.1	ПЦР.....	21
4.3.2	Макрорестрикционный анализ ДНК с использованием гель-электрофореза в пульсирующем поле.....	21
4.4	Методы проверки на патогенность.....	21
5.	Данные	22
6.	Контактные лица для получения дополнительной информации	22
7.	Выражение признательности.....	22
8.	Справочные материалы.....	23
9.	Рисунки.....	26

1. Информация о вредном организме

Erwinia amylovora является возбудителем бактериального ожога плодовых культур – заболевания, поражающего большинство видов растений подсемейства яблоневых (Maloideae) семейства розовых (Rosaceae (Spiraeoideae)). *E. amylovora* стала первой бактерией, названной возбудителем болезни растений (Burrill, 1883). *E. amylovora* считается местным видом Северной Америки и впервые за ее пределами была обнаружена в 1920 году в Новой Зеландии. Случаи бактериального ожога плодовых были описаны в Англии в 1957 году, и с тех пор возбудитель болезни был выявлен в большинстве регионов Европы, в которых культивируются восприимчивые к патогену растения-хозяева. В настоящее время *E. amylovora* обнаружена в более чем 40 странах. Возбудитель бактериального ожога плодовых не зарегистрирован в Южной Америке и большинстве стран Африки и Азии (за исключением прибрежных стран Средиземного моря) и в Австралии был ликвидирован после одного зарегистрированного случая выявления (van der Zwet, 2004). Бактериальный ожог плодовых представляет угрозу для производства семечковых культур во всех этих странах (Bonn & van der Zwet, 2000). С более подробной информацией о географическом распространении можно ознакомиться с помощью поисково-информационной базы данных по карантинным вредным организмам (PQR) Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) (EPPO, n.d.).

Наибольшее значение как с экономической, так и с эпифитотической точки зрения имеют растения-хозяева, относящиеся к родам *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Sorbus* и *Stranvaesia* (Bradbury, 1986). Штаммы *E. amylovora*, выделенные из *Rubus* sp. в Соединенных Штатах, отличаются от штаммов, выделенных из других хозяев (Starr *et al.*, 1951; Powney *et al.*, 2011b).

Бактериальный ожог плодовых является, вероятно, наиболее тяжелым бактериальным заболеванием, поражающим сорта *Pyrus communis* (груша обыкновенная) и *Malus domestica* (яблоня домашняя) во многих странах. Эпифитотии носят спорадический характер и зависят от ряда факторов, в числе которых благоприятные условия окружающей среды, достаточный уровень присутствия бактериальной массы в насаждении и восприимчивость растения-хозяина. Возбудитель заболевания легко переносится птицами, насекомыми, дождем или ветром (Thomson, 2000). Развитие симптомов бактериального ожога связано с сезонным развитием растения-хозяина. Развитие заболевания начинается весной с производством первичного инфекционного агента перезимовавшими в язвах бактериями (Thomson, 2000), вызывающего заражение цветов, продолжается летом с заражением ветвей и плодов и заканчивается зимой образованием язв в период покоя хозяина (van der Zwet & Beer, 1995; Thomson, 2000).

2. Таксономическая информация

Название:	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill, 1883) Winslow <i>et al.</i> , 1920
Синонимы:	<i>Micrococcus amylovorus</i> Burrill, 1883, <i>Bacillus amylovorus</i> (Burrill, 1883) Trevisan, 1889, “ <i>Bacterium amylovorus</i> ” [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897, <i>Erwinia amylovora</i> f.sp. <i>rubi</i> (Starr <i>et al.</i> , 1951)
Таксономическое положение:	тип Протеобактерии (Proteobacteria), класс гамма-Протеобактерии, порядок Энтеробактерии (Enterobacteriales), семейство Энтеробактерии (Enterobacteriaceae)
Обычное название:	возбудитель бактериального ожога плодовых (EPPO, 2013)

3. Выявление

Диагностика бактериального ожога плодовых может проводиться путем выделения возбудителя и проведения серологических и молекулярных исследований. Приведенные далее методы анализов были рекомендованы после прохождения оценки в одном или более из следующих межлабораторных сравнительных испытаний: проводившемся в 2003 году в рамках проекта "Диагностические протоколы для вредителей растений" (DIAGPRO), в котором участвовало десять лабораторий (López *et al.*, 2006); проводившемся в 2009 году в рамках проекта Европейской программы координации научных исследований в области карантина и защиты растений (EUPHRESO), в котором участвовало пять лабораторий (Dreo *et al.*, 2009); проводившемся в 2010 году с участием четырнадцати лабораторий во всем мире (López *et al.*, 2010). Проведение анализов, указанных в схемах на рисунках 1 и 2, является минимальным требованием при диагностике бактериального ожога плодовых, однако национальная организация по карантину и защите растений (НОКЗР) может потребовать проведения дальнейших исследований, особенно в тех случаях, когда заболевание выявляется в стране впервые. Так, серологические тесты могут способствовать установлению предварительного диагноза, основанного на выявлении специфического белка в материале от растения с симптомами, но для определения патогена следует использовать дополнительный анализ, основанный на ином биологическом принципе. Во все тесты должны включаться положительные и отрицательные контроли.

В настоящем 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 химикатов, реагентов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтения и исключения других, которые так же могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

3.1 Выявление в растениях с симптомами

Рекомендуемые скрининговые тесты приводятся в схеме на рисунке 1.

3.1.1 Симптомы

Симптомы бактериального ожога у наиболее распространенных растений-хозяев, таких как *P. communis* (груша), *M. domestica* (яблоня), *Cydonia* spp. (айва), *Eriobotrya japonica* (мушмула японская), *Cotoneaster* spp. (кизильник), *Pyracantha* spp. (пираканта) и *Crataegus* spp. (боярышник), сходны и легко распознаются. Само название заболевания указывает на его главный признак: побурение и некротизация молодых побегов, цветов и листьев, которые выглядят так, словно их обожгло огнем. Типичными симптомами являются побурение или почернение листьев на пораженных ветвях, выделение экссудата и характерное закручивание верхушек молодых побегов ("пастуший посох"). В зависимости от пораженного органа возбудитель может вызывать ожог цветков, ветвей или побегов, листьев, плодов, скелетных ветвей и штамба и корневой шейки или корневой системы (van der Zwet & Keil, 1979; van der Zwet & Beer, 1995).

Первые симптомы заражения у яблоневых и грушевых деревьев обычно появляются ранней весной, когда среднесуточная температура поднимается выше 15 °C, во влажную погоду. Зараженные цветы набухают от влаги, затем вянут, засыхают и приобретают оранжевую, бурую или черную окраску. Цветоножки, которые тоже могут набухать от влаги, становятся темно-зелеными, а затем коричневыми или черными, иногда выделяя капли липкого бактериального экссудата. Зараженные листья вянут, засыхают и скручиваются, плодовые ветки яблоневых деревьев целиком приобретают бурую окраску, плодовые ветки грушевых деревьев – темно-коричневую или черную, но какое-то время не опадают. Зараженные завязи приобретают коричневую окраску, но также остаются на ветвях. Образующиеся на незрелых плодах очаги поражения выглядят маслянистыми или водянистыми, приобретают коричневую или черную

окраску и часто выделяют капли бактериального экссудата. При удалении коры с пораженных ветвей в подкорковых тканях часто можно наблюдать характерный красновато-коричневый "мраморный" рисунок (van der Zwet & Keil, 1979; Thomson, 2000). На коре ветвей и ствола пораженных деревьев образуются слегка заглубленные язвы, цвет которых варьирует от бурого до черного. В дальнейшем растрескивание коры на границе больной и здоровой тканей делает эти язвы четко очерченными (Thomson, 2000).

Симптомы бактериального ожога плодовых можно спутать с напоминающими ожог или обморожение симптомами инфицирования другими патогенными бактериями и грибами, особенно в случае поражения цветов и почек, а также с повреждениями, вызванными насекомыми или физиологическими нарушениями. Сходные с бактериальным ожогом плодовых симптомы вызывают такие бактерии, как *Erwinia pyrifoliae* – возбудитель бактериального некроза побегов *Pyrus pyrifolia* (груша грушелистная, или азиатская груша) (Kim *et al.*, 1999); *Erwinia piriflorinigrans*, выделенная из некротизированных соцветий груши в Испании (López *et al.*, 2011); *Erwinia uzenensis*, недавно описанная в Японии (Matsuura *et al.*, 2012); другие *Erwinia* spp., описанные в Японии и вызывающие бактериальный некроз побегов (Tanii *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012); *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, возбудитель бактериального некроза соцветий. Окончательный диагноз бактериального ожога плодовых всегда должен ставиться на основании лабораторного анализа.

3.1.2 Отбор и подготовка проб

После отбора следует в возможно кратчайшие сроки провести анализ растительного материала; при необходимости материал до подготовки может до одной недели храниться при температуре 4–8 °С. Во избежание кросс-контаминации необходимо принимать соответствующие меры предосторожности при отборе и транспортировке проб и их подготовке, в особенности при изоляции бактерий или выделении ДНК.

Пробы подготавливают по общей методике, применимой к изоляции бактерий, серологическим тестам и анализу методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для успешного обогащения по методу, описанному Gorris *et al.* (1996), используют свежеприготовленный антиоксидантный мацерирующий буферный раствор (поливинилпирролидон (PVP-10), 20 г; маннитол, 10 г; аскорбиновая кислота, 1,76 г; редуцированный глутатион, 3 г; фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), 10 мМ, 1 л; pH 7,2; стерилизовать фильтрованием). Пробы для прямой изоляции, реакции иммунофлуоресценции и ПЦР также можно подготавливать в стерильной дистиллированной воде или в PBS с pH 7,2 (NaCl, 8 г; KCl, 0,2 г; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г; KH₂PO₄, 0,2 г; дистиллированная вода, 1 л).

Части растения (соцветия, побеги, ветви, листья или плоды), демонстрирующие наиболее типичные симптомы и, при возможности, с бактериальным экссудатом, тщательно отбирают. Материал для подготовки берут на границе участка повреждения и здоровой ткани. Растительную ткань нарезают на кусочки весом приблизительно в 0,1–1,0 г, аккуратно разминают в антиоксидантном мацерирующем буфере, PBS или стерильной дистиллированной воде (как описано в предыдущем пункте) в соотношении массы растительной ткани к объему раствора 1:50, дают отстояться не менее 5 мин. и затем в течение нескольких минут охлаждают на льду. Три пробы (каждая по 1 мл) мацерата отбирают в стерильные микроцентрифужные пробирки. Одну из пробирок хранят при –20 °С для последующего анализа методом ПЦР, к содержимому второй добавляют 30%-й раствор глицерина и хранят при –80 °С для подтверждающего анализа (при необходимости). Образец, содержащийся в третьей пробирке, которую хранят на льду, используется для обогащения перед проведением иммуноферментного анализа (ELISA) или ПЦР, и изоляции на селективной среде (рисунок 1). Если предполагается проведение иммунофлуоресцентного анализа (не является обязательным), препараты готовят и фиксируют на стеклах в тот же день, когда пробы мацерировали. ПЦР-анализ следует провести при первой возможности, используя мацерированный образец, хранившийся при –20 °С.

3.1.3 Изоляция

3.1.3.1 Изоляция из образцов растений с симптомами

В общем случае для максимальной вероятности выделения *E. amylovora* рекомендуется посев на три среды, особенно в тех случаях, когда образцы в плохом состоянии. В зависимости от количества и состава микроорганизмов в образце, каждая из сред может оказаться более или менее эффективной. Три среды (ССТ, среда Кинга Б и левановая среда) были валидированы в двух межлабораторных сравнительных испытаниях, продемонстрировавших наивысшую эффективность посева у левановой среды.

Если симптомы указывают на слишком сильное поражение либо условия окружающей среды после заражения не благоприятствуют размножению бактерий, количество поддающихся культивированию клеток *E. amylovora* может быть очень малым. Выделение культуры в таких условиях может привести к тому, что в чашках окажется мало клеток патогена и чашки будут перенаселены сапрофитными бактериями и бактериями-антагонистами. При подозрении на такой результат следует провести повторное тестирование и/или обогатить образец перед повторной изоляцией. Индукция жизнеспособного, но не поддающегося культивированию состояния (VBNC-состояние) описана для *E. amylovora in vitro* с использованием обработки медьсодержащими препаратами и в плодах (Ordax *et al.*, 2009) и может приводить к ложноотрицательным результатам выделения. Рецептúra рекомендуемых сред приводится ниже:

- Среда ССТ готовится в двух частях. Состав части 1: сахара, 100 г; сорбитол, 10 г; Niaproof 4, 1,2 мл; кристаллиолет, 2 мл (0,1%-й спиртовой раствор); питательный агар, 23 г; дистиллированная вода 1 л; стерилизовать автоклавированием при 115 °С в течение 10 мин. Автоклавированная среда охлаждается примерно до 45 °С. Состав части 2: нитрат таллия, 2 мл (1%-й водный раствор); циклогексимид, 0,05 г; стерилизовать фильтрованием. Часть 2 добавляют к 1 л стерилизованной части 1 (Ishimaru & Klos, 1984).
- Состав среды Кинга Б: пептон протеозный №3, 20 г; глицерин, 10 мл; K₂HPO₄, 1,5 г; MgSO₄·7H₂O, 1,5 г; агар, 15 г; дистиллированная вода, 1 л; pH 7,0–7,2; стерилизовать автоклавированием при 120 °С в течение 20 мин. (King *et al.*, 1954).
- Состав левановой среды: дрожжевой экстракт, 2 г; пептон бактериологический, 5 г; NaCl, 5 г; сахара, 50 г; агар, 20 г; дистиллированная вода, 1 л; pH 7,0–7,2; стерилизовать автоклавированием при 120 °С в течение 20 мин.

Если при изоляции ожидается рост грибов, к средам Кинга Б и левановой добавляют циклогексимид в количестве 0,05 г/л. Разведения каждого мацерата в соотношении 1:10 и 1:100 готовят в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (NaCl, 8 г; KCl, 0,2 г; Na₂HPO₄·12H₂O, 2,9 г; KH₂PO₄, 0,2 г; дистиллированная вода, 1 л).

Рекомендуется посев в трехкратном повторении 100 мкл мацератов и их разведений в чашки диаметром 130 мм либо 50 мкл или в стандартные чашки Петри диаметром 90 мм. Чашки инкубируют при 25 °С до 4 дней. Окончательное считывание результатов проводят, как правило, через 72 часа. Колонии *E. amylovora* на питательной среде ССТ бледно-фиолетовые, округлые, от сильно выпуклых до куполообразных, гладкие и мукоидные, растут медленнее, чем на среде Кинга Б или на левановой среде. Колонии на среде Кинга Б кремово-белые, округлые, в ультрафиолетовом свете при длине волны 366 нм не флуоресцируют. Колонии на левановой среде белые, округлые, куполообразные, гладкие и мукоидные. Описаны леванотрицательные колонии *E. amylovora* (Bereswill *et al.*, 1997).

Чистые культуры выделяют из отдельных подозрительных колоний для каждой пробы разведением и посевом на среду Кинга Б. Рекомендуется идентифицировать предполагаемые колонии *E. amylovora*, используя двухстадийный иммуноферментный анализ сэндвич-типа (DASI-ELISA), ПЦР или другие подходящие тесты (например биохимические тесты, реакция иммунофлуоресценции, анализ жирных кислот) либо провести тест на патогенность, инокулируя

чувствительные к патогену органы любого доступного растения-хозяина *E. amylovora*, как описано в разделе 4.

При анализе образцов с симптомами следует ожидать хорошо выраженную корреляцию результатов изоляции, иммунофлуоресценции, DASI-ELISA с обогащением проб (раздел 3.1.4.1) и ПЦР.

В проводившихся в 2003 и 2010 годах межлабораторных сравнительных испытаниях точность результатов изоляции составила 0,88 и 0,81 для среды Кинга Б, 0,92 и 0,89 для левановой среды и 0,92 и 0,95 для среды ССТ соответственно (López *et al.*, 2006; М.М. Lopez, личное сообщение, 2012 г.). В межлабораторном сравнительном испытании в 2009 году точность изоляции составила 0,96 для среды ССТ (Dreo *et al.*, 2009).

3.1.3.2 Изоляция с обогащением

Обогащение используется для увеличения исходной популяции поддающихся культивированию *E. amylovora* в пробе и проведения DASI-ELISA с обогащением или ПЦР с обогащением. Обогащение проводится до изоляции (даже в случае образцов с симптомами) в тех случаях, когда предполагается, что число поддающихся культивированию *E. amylovora* в образцах невелико (например, образцы обработаны медьсодержащими препаратами, образцы со старыми симптомами или образцы, собранные при неблагоприятных для развития бактериального ожога погодных условиях, например зимой). Обогащение значительно увеличивает чувствительность метода DASI-ELISA. Поскольку состав и размер популяции микроорганизмов заранее не известны, для обогащения рекомендуется использование двух валидированных жидких сред: неселективной (среда Кинга Б) и полуселективной (среда ССТ).

Образец ткани мацерируют, как описано в разделе 3.1.2. Непосредственно после мацерации по 0,9 мл суспензии помещают в две стерильные пробирки на 10–15 мл (для обеспечения достаточной аэрации), в которых находится по 0,9 мл жидкой среды для обогащения (среда Кинга Б без агара и среда ССТ, приготовленная с питательным бульоном вместо питательного агара). Пробирки инкубируют 48–72 ч при 25 °С без встряхивания. Если обрабатываемые образцы растений собраны зимой, рекомендуется более продолжительный период инкубации. Оба обогащенных экстракта в разведениях 1:10 и 1:100, приготовленных в PBS, высевают на чашки со средой ССТ в трехкратном повторении для получения изолированных колоний. Чашки инкубируют при 25 °С 72–96 часов. Подсчет колоний на среде ССТ производят через 72 часа, после чего проводят пересев, выделяют чистую культуру и идентифицируют ее.

Поскольку этап обогащения обеспечит рост патогена, но приведет также к обильному размножению других бактерий, для посева и разведения рекомендуется использовать полуселективную среду. В межлабораторном сравнительном испытании, проводившемся в 2010 году, точность результатов изоляции с обогащением на средах Кинга Б и ССТ составила 0,97.

3.1.4 Серологические методы определения

3.1.4.1 DASI-ELISA с обогащением

Набор для проведения DASI-ELISA с обогащением прошел валидацию в двух межлабораторных сравнительных испытаниях и доступен для приобретения в коммерческом порядке у компании Plant Print Diagnostics SL¹. Он основан на смеси двух специфических моноклональных антител, описанных Gorrís *et al.* (1996), и требует предварительного обогащения проб, как описано выше.

¹ В настоящем 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 лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации.

Для обеспечения максимальной точности необходимо строго соблюдать следующий протокол. Перед проведением ELISA необходимое количество экстрактов обогащенных проб и контролей инкубируют на водяной бане при температуре 100 °С в течение 10 мин. Эта обработка необходима для обеспечения оптимальной специфичности. Кипяченые образцы исследуют (при комнатной температуре) методом ELISA в тот же день (либо хранят при –20 °С для последующих анализов) в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем данного коммерческого набора.

Анализ ELISA считается отрицательным, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с двумя повторностями пробы меньше удвоенной ОП в лунках с отрицательным контролем (при условии, что значения ОП для лунок с положительным контролем превышают 1,0 после инкубирования в течение 90 мин. и более чем в 2 раза превышают значения ОП, полученные для отрицательных контролей). Анализ ELISA считается положительным, если среднее значение ОП в лунках с двумя повторностями пробы более чем в 2 раза превышает ОП в лунках с отрицательным контролем (при условии, что все значения ОП для лунок с отрицательным контролем менее чем в 2 раза превышают среднее значение ОП в лунках с положительным контролем).

Отрицательные результаты анализа ELISA в лунках с положительным контролем свидетельствуют о том, что анализ не был проведен корректно и/или реагенты не были должным образом приготовлены. Положительные результаты анализа ELISA в лунках с отрицательным контролем свидетельствуют о кросс-контаминации или о неспецифическом связывании антител. В обоих случаях тест следует провести повторно либо провести второй тест, основанный на другом биологическом принципе, например, ПЦР.

В проводившихся в 2003 и 2010 годах межлабораторных сравнительных испытаниях точность DASI-ELISA составила 0,79 и 0,82 соответственно для обогащения в среде Кинга Б (King's B-DASI-ELISA) и 0,83 и 0,77 соответственно для обогащения в среде CCT (CCT-DASI-ELISA) (López *et al.*, 2006, 2010).

3.1.4.2 Прямой иммуноферментный анализ отпечатка ткани

Для подготовки отпечатков ткани свежесрезанные части растения аккуратно прижимают срезами к нитроцеллюлозной мембране. Подготавливают отпечатки для положительных и отрицательных контролей. Мембраны с отпечатками могут несколько месяцев храниться в сухом месте при комнатной температуре. Следует использовать антитела к *E. amylovora* из валидированных наборов, таких как набор Plant Print Diagnostics SL¹. При подготовке отпечатков необходимо следовать инструкциям производителя. Отпечатки просматривают при малом увеличении (x10 или x20). Анализ считается положительным, если пурпурно-фиолетовый преципитат обнаруживается в отпечатках растительной ткани образца и отсутствует в отпечатках отрицательного контроля. Экссудат или колонии бактерий на отпечатках дают фиолетовую окраску. Анализ считается отрицательным, если в отпечатках растительной ткани образца и в отпечатках отрицательного контроля пурпурно-фиолетовый преципитат отсутствует.

3.1.4.3 Иммунофлуоресцентный анализ

Иммунофлуоресцентный анализ является рекомендованным альтернативным серологическим методом, простым в постановке по стандартному протоколу (Anonymous, 1998). Используется валидированный источник антител к *E. amylovora*. Два коммерчески доступных типа антител были валидированы в одном межлабораторном сравнительном испытании: моноклональные антитела производства Plant Print Diagnostics SL¹ и поликлональные антитела производства Loewe Biochemicals¹.

Иммунофлуоресцентный анализ проводят со свежеприготовленными экстрактами пробы, фиксированными на предметных стеклах. Неразведенные мацераты и разведения в PBS в соотношении 1:10 и 1:100 наносят на предметные стекла с окошками для

иммунофлуоресцентной микроскопии. Используют моноклональные или поликлональные антитела в подходящем разведении в PBS. Соответствующий флуоресцирующий изотиоцианатный конъюгат (FITC) разводят в PBS: козий антимиошинный для моноклональных антител (GAM-FITC) и козий антикроличий (GAR-FITC) или антикозий для поликлональных антител.

Проба считается отрицательной, если окрашенные в зеленый цвет флуоресцирующие клетки с характерной для *E. amylovora* морфологией наблюдаются в положительных контролях и отсутствуют в окошках с пробой. Проба считается положительной, если окрашенные в зеленый цвет флуоресцирующие клетки с характерной морфологией наблюдаются в положительных контролях и в окошках с пробой, но отсутствуют в отрицательных контролях. Поскольку пределом надежного обнаружения методом иммунофлуоресцентного анализа считается концентрация клеток в 10^3 кл/мл, для образцов с концентрацией свыше 10^3 кл/мл иммунофлуоресцентный анализ считается положительным. Для образцов с концентрацией менее 10^3 кл/мл или со слабо флуоресцирующими клетками результат иммунофлуоресцентного анализа можно рассматривать как неопределенный.

Точность иммунофлуоресцентного анализа в проводившемся в 2003 году межлабораторном сравнительном испытании составила 0,70 для моноклональных антител производства Plant Print Diagnostics SL¹ и 0,72 для поликлональных антител производства Loewe Biochemicals¹, подтвердив, что чувствительность данного метода составляет приблизительно 10^3 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл.

3.1.4.4 Иммунохроматографический анализ

Коммерчески доступны два иммунохроматографических набора для экспресс-анализа растительного материала: Ea AgriStrip (Bioreba¹) и Pocket Diagnostics (Forsite Diagnostics¹). В проводившихся в 2009 и 2010 гг. межлабораторных сравнительных испытаниях их точность при следовании инструкциям производителей составила 0,66 и 0,55 соответственно для Ea AgriStrip¹ и 0,64 и 0,56 соответственно для Pocket Diagnostics¹. Эти результаты были получены при обнаружении *E. amylovora* в образцах с концентрацией бактерий от 1 КОЕ/г до 10^6 КОЕ/г, но точность составила приблизительно 1,0 при анализе образцов с концентрацией бактерий от 10^5 КОЕ/г до 10^6 КОЕ/г – минимальное количество, ожидаемое у образцов с симптомами (López *et al.*, 2010). Данные наборы рекомендуется использовать только с образцами с симптомами.

3.1.5 Молекулярное определение

Несколько ПЦР-методов и один метод петлевой изотермической амплификации (LAMP)², доступные для определения *E. amylovora*, всесторонне оценивались в межлабораторном сравнительном испытании с участием нескольких лабораторий (Lopez *et al.*, 2010; М.М. Lopez, личное сообщение, 2012 г.). Специфичность некоторых из этих методов оценивалась Powney *et al.* (2011a). По сравнению с серологическими методами традиционные методы ПЦР могут быть более дорогостоящими, занимают много времени и, как правило, требуют более продолжительного обучения персонала. По этим причинам, а также в связи с риском контаминации, они не всегда подходят для проведения массовых анализов. Однако ПЦР в режиме реального времени, ряд традиционных методов ПЦР и метод гнездовой ПЦР в одной пробирке обеспечивают высокоточные результаты и потому являются рекомендованными молекулярными методами. Поскольку в тканях растений-хозяев *E. amylovora* содержится

² При использовании метода LAMP на регулярной основе в странах и объединениях стран с патентной системой, таких как Япония (патенты №№ 3 313 358, 3 974 441 и 4 139 424), Соединенные Штаты Америки (US6 410 278, US6 974 670 и US7 494 790), Европейский союз (№№ 1 020 534, 1 873 260, 2 045 337 и 2 287 338), Китай (ZL008818262), Республика Корея (патент № 10-0612551), Австралия (№ 779160), и Российская Федерация (№ 2 252 964), в целях защиты права интеллектуальной собственности пользователям необходимо перед использованием получить лицензию у Eiken Chemical Co., Ltd.

большое количество ингибиторов ПЦР, все ПЦР-анализы следует проводить с ДНК, выделенной из проб или из обогащенных проб, что обеспечивает повышенную достоверность обнаружения патогена.

3.1.5.1 Контроли молекулярных анализов

Чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Для ПЦР положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты, внутренний контроль и отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы) являются тем минимумом, который следует использовать.

Положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты

Данный контроль используется для отслеживания эффективности метода и амплификации в частности. В качестве контроля могут использоваться предварительно подготовленная (сохраненная) нуклеиновая кислота, ДНК после полногеномной амплификации или синтетический контроль (например, клонированный продукт ПЦР).

Внутренний контроль

Для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени внутренние контроли на наличие растительной ДНК (например, конститутивный ген (КГ) растения, такой как COX (Weller *et al.*, 2000), или ген 16S рРНК (Weisberg *et al.*, 1991)), включают в протокол, чтобы исключить возможность ложноотрицательных результатов ПЦР в связи с неудачей при выделении нуклеиновой кислоты либо деградации нуклеиновой кислоты или присутствия ингибиторов ПЦР.

Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы)

Данный контроль необходим для стандартной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Используемая при подготовке реакционной смеси вода для ПЦР добавляется на этапе амплификации.

Положительный контроль выделения

Данный контроль используется для подтверждения того, что нуклеиновая кислота-мишень выделена в достаточном количестве и достаточного качества и что мишень обнаружена. Нуклеиновую кислоту выделяют из ткани инфицированного растения-хозяина или из ткани здорового растения, в которую внесли определяемый патоген.

Положительный контроль состоит примерно из 1/10 количества ткани листьев растения, использованного для выделения ДНК.

При контроле ПЦР следует принять меры для предотвращения аэрозольной кросс-контаминации от положительного контроля или положительных проб. В случае необходимости использованный в лаборатории контроль следует секвенировать так, чтобы полученную последовательность можно было легко сравнить с последовательностью, полученной от ПЦР-ампликонов нужного размера. Другим способом является изготовление синтетических положительных контролей с известной последовательностью, которую можно сравнить с ПЦР-ампликонами нужного размера.

Отрицательный контроль выделения

Данный контроль ставится для отслеживания загрязнения в процессе выделения нуклеиновой кислоты и/или перекрестной реакции с тканью растения-хозяина. Контроль включает в себя нуклеиновую кислоту, выделенную из неинфицированной ткани растения-хозяина и амплифицированную. Рекомендуется ставить несколько контролей в тех случаях, когда ожидаются большие количества положительных образцов.

3.1.5.2 Выделение ДНК

Три метода выделения ДНК – описанные Llop *et al.* (1999), Taylor *et al.* (2001) и производителями набора для проведения ПЦР REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich¹) – оценивались в проводившемся в 2009 году межлабораторном сравнительном испытании (Dreo *et al.*, 2009) с четырьмя ПЦР-протоколами, точность которых составляла от 0,67 до 0,76. Указанные методы продемонстрировали сопоставимые результаты в проводившемся в 2010 году межлабораторном сравнительном испытании (Lopez *et al.*, 2010), как видно из приводимых ниже показателей точности различных ПЦР-методов. После разведения экстрактов в соотношении 1:10 эффективность каждого из указанных методов не повысилась, что говорит о присутствии незначительного количества ингибиторов либо об их отсутствии. На основании этих результатов рекомендуется метод выделения ДНК, описанный Llop *et al.* (1999), поскольку он был в широких масштабах испытан в ряде стран и является недорогим и легким для выполнения в лаборатории.

Метод выделения ДНК, описанный Llop *et al.* (1999)

Один миллилитр мацерата пробы, подготовленного, как описано в разделе 3.1.2, и/или 1 мл обогащенного мацерата центрифугируют при 10 000 g в течение 5 мин. при комнатной температуре. Супернатант сливают, осадок ресуспендируют в 500 мкл экстракционного буфера (Трис-HCl с pH 7,5, 24,2 г; NaCl, 14,6 г; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 9,3 г; додецилсульфат натрия (SDS), 5 г; PVP-10, 20 г; дистиллированная вода, 1 л; стерилизовать фильтрацией) и инкубируют 1 ч при комнатной температуре перед центрифугированием при 4 000 g в течение 5 мин. Приблизительно 450 мкл супернатанта смешивают с равным объемом изопропанола, переворачивают и оставляют при комнатной температуре на 30–60 мин. Преципитированную ДНК центрифугируют при 10 000 g в течение 5 мин., супернатант сливают, и осадок сушат на воздухе. Если на дне пробирки еще остается окрашенный преципитат (коричневый или зеленый), его осторожно убирают, сливая супернатант и получая таким образом более чистый осадок ДНК. Осадок ресуспендируют в 200 мкл воды и незамедлительно используют для ПЦР либо хранят при –20 °C.

3.1.5.3 Амплификация ДНК методом ПЦР

В настоящее время описано много праймеров и протоколов постановки ПЦР для определения *E. amylovora*, но некоторые из них продемонстрировали проблемы со специфичностью (Roselló *et al.*, 2006; Powney *et al.*, 2011a). В межлабораторных сравнительных испытаниях в 2003 году были валидированы праймеры и протоколы, описанные Bereswill *et al.* (1992) и Llop *et al.* (2000), с обогащением и без обогащения, а в 2009 и 2010 гг. валидированы праймеры и протоколы, описанные Taylor *et al.* (2001), Stöger *et al.* (2006) и Obradovic *et al.* (2007). Открытие полностью вирулентных штаммов *E. amylovora*, не содержащих плазмиды pEA29 (Llop *et al.*, 2006), и опыт лабораторий разных стран (Powney *et al.*, 2011a) указывают на то, что следует использовать два ПЦР-протокола: один с праймерами к хромосомным последовательностям pEA29, и второй с праймерами, имеющими сходство с уникальными хромосомными последовательностями. Если ПЦР отрицательна в протоколе, основанном на праймерах к pEA29, и положительна в протоколе, основанном на хромосомных праймерах, анализ ПЦР может считаться положительным для *E. amylovora*. ПЦР может проводиться с использованием различных праймеров и различных протоколов, валидированных в межлабораторных сравнительных испытаниях, но условия амплификации должны быть оптимизированы для разных термоциклов.

ПЦР по методу, описанному Bereswill et al. (1992)

Праймеры:

А (прямой): 5'-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3'

В (обратный): 5'-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3'

Последовательности-мишени находятся в плазмиде рЕА29. ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 17,4 мкл; буфер 10×, 2,5 мкл; MgCl₂, 50 мМ, 1,5 мкл; нуклеотиды dNTP, 10 мМ, 0,5 мкл; праймер А, 10 пмоль/мкл, 0,25 мкл; праймер В, 10 пмоль/мкл, 0,25 мкл; Taq ДНК-полимераза, 5 ед/мкл, 0,1 мкл. К 22,5 мкл ПЦР-смеси добавляют 2,5 мкл ДНК, выделенной из образца. Условия термоциклирования: этап денатурации 5 мин при 93 °С; 40 циклов по 30 сек. при 93 °С, 30 с при 52 °С и 1 мин. 15 с при 72 °С; завершающий этап элонгации 10 мин. при 72 °С. Размер ампликона составляет 900 пар оснований (п.о.) согласно Bereswill et al. (1992), хотя может варьировать от 900 до 1100 п.о. в зависимости от числа повторов по 8 п.о. в амплифицированном фрагменте (Jones & Geider, 2001).

В межлабораторном сравнительном испытании 2003 года точность метода составила 0,51, но возросла до 0,74 и 0,78 после обогащения проб на средах Кинга Б и ССТ соответственно (López et al., 2006).

ПЦР по методу, описанному Taylor et al. (2001)

Праймеры:

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

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

Последовательности-мишени находятся в хромосоме. ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 14,3 мкл; буфер 10×, 2,5 мкл; MgCl₂, 50 мМ, 0,75 мкл; нуклеотиды dNTP, 10 мМ, 0,25 мкл; G1-F, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; G2-R, 10 пмоль/мл, 1 мл; Taq ДНК-полимераза, 5 ед/мкл, 0,2 мкл. К 45 мкл ПЦР-смеси добавляют 5 мкл выделенной из образца ДНК. Условия термоциклирования: 3 мин. при 95 °С; 40 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при 60 °С и 1 мин. при 72 °С, с завершающим этапом элонгации 5 мин. при 72 °С и охлаждением при 15 °С. Ожидаемый размер ампликона – 187 п.о.

Точность метода составила 0,77 в межлабораторном сравнительном испытании 2010 года, в котором использовалась процедура экстракции ДНК по Llor et al. (1999).

ПЦР по методу, описанному Stöger et al. (2006)

Праймеры (по Llor et al., 2000):

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

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

Последовательности-мишени находятся в плазмиде рЕА29. Stöger et al. (2006) рекомендуют использовать этот метод с ДНК, экстрагированной с помощью набора REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich¹). ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 5 мкл; REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich¹), 10 мкл; PEANT1-F, 10 пмоль/мкл, 0,5 мкл; PEANT2-R, 10 пмоль/мкл, 0,5 мкл; экстрагированная ДНК, 4 мкл. Условия термоциклирования: 5 мин. при 95 °С; 35 циклов по 15 сек. при 95 °С, 30 с при 58 °С и 45 сек. при 72 °С, с завершающим этапом элонгации 5 мин. при 72 °С и охлаждением при 15 °С. Ожидаемый размер ампликона – 391 п.о.

Точность метода составила 0,76 в межлабораторном сравнительном испытании 2009 года и 0,72 в межлабораторном сравнительном испытании 2010 года, проводившихся с рекомендованным набором для экстракции ДНК.

ПЦР по методу, описанному Gottsberger (2010) (адаптированный метод Obradovic et al. (2007))

Праймеры:

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

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

Последовательности-мишени находятся в хромосоме. ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 14,3 мкл; буфер 10×, 2,5 мкл; MgCl₂, 50 мМ, 0,75 мкл; нуклеотиды dNTP, 10 мМ, 0,25 мкл; FER1-F, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; rgER2-R, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; Taq ДНК-полимераза, 5 ед/мкл, 0,2 мкл; экстрагированная ДНК, 5 мкл. Условия термоциклирования: 3 мин. при 94 °С; 41 цикл по 10 сек. при 94 °С, 10 сек. при 60 °С и 30 сек. при 72 °С, с завершающим этапом элонгации 5 мин. при 72 °С и охлаждением при 15 °С. Ожидаемый размер ампликона – 458 п.о.

Точность метода составила 0,76 в межлабораторном сравнительном испытании 2009 года и 0,68 в межлабораторном сравнительном испытании 2010 года, в которых использовался метод экстракции ДНК, описанный Llor et al. (1999).

Гнездовая ПЦР по методу, описанному Llor et al. (2000)

В гнездовой ПЦР по Llor et al. (2000) используют два набора праймеров, которые объединяют в одной реакционной пробирке. Благодаря разным температурам отжига праймеров две ПЦР идут последовательно. Используют внешние праймеры, разработанные McManus & Jones (1995) и основанные на последовательностях, которые находятся в плазмиде рEA29, и внутренние праймеры, описанные Llor et al. (2000).

Внешние праймеры:

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

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

Внутренние праймеры:

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

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

ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 36,25 мкл; буфер 10×, 5 мкл; MgCl₂, 50 мМ, 3 мкл; нуклеотиды dNTP, 10 мМ, 0,5 мкл; AJ75-F, 0,1 пмоль/мкл, 0,32 мкл; AJ76-R, 0,1 пмоль/мкл, 0,32 мкл; PEANT1-F, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; PEANT2-R, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; Taq ДНК-полимераза, 5 ед/мкл, 0,6 мкл. К 48 мкл ПЦР-смеси добавляют 2 мкл ДНК пробы. Условия термоциклирования: этап денатурации 4 мин. при 94 °С; 25 циклов по 60 сек. при 94 °С и 90 сек. при 72 °С. За первым раундом ПЦР в том же термоциклере следует второй этап денатурации: 4 мин. при 94 °С и 40 циклов по 60 сек. при 94 °С, 60 сек. при 56 °С и 60 сек. при 72 °С, с завершающим этапом элонгации 10 мин. при 72 °С. Ожидаемый размер ампликона – 391 п.о., хотя могут встречаться вариации.

Точность метода составила 0,69 и 0,72 в межлабораторных сравнительных испытаниях, проводившихся в 2003 и 2010 годах, соответственно, но после обогащения возросла до 0,84 (среда Кинга Б) и 0,86 (среда ССТ) в межлабораторном сравнительном испытании 2003 года и до 0,79 (среда Кинга Б) и 0,88 (ССТ) в межлабораторном сравнительном испытании 2010 года.

3.1.5.4 Общие положения по постановке ПЦР

При использовании различных реагентов и амплификаторов может возникнуть необходимость модификации (оптимизации) протоколов постановки ПЦР.

После ПЦР-амплификации присутствие *E. amylovora* в пробе может быть подтверждено секвенированием продуктов ПЦР или анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Паттерн рестрикции, наблюдающийся у ампликонов, полученных с

праймерами, разработанными Bereswill *et al.* (1992), или в гнездовой ПЦР по Llop *et al.* (2000), может использоваться для подтверждения специфичности анализа ПЦР при сравнении с паттерном рестрикции известного контрольного штамма. Расщепление рестриктазами проводится с эндонуклеазами DraI и SmaI.

Анализ считается отрицательным, если специфичный для *E. amylovora* ампликон ожидаемого размера (и паттерн рестриктазы или последовательность ампликонов, в соответствующих случаях) не обнаруживается в пробе, но обнаруживается во всех положительных контролях. Анализ считается положительным, если в пробе обнаруживается специфичный для *E. amylovora* ампликон ожидаемого размера, при условии, что амплификация отсутствует во всех отрицательных контролях и паттерн рестриктазы или последовательность ампликонов (в соответствующих случаях) характерны для *E. amylovora*.

3.1.5.5 ПЦР в режиме реального времени

На основе оценок протоколов ПЦР в режиме реального времени, полученных в межлабораторных сравнительных испытаниях 2009 и 2010 годов (Dreo *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010), рекомендуется описанный Pirc *et al.* (2009) протокол, мишенью в котором являются хромосомные последовательности. Описана также дуплексная ПЦР в реальном времени, основанная на хромосомных последовательностях, но межлабораторное сравнительное испытание этого метода не проводилось (Lehman *et al.*, 2008).

ПЦР в режиме реального времени по методу, описанному Pirc et al. (2009)

Используются следующие олигонуклеотиды:

праймер Ams116F: 5'-TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA-3'

праймер Ams189R: 5'-GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG-3'

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

Реакция проводится в конечном объеме 25 мкл. ПЦР-смесь: ультрачистая вода, 2,5 мкл; 2× TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems¹), 12,5 мкл; Ams116F, 10 пмоль/мкл, 2,25 мкл; Ams189R, 10 пмоль/мкл, 2,25 мкл; FAM-меченый Ams141T, 10 пмоль/мкл, 0,5 мкл; 5 мкл экстракта ДНК (добавляется к 20 мкл ПЦР-смеси). Условия термоциклирования: 2 мин. при 50 °C; 10 мин. при 95 °C; 40 циклов по 15 сек. при 95 °C и 1 мин. при 60 °C. Стандартная скорость изменения температур на анализаторах 7900HT и 7900HT Fast (Applied Biosystems¹): 1,6 °C/сек. при повышении и 1,6 °C/сек. при понижении. Возможно проведение реакции при более медленных изменениях температуры, но при более быстрых изменениях (повышение и понижение со скоростью приблизительно 3,5 °C/сек.) результаты были неприемлемыми. Ожидаемый размер ампликона – 74 п.о.

Для анализа результатов ПЦР в режиме реального времени существует ряд различных способов выставления уровней сигнала и шума, как автоматических, так и ручных. Следует соблюдать инструкции производителя соответствующего программного обеспечения. Базовая линия устанавливается автоматически, пороговый уровень устанавливается вручную пересечением экспоненциальной фазы контрольных кривых амплификации.

Точность данного метода в межлабораторном сравнительном испытании 2010 года составила 0,80, 0,85 и 0,76 сек. использованием метода экстракции ДНК по Llop *et al.* (1999), REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich¹) и Taylor *et al.* (2001) соответственно.

ПЦР в режиме реального времени по методу, описанному Gottsberger (2010)

Последовательность-мишень находится в хромосоме. Используются следующие олигонуклеотидные праймеры:

праймер hpEaF: 5'-CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA-3'

праймер hpEaR: 5'-AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT-3'

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

Реакция проводится в конечном объеме 20 мкл. ПЦР-смесь: ультраочищенная вода, 6 мкл; 2× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems¹), 10 мкл; hpEaF, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; hpEaR, 10 пмоль/мкл, 1 мкл; hpEaP, 1 пмоль/мкл, 1 мкл; 1 мкл экстракта ДНК (добавляется к 19 мкл ПЦР-смеси). Условия термоциклирования: 2 мин. при 50 °С; 10 мин при 95 °С; 50 циклов по 15 сек. при 95 °С и 1 мин. при 60°С. Ожидаемый размер ампликона – 138 п.о.

Для анализа результатов ПЦР в режиме реального времени существует ряд различных способов выставления уровней сигнала и шума, как автоматических, так и ручных. Следует соблюдать инструкции производителя соответствующего программного обеспечения. Базовая линия устанавливается автоматически, пороговый уровень устанавливается вручную пересечением экспоненциальной фазы контрольных кривых амплификации.

Точность данной ПЦР в реальном времени не могла быть определена в проводившемся в 2010 году межлабораторном сравнительном исследовании, однако в одной лаборатории она оценивалась параллельно с ПЦР в реальном времени по Pirc *et al.* (2009) и дала те же качественные результаты с использованием метода экстракции ДНК по Llop *et al.* (1999).

3.1.5.6 Интерпретация результатов ПЦР

Традиционная PCR

Патоген-специфичная реакция считается достоверной только при соблюдении следующих двух условий:

- (1) В положительном контроле воспроизводится ампликон характерного для бактерии размера.
- (2) В отрицательном контроле экстракции и отрицательном контроле амплификации ампликоны характерного для бактерии размера не воспроизводятся.

Если используются также внутренние праймеры для 16S рРНК, отрицательный (ткань здорового растения) контроль (в случае использования), положительный контроль и каждый из образцов для анализа должны воспроизвести ампликон размером 1,6 тысячи пар нуклеотидов (т.п.н.) (16S рРНК). Важно отметить, что синтетические или плазмидные положительные контроли не будут воспроизводить ампликон размером 1,6 т.п.н. Отказ проб амплифицироваться с праймерами внутреннего контроля может свидетельствовать, например, о том, что выделение нуклеиновой кислоты не удалось, нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, ингибирующие ПЦР, либо нуклеиновая кислота деградировала.

Результаты теста считаются положительными, если воспроизводится ампликон характерного для бактерии размера.

ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени считается достоверной только при соблюдении следующих двух условий:

- 1) Положительный контроль производит амплификационную кривую с патоген-специфичными праймерами.
- 2) Амплификационная кривая не наблюдается (т.е. величина порогового цикла (Ct) составляет 40) в отрицательном контроле выделения и отрицательном контроле амплификации.

Если используются также праймеры внутреннего контроля, мишенью для которых является ген COX, то отрицательный контроль (в случае использования), положительный контроль и каждая из проб для анализа должны производить амплификационную кривую. Отказ проб производить амплификационную кривую с праймерами внутреннего контроля может свидетельствовать, например, о том, что выделение нуклеиновой кислоты не удалось, нуклеиновая кислота не была

включена в реакционную смесь, в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, ингибирующие ПЦР, либо нуклеиновая кислота деградировала.

Тест считается положительным, если воспроизводится типичная амплификационная кривая экспоненциального типа. При проведении теста впервые величину C_t необходимо верифицировать в каждой лаборатории.

3.1.5.7 Петлевая изотермическая амплификация

Протокол LAMP был разработан и описан Temple *et al.* (2008) и Temple & Johnson (2011). Он прошел оценку в межлабораторном сравнительном исследовании, проводившемся в 2010 году, поскольку рассматривался в качестве подходящего для лабораторий, не имеющих оборудования для ПЦР, и легкого в постановке. В межлабораторном испытании выяснилось, что LAMP-протоколу с использованием праймеров для обнаружения хромосомного гена *amsL* бактерии *E. amylovora* не хватает чувствительности, необходимой для анализа проб с низкой концентрацией бактерий. Поэтому описываемый ниже LAMP-протокол обнаружения хромосомного гена *amsL* рекомендуется только для анализа образцов с симптомами, концентрация бактерий в которых превышает 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. Разработанный Temple & Johnson (2011) протокол, использующий праймеры для обнаружения рEA29, не проходил оценку в межлабораторном испытании.

Праймеры для обнаружения *amsL*:

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

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

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

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

Праймеры Fir и Bir использовались в конечной концентрации 2,4 мкМ, праймеры F и B – в конечной концентрации 0,2 мкМ. Температуры плавления праймеров составляли от 58 до 60 °С. Состав реакционной смеси: 10× буфер ThermoPol (New England Biolabs¹), 5 мкл; нуклеотиды dNTP, 10 мМ, 5 мкл; MgSO₄, 100 мМ, 2 мкл; альбумин бычьей сыворотки (BSA), 10 мг/мл, 2 мкл; ALB Fir, 100 мкМ, 1,2 мкл; ALB Bir, 100 мкМ, 1,2 мкл; ALB F, 10 мкМ, 1 мкл; ALB B, 10 мкМ, 1 мкл; *Bst*-полимераза, 8 ед/мкл, 2 мкл; матричная ДНК, 5 мкл; ультрачистая вода, 24,6 мкл. Важно: *Bst*-полимеразу, матричную ДНК и ультрачистую воду добавляют не в исходную смесь, а по отдельности после аликвотирования исходной смеси. Перед началом LAMP-реакции температуру водяной бани или термоциклера выставляют на 65 °С. Смесь подготавливают и пипетируют по 18,4 мкл в каждую ПЦР-пробирку объемом 0,2 мкл. Затем *Bst*-полимеразу, матричную ДНК и ультрачистую воду по отдельности пипетируют в каждую пробирку с исходной смесью. Пробирки центрифугируют в центрифуге для микропланшетов (1000 об/мин в течение 30 сек.) и на 55 мин. помещают на водяную баню (65 °С) в штативе таким образом, чтобы реакционная смесь была погружена в воду, либо помещают в термоциклер (65 °С). Затем пробирки вынимают и оставляют остыть на 10 сек.

Тест считается положительным, если наблюдается присутствие преципитата в виде помутнения раствора либо выпадения на дне пробирки твердого белого осадка из пирофосфата магния, как в положительном контроле. Чистый раствор свидетельствует об отрицательном результате, как в отрицательном контроле.

Точность метода в межлабораторном сравнительном исследовании 2010 года составила 0,64, однако для образцов с концентрацией патогена 10^5 – 10^6 КОЕ/мл точность составила 0,80. По этой причине LAMP рекомендуется только для анализа образцов от растений с симптомами.

3.2 Выявление в бессимптомных растениях

Рекомендуемые скрининговые тесты приводятся в схеме на рис. 2.

3.2.1 Отбор и подготовка проб

Бессимптомные образцы следует обрабатывать по отдельности (предпочтительно) или в сборных пробах, содержащих до 100 образцов (EPPO, 2013). При сборе образцов и в процессе экстракции следует принимать меры по предотвращению кросс-контаминации. Отбор и подготовку проб можно выполнять по одному из следующих протоколов:

- цветы, побеги, завязи или фрагменты веток собирают в стерильные пакеты летом или в начале осени, после установления благоприятных для размножения *E. amylovora* условий и подъема среднесуточной температуры выше 15 °С (van der Zwet & Beer, 1995). С подозрительного растения срезают молодые побеги приблизительно 20 см длиной или цветы, при их наличии. Если анализ необходимо провести зимой, собирают по 5–10 почек с растения. В лаборатории с отобранных растений срезают цветы (при их наличии), цветоножки и основания побегов с несколькими листьями, взятые у основания веток, или фрагменты побегов. Приблизительно 0,1–1,0 г растительного материала взвешивают и мацерируют в антиоксидантном буфере согласно протоколу, описанному в разделе 3.1.2.
- Описанная ниже процедура пробоотбора в применении к анализу веток бессимптомных растений из питомников не проходила валидацию. Проба состоит из 100 веток длиной около 10 см каждая, от 100 растений. Если в партии представлены растения нескольких родов, роды должны быть представлены в пробе поровну (не более трех родов на образец). Из каждой пробы в случайном порядке отбирают 30 веток, каждую ветку режут на 4 части, получив таким образом 120 фрагментов). Пробы помещают в конические колбы, заливают стерильным PBS, содержащим 0,1%-й раствор Tween-20. Колбы быстро вращают на ротационном шейкере в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу на стеклянном микропористом фильтре, используя вакуумный насос, фильтрат собирают и используют непосредственно для анализа либо центрифугируют при 10 000 g в течение 20 мин. Осадок суспендируют в 4,5 мл стерильного PBS. Выявление патогена проводится описанными ниже методами. Аналогичный протокол может применяться для листьев, побегов, цветов и почек.

В зависимости от времени пробоотбора ожидаемое выделение *E. amylovora* будет варьировать, с максимальным уровнем выделения летом (в том случае, если погодные условия благоприятны для *E. amylovora*) и сниженным уровнем выделения зимой. Пробы обрабатывают незамедлительно, проводя обогащение, за которым следуют постановка DASI-ELISA, ПЦР и изоляция с использованием протоколов, описанных для каждого метода, применяемого к образцам от растений с симптомами, у López *et al.* (2006). Иммунофлуоресцентный анализ не является обязательным; в случае проведения он должен проводиться на экстрактах, до обогащения.

3.2.2 Скрининговые тесты

В связи с низкой концентрацией бактерий результаты прямого анализа бессимптомных образцов на *E. amylovora*, как правило, отрицательны. Поэтому при анализе бессимптомных образцов абсолютным требованием является предварительное обогащение материала из проб, подготовленных в антиоксидантном буфере (раздел 3.2.1) (Gortis *et al.*, 1996), в течение 72 ч при температуре приблизительно 25 °С. Рекомендуется проведение по меньшей мере двух из следующих скрининговых тестов, основанных на разных биологических принципах:

- Изоляция с обогащением. Следуют процедуре, описанной для образцов с симптомами (раздел 3.1.3.2).
- DASI-ELISA с обогащением. Следуют процедуре, описанной для образцов с симптомами (раздел 3.1.4.1).
- ПЦР с обогащением или ПЦР в режиме реального времени с обогащением. Для экстракции ДНК используют 500–1000 мкл проб, обогащенных в среде Кинга Б и/или среде ССТ, затем следуют протоколам амплификации по Taylor *et al.* (2001) или Llop *et al.* (2000) (раздел 3.1.5.3), или протоколам ПЦР в режиме реального времени (раздел 3.1.5.5).

Если один из скрининговых тестов дал положительные результаты, но изоляция не удалась, следует попробовать провести изоляцию из образца, хранившегося с глицерином при -80°C , либо из обогащенных проб. Если три или более теста дали положительные результаты, но изоляция не удалась, есть все основания предполагать наличие *E. amylovora* в пробе, но для идентификации и подтверждения требуются изоляция патогена из новых проб и последующая идентификация бактерии.

4. Идентификация

Идентификацию следует основывать на результатах, полученных несколькими методами, поскольку другие виды *Erwinia*, такие как *E. piriflorinigrans* (López et al., 2011), *E. pyrifoliae* (Kim et al., 1999; Rhim et al., 1999), *E. uzenensis* (Matsuura et al., 2012) и другие *Erwinia* spp. (Kim et al., 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa et al., 2012), по своим морфологическим, серологическим и молекулярным характеристикам сходны с *E. amylovora*. Дифференцирование *E. amylovora* и близкородственных видов *Erwinia* (которые могут быть обнаружены в тканях со сходными симптомами у ряда хозяев) может быть обеспечено сочетанием трех методов, основанных на различных биологических принципах:

- ПЦР на основе хромосомной ДНК (разделы 3.1.5.2 и 4.3.1);
- DAS-ELISA с использованием специфичных моноклональных антител, согласно протоколу для выявления (раздел 3.1.4.1, за исключением этапа обогащения);
- Инокуляция растений-хозяев возбудителя бактериального ожога плодовых в целях соблюдения постулатов Коха, включая повторное выделение инокулированного патогена (раздел 4.4).

Для идентификации *E. amylovora* рекомендуется использовать как минимум два из этих методов. В зависимости от квалификации сотрудников лаборатории и наличия необходимого оборудования могут использоваться и другие тесты, которые описываются ниже. В случае необходимости окончательное подтверждение идентификации культуры включает тест на патогенность.

Для использования в качестве положительных контролей рекомендуются изоляты *E. amylovora* NCPPB 683 и CFBP 1430. В числе коллекций, которые могут предоставить различные референтные штаммы *E. amylovora*: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Fera, York, United Kingdom; Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), French National Institute for Agricultural Research (INRA), Station Phytobactériologie, Angers, France; Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent, Belgium; International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Manaaki Whenua Landcare Research, Auckland, New Zealand; American Type Culture Collection (ATTC), Manassas, VA, United States. Аутентичность штаммов может гарантироваться только в том случае, если они получены из коллекций культур.

4.1 Идентификация по питательной среде и идентификация по ферментативной активности

Ключевые фенотипические тесты полезны и до сих пор используются для идентификации, однако рекомендуется сочетать их с анализами на патогенность и серологическим или молекулярным анализом. Представители рода *Erwinia* – грамотрицательные, факультативные анаэробы, передвигающиеся с помощью перитрихальных жгутиков, палочковидные, способные образовывать кислоту из глюкозы, фруктозы, галактозы и сахарозы. Ключевые фенотипические признаки (Paulin, 2000), общие для большинства штаммов *E. amylovora*, согласно методам Jones & Geider (2001): тест на оксидазу (–), оксидативный/ферментативный (О/Ф) тест (+/+), флуоресцентный пигмент на среде Кинга Б под ультрафиолетом (–), образование левана (+), редукция нитратов (–), утилизация цитратов (+), разжижение желатина (+), уреазы и индол (–) и морфология колоний на среде ССТ.

Следующие тесты служат для дифференциации *E. amylovora*, *E. pyrifoliae* и *E. piriflorinigrans*, хотя у отдельных штаммов некоторые физиологические и биохимические характеристики могут варьировать (Таблица 1).

Таблица 1. Различия между *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifoliae* и *Erwinia piriflorinigrans*

Микробиологический тест	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>
Гидролиз желатина	+	–	–
Инозит [†]	–	н/о	+
Сорбит [†]	+	+	–
Эскулин [†]	V	–	+
Мелибиоза [†]	–	–	+
D-раффиноза [†]	–	–	+
β-генциобиоза [†]	+	–	+
Амплификация EP16A/EPI62C CPS1/CPS2C с [‡]	–	+	н/о

[†] По данным, приведенным Roselló *et al.* (2006) и López *et al.* (2011). Окисление субстратов на стрипах API 50 CH (bioMérieux) с использованием методов, описанных López *et al.* (2011). Указанные результаты наблюдаются у более 90% штаммов.

[‡] По данным Kim *et al.* (2001b).

н/о – не определено; V – вариательно.

4.1.1 Биохимическая характеристика

4.1.1.1 Определение профилей ферментативной активности и утилизации углеводов

Биохимическую идентификацию *E. amylovora* можно провести методом профилирования на стрипах API 20 E и API 50 CH (bioMérieux¹).

API 20 E¹. Подготовку суспензии и инокуляцию стрипа проводят в соответствии с инструкциями производителя. Стрип инкубируют при 25–26 °С. Результаты считывают через 48 ч. Ключевые признаки для типичной культуры *E. amylovora*: лизиндекарбоксилаза (LDC), орнитиндекарбоксилаза (ODC), цитратный признак (CIT), образование H₂S (SH₂), уреазы (URE), триптофан дезаминаза (TDA), образование индола (IND) и окисление рамнозы (RHA) – положительно, окисление сахарозы (SAC) – положительно. Другие тесты могут варьировать, по данным Donat *et al.* (2007).

API 50 CH¹. Готовят суспензию с ОП 1,0 (при длине волны 600 нм) в PBS. Один миллилитр суспензии добавляют к 20 мл среды Айерса (NH₄H₂PO₄, 1 г; KCl, 0,2 г; MgSO₄, 0,2 г; бромтимоловый синий 0,2%, 75 мл; дистиллированная вода, 1 л; pH 7; стерилизовать 20 мин при 120 °С) (Ayers *et al.*, 1919). Стрип инокулируют в соответствии с инструкциями производителя и инкубируют при 25–26 °С в аэробных условиях. Утилизацию различных углеводов наблюдают по желтому окрашиванию лунок. Результаты считывают через 72 ч. Ключевые признаки для типичной культуры *E. amylovora*: L-арабиноза, рибоза, D-глюкоза, D-фруктоза, маннитол, сорбитол, N-ацетилглюкозамин, сахароза, трегалоза и β-генциобиоза – положительно. Остальные сахара в указанных условиях *E. amylovora* не утилизируются, но некоторые штаммы могут утилизировать глицерин и D-фукозу, по данным Donat *et al.* (2007).

4.1.1.2 Автоматизированная идентификация

Коммерчески доступные системы автоматизированной идентификации (OmniLog¹, Biolog¹) включают 94 фенотипических теста в титрационном микропланшете и сопутствующее программное обеспечение. Предварительную идентификацию *E. amylovora* в подозрительных изолятах проводят в соответствии с инструкциями производителя.

4.1.1.3 Анализ профиля жирных кислот

Для анализа профиля жирных кислот (FAP) леванположительные нефлуоресцирующие колонии культивируют на коммерчески доступном триптиказо-соевом агаре в течение 48 ч. при 28 °С (Sasser, 1990). После надлежащей процедуры экстрагирования жирных кислот полученный экстракт анализируют на газовом хроматографе, используя коммерчески доступное программное обеспечение Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI¹) либо другое соответствующее программное обеспечение для предварительной идентификации *E. amylovora* по Wells *et al.* (1994).

4.2 Серологическая идентификация

4.2.1 Агглютинация

Колонии бактерий с подозрением на *E. amylovora* можно предварительно идентифицировать с помощью реакции агглютинации на предметном стекле. Густую клеточную суспензию смешивают на предметном стекле с каплей PBS и каплей антисыворотки к *E. amylovora* (неразведенной либо в разведении только от 1:5 до 1:10). Могут использоваться моноклональные антитела при условии, что они агглютинируют референтные штаммы. Специфичность антител должна быть установлена заранее.

4.2.2 Иммунофлуоресценция

Из леванположительных нефлуоресцирующих колоний готовят суспензию с концентрацией приблизительно в 10⁶ клеток/мл в PBS и проводят иммунофлуоресцентный анализ согласно разделу 3.1.4.3. Специфичность антител должна быть установлена заранее.

4.2.3 Иммуноферментный анализ

Прямой иммуноферментный анализ отпечатка ткани (раздел 3.1.4.2), двухстадийный иммуноферментный анализ сэндвич-типа (DASI-ELISA) (раздел 3.1.4.1) и непрямой иммуноферментный анализ (см. ниже) для идентификации изолята можно проводить с использованием специфичных моноклональных антител. Смесь моноклональных антител оценивалась в двух межлабораторных сравнительных испытаниях метода DASI-ELISA. Из подозрительных колоний готовят в PBS суспензию концентрацией приблизительно 10⁸ кл/мл. Можно использовать протокол DASI-ELISA, описанный в разделе 3.1.4.1, но без этапа обогащения.

Непрямой иммуноферментный анализ

Чистые культуры предполагаемых изолятов обрабатывают при 100 °С в течение 10 мин. на водяной бане или в термостате для снижения вероятности неспецифических реакций с коммерчески доступными моноклональными антителами. Аликвоты культуры по 200 мкл смешивают с равным объемом карбонатного буферного раствора (Na₂CO₃, 1,59 г; NaHCO₃, 2,93 г; дистиллированная вода, 1 л; pH 9,6) и вносят как минимум в две лунки микротитрационного планшета. Планшет инкубируют при 37 °С в течение 1 ч. либо при 4 °С в течение ночи. Экстракты быстро сливают из лунок, планшет трижды промывают отмывочным буферным раствором (см. протокол DASI-ELISA). Специфичные к *E. amylovora* антитела производства Plant Print Diagnostics SL¹ подготавливают в рекомендованных разведениях. В каждую лунку добавляют по 200 мкл разведений специфичных к *E. amylovora* антител, и инкубируют планшет при температуре 37 °С в течение 1 ч. Раствор антител быстро сливают из

лунок, лунки промывают, как указано выше. Готовят подходящее разведение конъюгата щелочной фосфатазы с вторичными (детекторными) антителами (GAM-AP) в PBS, содержащем 0,5% BSA. В каждую лунку вносят по 200 мкл разведенного конъюгата, планшет инкубируют при 37 °C 1 ч. Затем конъюгат быстро выливают из лунок, лунки промывают как указано выше. Готовят раствор субстрата для щелочной фосфатазы (p-нитрофенилфосфат) в субстратном буфере (диэтаноламин, 97 мл; дистиллированная вода, 800 мл; pH доводят до 9,8 добавлением концентрированной HCl; затем объем доводят до 1000 мл добавлением дистиллированной воды) в концентрации 1 мг/мл. В каждую лунку добавляют по 200 мкл субстратного раствора щелочной фосфатазы. Планшет инкубируют в темноте при комнатной температуре и считывают результаты при длине волны 405 нм через равные промежутки времени в течение 90 мин. О положительном результате свидетельствует изменение цвета субстрата на желтый.

4.2.4 Иммунохроматографический анализ

Для предварительной идентификации готовят суспензию чистой культуры с концентрацией 10^7 КОЕ/мл. Используют буферные растворы и представленные производителями иммунохроматографических наборов протоколы, согласно описанию в разделе 3.1.4.4.

4.3 Молекулярная идентификация

4.3.1 ПЦР

Суспензию с концентрацией приблизительно 10^6 кл/мл готовят в стерильной воде для молекулярной биологии из очищенных леванположительных, нефлуоресцирующих колоний и нагревают при 100 °C в течение 10 мин. Соответствующие ПЦР-методы либо LAMP-протокол применяют согласно описанию, данному в разделах с 3.1.5.2 по 3.1.5.4 (без экстракции ДНК). При постановке ПЦР для идентификации изолированных колоний используют 1 единицу Taq ДНК-полимеразы (вместо 2 единиц, как для растительного материала).

4.3.2 Макрорестрикционный анализ ДНК с использованием гель-электрофореза в пульсирующем поле

Анализ геномной ДНК после расщепления рестриктазой *XbaI* с использованием гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) по Jock *et al.* (2002) демонстрирует шесть паттернов рестрикции для европейских штаммов *E. amylovora*. Данный метод может представить полезную информацию для дифференцирования штаммов и применяется для представления о распространении бактериального ожога плодовых в Европе (Jock *et al.*, 2002; Donat *et al.*, 2007).

4.4 Методы проверки на патогенность

Для соблюдения постулатов Коха и подтверждения патогенности бактерий колонии с подозрением на *E. amylovora* перепрививают на растения-хозяева. Для инокулирования используют чувствительные к *E. amylovora* сорта груш (например, Конференц, Дуайен дю Комис, Вильямс, Пасс-Крассан), яблوك (например, Фуджи, Гала, Айдаред, Джонатан), мушмулы (например, Алжир, Танака), *Crataegus* spp., *Cotoneaster* spp. или *Pyracantha* spp. Молодые побеги инокулируют, разрезая молодой лист поперек по центральной жилке ножницами, смоченными в суспензии 10^9 КОЕ/мл каждого изолята, приготовленной в PBS. Растения инкубируют при 20–25 °C и относительной влажности приблизительно 80% в течение одной-двух недель. Срезанные с выращенных в теплице растений молодые побеги, стерилизованные с поверхности (30 сек. в 70%-м этиловом спирте, затем три раза сполоснуть стерильной дистиллированной водой) можно инокулировать тем же методом и поместить в пробирки со стерильным 1%-м агаром. Пробирки инкубируют при 20–25 °C в условиях 16-часового освещения в сутки.

Также можно провести инокуляцию на незрелых плодах восприимчивых к патогену сортов груш, яблук и мушмулы, нанеся 10 мкл суспензии 10^9 КОЕ/мл изолятов в PBS на свежие надрезы на поверхности дезинфицированных плодов (30 мин. в 70%-м растворе промышленного

хлорсодержащего дезинфектанта, затем три раза промыть стерильной дистиллированной водой). Плоды инкубируют во влажной камере при 25 °С 3–5 дней.

После появления на инокулированных органах симптомов, типичных для бактериального ожога плодовых, колонии бактерий повторно изолируют и определяют. О положительном результате теста говорит выделение бактериального экссудата и появление коричневой окраски вокруг места инокуляции через 2–7 дней, наблюдаемые в положительном контроле с *E. amylovora*, при условии, что в отрицательном контроле язвы на месте инокуляции отсутствуют либо наблюдается только небольшая некротическая язва.

Возможно использование других техник инокуляции. Реакция гиперчувствительности на табаке может указывать на экспрессию генов *hrp E. amylovora*, но этот тест может давать положительные результаты для многих других фитопатогенных бактерий. Используют растения табака сорта Ксанти или Самсун в фазе >5–6 листьев. Готовят бактериальные суспензии 10⁹ КОЕ/мл (ОП 1,0 при длине волны 600 нм) и с помощью шприца с иглой вводят их в межклеточное пространство настоящих листьев. Полное разрушение инфильтрированной ткани через 24–48 часов при комнатной температуре считается положительным результатом, если подтверждается положительным контролем с растением-хозяином *E. amylovora*.

5. Данные

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

В тех случаях, когда результаты диагностики могут отразиться на других договаривающихся сторонах, в особенности в случаях несоответствия (МСФМ 13 (*Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*)), а также если вредный организм обнаружен на территории впервые, следующие данные и свидетельства и дополнительные материалы должны храниться в течение по меньшей мере одного года способом, обеспечивающим отслеживаемость: исходный образец, культура (культуры) вредного организма, зафиксированные на предметных стеклах микропрепараты или образцы или исследуемые материалы (например, электрофореграммы, распечатки результатов иммуноферментных анализов и продукты ПЦР (ампликоны)).

6. Контактные лица для получения дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить в:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax +34 963424001).

Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, 231 Morrin Road, St Johns, Auckland 1140, New Zealand (Robert Taylor; e-mail: Robert.Taylor@mpi.govt.nz; tel.: +64 99093548; fax: +64 99095739).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен НОКЗР, региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

7. Выражение признательности

Первый проект настоящего протокола был написан М. М. López (Centro de Protección Vegetal, IVIA, Spain (см. предыдущий раздел)) и редактировался R. Taylor (Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, New Zealand (см. предыдущий раздел)) и R. Roberts (Tree Fruit Research Laboratory, USDA-ARS, United States).

Большинство описанных методов анализа прошли оценку в межлабораторных сравнительных испытаниях в рамках проекта DIAGPRO, финансировавшегося Европейским союзом в 2003 году, проекта EUPHRESKO в 2009 году и проводившегося в Испании в 2010 году проекта.

8. Справочные материалы

Настоящий стандарт ссылается на МСФМ. МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФИП): <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L. & Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systemic Bacteriology*, 49: 899–906.
- Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S. & Geider, K.** 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 147: 2951–2959.
- Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L. & Geider, K.** 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease*, 85: 1183–1188.
- King, E.O., Ward, M. & Raney, D.E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–307.
- Lehman, S.M., Kim, W.K., Castle, A.J. & Svircev, S.M.** 2008. Dualplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology*, 98: 673–679.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. & López, M.M.** 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071–2078.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23–31.
- Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J.L., Montesinos, E. & López, M.M.** 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900–907.
- López, M.M., Llop, P., Gorris, M.T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. & Cambra, M.** 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99–103.
- López, M.M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bersgma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. & Reisenzein, H.** 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. ISHS 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, 16–20 August 2010, abstract 18.
- López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. & Gardan, L.** 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 61: 561–567.
- McManus, P.S. & Jones, A.L.** 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology*, 85: 618–623.
- Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. & Sawada, H.** 2012. *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, doi:10.1099/ijs.0.032011-0.
- Obradovic, D., Balaz, J. & Kevresan, S.** 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologija*, 76: 844–852.
- Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., López, M.M. & Marco-Noales, E.** 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 106–116.
- Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. & López, M.M.** 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species. *Trees*, 26: 13–29.
- Paulin, J.P.** 2000. *Erwinia amylovora*: General characteristics, biochemistry and serology. In J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*, pp. 87–116. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.

- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. & Dreo, J.** 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872–881.
- Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. & Rodoni, B.** 2011a. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australian Plant Pathology*, 40: 87–97.
- Powney, R., Smits, T.H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B. & Rodoni, B.** 2011b. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *Journal of Bacteriology*, 193: 785–786.
- Rhim, S.-L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J.-P., Langlotz, C., Kim, S.-L. & Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology*, 48: 514–520.
- Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M.T., Charter, R., Cambra, M. & López, M.M.** 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 1–12.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In F. Klement, K. Rudolf & D.C. Sands, eds. *Methods in phytobacteriology*, pp. 199–204. Budapest, Akademiai Kiadó.
- Starr, M.P., Cardona, C. & Folsom, D.** 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology*, 41: 9515–9559.
- Stöger, A., Schaffer, J. & Ruppitsch, W.** 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 154: 469–473.
- Tanii A., Tamura, O. & Ozaki, M.** 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 47: 102.
- Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N. & Forster, R.L.S.** 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35–43.
- Temple, T.N. & Johnson, K.B.** 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease*, 95: 423–430.
- Temple, T.N., Stockwell, V.O. & Johnson, K.** 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae*, 793: 497–504.
- Thomson, S.V.** 2000. Epidemiology of fire blight. In J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*, pp. 9–36. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.
- Van der Zwet, T.** 2004. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae*, 704: 35.
- Van der Zwet, T. & Beer, S.** 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin*, No. 631.
- Van der Zwet, T. & Keil, H.L.** 1979. *Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants*. United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 510. Washington, DC, USDA.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.** 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697–703.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.
- Wells, J.M., van der Zwet, T. & Hale, C.N.** 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the “*amylovora*” group by class analysis of cellular fatty acids. *Journal of Phytopathology*, 140: 31–38.

9. Рисунки

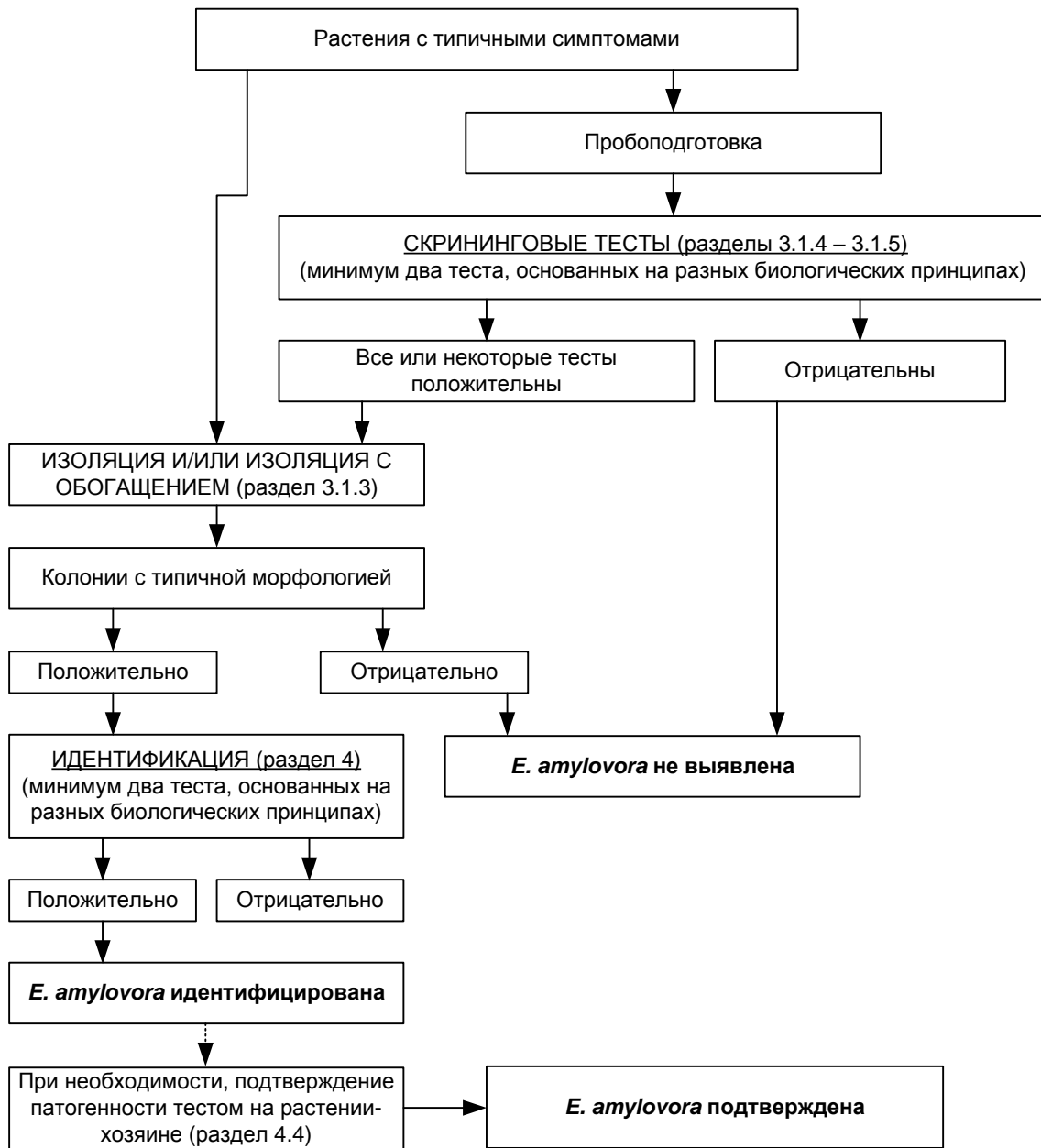


Рис. 1. Схема выявления и идентификации *Erwinia amylovora* в образцах с симптомами бактериального ожога.

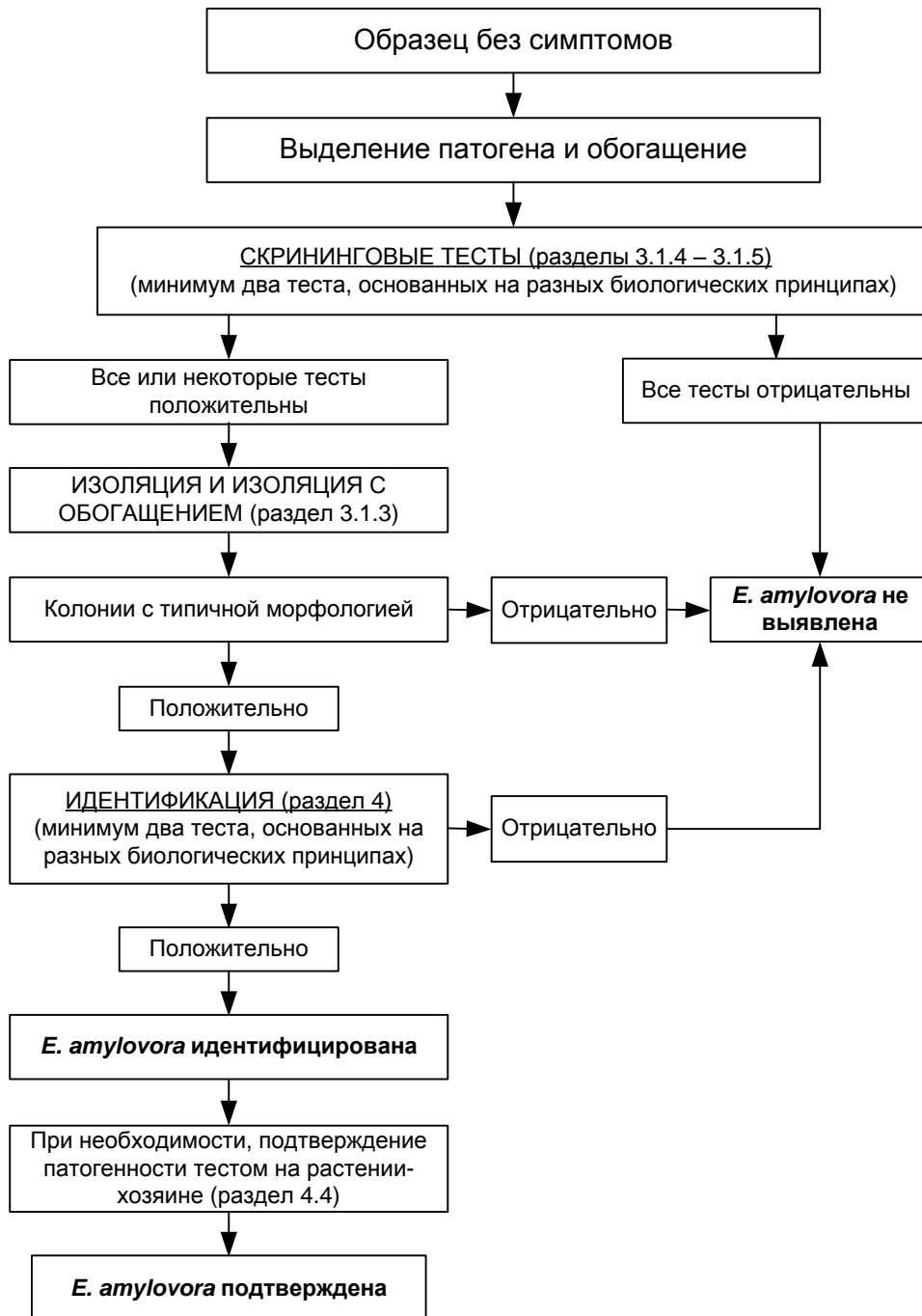


Рисунок 2. Схема выявления и идентификации *Erwinia amylovora* в образцах без симптомов.

* Есть все основания подозревать наличие *E. amylovora* в образце, но для идентификации требуется изоляция патогена из новых образцов и последующая идентификация

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2004-11 КС представил первоначальную тему: *Erwinia amylovora* (2004-009).

2006-04 КФМ-1 добавила в программу работы тему (Бактерии).

2012-11 Первый проект протокола представлен ТГЭДП (заседание).

2013-06 Проект протокола представлен ТГЭДП (заседание).

2014-05 КС одобрил текст для проведения консультаций с членами (2014_eSC_May_08).

2014-07 Консультация с членами.

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

2016-03 ТГЭДП в электронном решении одобрила текст для принятия (2016_eTPDP_Mar_01).

2016-05 КС в электронном решении утвердил 45-дневный период нотификации ДП (2016_eSC_May_12).

2016-07 Период нотификации по ДП.

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

МФСМ 27. Приложение 13. *Erwinia amylovora* (2016). Рим, МККЗР, ФАОАО.

История публикации последний раз обновлена: 2016-10.