

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 15: *Вирус тристецы цитрусовых*

Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	3
2.	Таксономическая информация	4
3.	Обнаружение и идентификация	4
3.1	Спектр хозяев	5
3.2	Симптомы	5
3.3	Биологическая индикация	6
3.4	Взятие и приготовление образцов для серологического и молекулярного тестирования.....	7
3.4.1	Взятие образцов.....	7
3.4.2	Приготовление тканевых отпечатков.....	8
3.4.2.1	Приготовление тканевых отпечатков для серологического исследования	8
3.4.2.2	Приготовление тканевых отпечатков и давленных препаратов тлей для молекулярного исследования.....	8
3.4.2.2	Приготовление растительных экстрактов для серологического и молекулярного исследования	8
3.5	Серологические тесты	9
3.5.1	Прямой ИФА тканевых отпечатков.....	9
3.5.2	"Сэндвич"-ИФА.....	9
3.6	Молекулярные тесты.....	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 единственной закрытой пробирке ..	12
3.6.4	Общие соображения относительно стандартной и вложенной ОТ-ПЦР.....	12
3.6.5	ОТ-ПЦР в реальном времени	13
3.6.7	Интерпретация результатов стандартной ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени	14
3.6.1	Контроли для молекулярных тестов.....	14
3.6.7.1	Стандартная ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР с иммунозахватом	14
3.6.7.2	ОТ-ПЦР в реальном времени	15

3.7	Валидация путем исследования эффективности теста	15
4.	Идентификация агрессивных штаммов ВТЦ.....	16
4.1	Биологическая индикация	16
4.2	Серологические тесты с использованием МСА13	17
4.2.1	Прямой ИФА тканевых отпечатков.....	17
4.2.2	"Сэндвич"-ИФА (DAS-ИФА).....	17
5.	Данные.....	17
6.	Контактные адреса для дополнительной информации	17
7.	Благодарности	18
8.	Справочные материалы.....	18
9.	Рисунки.....	22

1. Информация о вредном организме

Вирус tristeza цитрусовых (ВТЦ, *Citrus tristeza virus*) является возбудителем одной из наиболее деструктивных болезней цитрусовых, разрушительные эпидемии которой изменили развитие индустрии выращивания этих культур (Moreno *et al.*, 2008). Термин "тристеца" (от португальского "tristeza" – грусть, меланхолия) применяется для обозначения угнетения жизнедеятельности многих видов цитрусовых после прививки на растениях померанца (апельсина горького) (*Citrus aurantium*) или лимона (*Citrus limon*), используемых в качестве подвоя. Несмотря на то что тристеца поражает главным образом место прививки (Román *et al.*, 2004), некоторые штаммы ВТЦ вызывают другие синдромы, в том числе ямчатость древесины, карликовость, снижение плодородности и ухудшение качества плодов у многих коммерческих сортов, даже когда прививка проводится на подвоях, толерантных к тристеце.

Местом происхождения ВТЦ, вероятно, является Малайзия и другие страны Юго-Восточной Азии, предполагаемая родина цитрусовых. С течением времени, за счет перемещений инфицированного посадочного материала, вирус распространился почти по всем странам, выращивающим цитрусовые. В последующем местное распространение различными видами тлей-переносчиков стало причиной крупных эпидемий.

Гибель деревьев, привитых на растениях померанца, была впервые документирована в Южной Африке в начале XX века и в Аргентине и Бразилии в 1930-х годах. Причиной, по всей вероятности, являлся завоз ВТЦ-инфицированных растений, инфицированных тлями *Toxoptera citricida* Kirkaldy, которые являются активным переносчиком вируса. Угнетение жизнедеятельности деревьев под воздействием ВТЦ приводит к гибели или потере плодородности деревьев, для которых в качестве подвоя был использован померанец (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a). Вспышки ВТЦ отмечались в Соединенных Штатах, некоторых странах Карибского бассейна и Средиземноморья (особенно в Италии и Марокко). От ВТЦ пострадало около 38 млн деревьев в странах Америки (в основном в Аргентине, Бразилии, Венесуэле и в Калифорнии (Соединенные Штаты)), 60 млн деревьев в Средиземноморском бассейне (особенно в Испании, где вирус поразил около 50 млн деревьев) и примерно 5 млн деревьев в других регионах. Таким образом, общий ущерб составил более 100 млн деревьев. Тристецу можно предупреждать путем использования в качестве подвоя таких видов цитрусовых, которые способствуют развитию толерантности к вирусу. Однако некоторые наиболее агрессивные штаммы ВТЦ вызывают у определенных сортов цитрусовых ямчатость древесины вне зависимости от использованного подвоя. Заражение этими агрессивными штаммами наносит значительный ущерб применительно к качеству плодов и урожайности миллионов деревьев в большинстве цитрусовых предприятий по всему миру, за исключением хозяйств в странах Средиземноморского бассейна, где данные агрессивные штаммы не присутствуют или не являются преобладающими. В качестве меры борьбы с ямчатостью древесины некоторые цитрусовые хозяйства применяют метод так называемой перекрестной защиты – профилактического заражения деревьев штаммами ВТЦ, вызывающими легкую форму болезни (Broadbent *et al.*, 1991; da Graça and van Vuuren, 2010).

ВТЦ – это самый крупный и наиболее сложный по структуре представитель рода *Closterovirus* (Moreno *et al.*, 2008). Вирионы имеют извитую нитчатую форму, длину 2000 нм и 11 нм в диаметре; геном представлен несегментированной, положительно направленной, одноцепочечной РНК. Геном ВТЦ содержит 12 открытых рамок считывания (ORF), кодирующих не менее 17 белков, и 2 нетранслируемые области (UTR). ORF 7 и 8 кодируют белки с молекулярным весом примерно 27,4 кДа (P27) и 24,9 кДа (P25), идентифицированные как капсидные протеины. Разнообразие ВТЦ выражено в большей степени, чем предполагалось ранее; новые генотипы возникают в качестве ответвлений предковой популяции или образуются в результате рекомбинации с ранее описанными штаммами (Harper *et al.*, 2008). Популяции ВТЦ в цитрусовых деревьях, по сути, являются квазивидами: это сложные смеси вирусных генотипов и дефектных вирусных РНК, образующиеся в течение длительного процесса вегетативного размножения вирусных изолятов посредством прививки и смешивания таких изолятов с изолятами, переносимыми тлями. Это

приводит к формированию изолятов ВТЦ, содержащих популяцию с различными вариантами генетической последовательности, один из которых обычно преобладает (Moreno *et al.*, 2008).

ВТЦ легко переносится в эксперименте путем прививки здорового цитрусового растения на инфицированный подвой. В естественных условиях он переносится определенными видами тлей на полупостоянной основе. В мировом масштабе наиболее выраженной способностью к переносу ВТЦ обладает *T. citricida*. Этот вид тлей широко распространен в Азии, Австралии, странах Африки к югу от Сахары, в Центральной и Южной Америке, Карибском бассейне, во Флориде (Соединенные Штаты), на севере материковой Испании и Португалии, а также на островах архипелага Мадейра (Pharco *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008). Однако в Испании, Израиле, некоторых цитрусоводческих регионах Калифорнии (Соединенные Штаты) 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 этих видов тлей-переносчиков на распространение ВТЦ (Gottwald *et al.*, 1997). В качестве переносчиков ВТЦ 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). В экспериментальных условиях было показано, что вышеперечисленные виды менее эффективно переносят ВТЦ по сравнению с *T. citricida* и *A. gossypii*, однако в некоторых регионах они встречаются наиболее часто и поэтому, по всей вероятности, активно участвуют в распространении ВТЦ, компенсируя низкую эффективность передачи за счет массивного присутствия в природе (Marroquín *et al.*, 2004).

Были исследованы временные и пространственные характеристики распространения ВТЦ в цитрусовых хозяйствах различных стран мира (Gottwald *et al.*, 2002). В этих работах было объективно доказано, что от инокуляции первичного источника ВТЦ до развития эпидемии тристецы может пройти длительное время (Garnsey and Lee, 1988).

2. Таксономическая информация

Название: *Вирус тристецы цитрусовых* (сокр. ВТЦ)

Синонимы: Citrus tristeza virus

Таксономическая позиция: *Closteroviridae, Closterovirus*

Обычное название: *Тристеца, вирус тристецы цитрусовых*

3. Обнаружение и идентификация

ВТЦ можно выявлять и идентифицировать с использованием биологических, серологических и молекулярных тестов (рис. 1 и 2). Применение любого из них является минимальным требованием для выявления и идентификации ВТЦ (например, в рамках рутинной диагностики заражения вредителем при его широком распространении в стране). В тех случаях, когда национальная организация по карантину и защите растений (НОКЗР) нуждается в идентификации ВТЦ с дополнительной надежностью (например, при обнаружении на территории, где вирус ранее не встречался, или в грузе, прибывшем из страны, где было объявлено отсутствие данного вредителя), необходимо дальнейшее тестирование. Если первоначальная идентификация была выполнена с применением молекулярного теста, в дальнейшем исследовании необходимо использовать серологические тесты и наоборот. С помощью дополнительного тестирования можно также идентифицировать присутствующий штамм ВТЦ, и в таком случае может потребоваться секвенирование ампликона, полученного с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для обеспечения валидности любого теста в процедуру его проведения следует в обязательном порядке включать положительные и отрицательные контроли. Рекомендуемые методики биологических, серологических и молекулярных тестов описаны в последующих разделах. Блок-схема процесса идентификации ВТЦ 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, 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.

3.1 Спектр хозяев

В естественных условиях ВТЦ легко инфицирует большинство видов *Citrus* и *Fortunella*, а также некоторые восприимчивые к ВТЦ виды, принадлежащие к родам "родственников цитрусовых" 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 *Poncirus trifoliata* (трифолиата) и многие его гибриды, а также *Fortunella crassifolia* (кумкват Мейва) и некоторые разновидности *Citrus grandis* (помело) устойчивы к большей части штаммов ВТЦ (Moreno *et al.*, 2008). Поэтому в данных видах ВТЦ отсутствует или обнаруживается в крайне низких концентрациях. Среди культурных сортов, наиболее восприимчивых к ВТЦ-инфекции в естественных условиях, можно отметить *Citrus reticulata* (мандарин), *Citrus sinensis* (апельсин сладкий) и *Citrus latifolia* (лайм), за которыми следуют *Citrus paradisi* (грейпфрут), *Citrus unshiu* (мандарин уншиу) и *C. limon*. Среди видов, применяемых в качестве подвоя, высокой восприимчивостью к естественному заражению ВТЦ отличаются *Citrus macrophylla*, *Citrus volkameriana*, *Citrus reshni* (мандарин Клеопатра) и *Citrus limonia* (рангпур, или лемандарин), в то время как цитранж Карризо и Тройер (гибриды апельсина сладкого и трифолиаты) и *C. aurantium* инфицируются редко. Подвои на основе *P. trifoliata* и *C. paradisi* × *P. trifoliata* (цитрумело) устойчивы к большинству штаммов ВТЦ. В качестве экспериментальных нецитрусовых хозяев применяются *Passiflora gracilis* и *Passiflora coerulea*.

3.2 Симптомы

Выраженность симптоматики в цитрусовых растениях, зараженных ВТЦ, варьирует в широких пределах и зависит от условий окружающей среды, вида растения-хозяина и агрессивности штамма ВТЦ. Кроме того, вирус может в течение ряда лет оставаться в латентном состоянии. Некоторые штаммы ВТЦ обладают слабой патогенностью и не вызывают заметных поражений у большинства коммерческих видов цитрусовых, в том числе прививаемых на *C. aurantium*. В целом, особенно высокую толерантность к инфекции ВТЦ 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 ВТЦ, вида цитрусовых или сочетания подвоя и привоя, вирус может либо не вызывать никаких симптомов, либо вызывать развитие одного из трех следующих синдромов: тристеца; ямчатость древесины; желтуха сеянцев, возникающая чаще в условиях теплицы. Эти три синдрома описаны в последующих параграфах. На рисунке 1 показаны основные симптомы, свойственные инфекциям ВТЦ.

Одно из наиболее важных в экономическом отношении проявлений ВТЦ-инфекции – это тристеца ("болезнь места прививки"), которая характеризуется угнетением жизнедеятельности 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 претерпевают медленное угнетение жизнедеятельности), в то время как на других привоях наблюдается стремительное угнетение жизнедеятельности или полное отмирание уже в первые дни после появления симптоматики. Причиной поражения является воздействие вируса на физиологические процессы во флоэме восприимчивого подвоя в непосредственной близости от

места прививки. При угнетении медленного типа обычно появляется выпуклость над местом прививки, коричневая линия в месте соединения привоя и подвоя, а также разлитая мелкая ямчатость (в виде пчелиных сот) на внутренней поверхности коры померанца, использованного в качестве подвоя. На зараженных растениях часто наблюдаются такие симптомы, как низкорослость, деформация (вогнутость) листьев, патологическое просветление листовых жилок, ямчатость древесины и уменьшение размеров плодов. Однако некоторые изоляты вируса, особенно в цитрусовых хозяйствах Средиземноморского бассейна, не вызывают симптомов угнетения жизнедеятельности в течение многих лет после заражения, даже на деревьях, привитых на померанце.

Агрессивные штаммы ВТЦ могут обуславливать тяжелые повреждения деревьев, вызывая ямчатость древесины ствола и ветвей лайма, грейпфрута и апельсина. Ямчатость древесины иногда приводит к бугристой или жилистой деформации ствола и ветвей взрослых деревьев, появлению выраженных вмятин древесины под деформированными участками коры, а также к снижению урожайности и качества плодов. Подвой на основе макрофиллы подвержены тяжелым повреждениям под воздействием большинства штаммов ВТЦ: развивается ямчатость древесины, вызывающая угнетение жизнедеятельности растения.

Синдром желтухи сеянцев характеризуется задержкой роста, появлением хлоротичных или бледных листьев, недоразвитием корневой системы и прекращением роста деревьев, привитых на сеянцах померанца, грейпфрута и лимона, выращенных в тепличных условиях (20–26 °С).

3.3 Биологическая индикация

Задачей биологической индикации является обнаружение ВТЦ в партиях или выборках или в отдельных образцах растений в ходе оценки их санитарного состояния, а также определение уровня агрессивности изолята на сеянцах *Citrus aurantifolia* (мексиканский, настоящий, или оманский лайм), *C. macrophylla* или *Citrus paradisi* Macfadyen (грейпфрут Дункан). Индикатором является привой, инокулированный по обычной методике и выдерживаемый в стандартных условиях (Roistacher, 1991) в 4–6 экземплярах (или в 2–3 экземплярах при невозможности взятия достаточного числа образцов). Появление на этих чувствительных индикаторных растениях после их прививки любого из таких симптомов, как просветление жилок на молодых листьях, вогнутость или деформация листьев, укорочение междоузлий, ямчатость древесины или желтуха сеянцев, является свидетельством инфекции, вызванной ВТЦ. Развитие симптомов оценивается в сравнении с положительными и отрицательными контрольными растениями. С иллюстрациями симптомов, вызываемых ВТЦ на индикаторных растениях, можно ознакомиться в работах Roistacher (1991) и Moreno *et al.* (2008).

Биологическая индикация широко применяется в сертификационных схемах, поскольку считается чувствительным и надежным методом выявления новых или необычных штаммов вируса. Однако метод имеет определенные недостатки: он не относится к числу экспресс-тестов (развитие симптомов происходит в течение 3–6 месяцев после инокуляции); его можно использовать только для тестирования привоя; он требует наличия специальных помещений, таких как изолированная от доступа насекомых теплица с контролем микроклимата; необходимо наличие персонала для выращивания здоровых и сильных растений-хозяев, на которых появятся соответствующие симптомы, а также опытных сотрудников для точной оценки этой симптоматики, которую легко спутать с проявлениями других болезней, передаваемых через прививку. Кроме того, использование индикаторных растений не позволяет выявлять бессимптомные (латентные) штаммы ВТЦ (например, К-штамм ВТЦ, описанный Albertini *et al.* (1988)).

Имеется лишь небольшой объем опубликованных количественных данных о специфичности, чувствительности и других диагностических параметрах, а также о надежности биологических тестов для выявления, диагностики или идентификации ВТЦ, основанных на прививке индикаторных растений (индикации). Cambra *et al.* (2002) в рамках проекта "Европейские диагностические протоколы" (DIAGPRO), а также Vidal *et al.* (2012) сравнили индикацию на мексиканском лайме с прямым иммуноферментным анализом (ИФА) тканевого отпечатка

(раздел 3.5.1) (с использованием моноклональных антител 3DF1 + 3CA5) и с ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) в реальном времени на тканевом отпечатке (раздел 3.6.5); они заключили, что каждый из этих двух лабораторных методов можно применять вместо традиционной биологической индикации с мексиканским лаймом для надежного выявления ВТЦ.

3.4 Взятие и приготовление образцов для серологического и молекулярного тестирования

3.4.1 Взятие образцов

Общие рекомендации по методикам взятия образцов содержатся в МСФМ 31 (*Методики отбора образцов от грузов*), а применительно к тестированию на ВТЦ – в работе Cambra *et al.* (2002). Надлежащее взятие образцов имеет важнейшее значение для выявления и идентификации ВТЦ с помощью биологических, серологических или молекулярных методов. При отклонении от принятой схемы взятия образцов эффективный диагностический протокол может генерировать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Применительно ко взрослым деревьям стандартный образец – 5 молодых побегов или плодоножек, 10 полностью распустившихся листьев или 5 цветков либо плодов, собранных с каждой скелетной ветви каждого дерева. Для получения высоких титров ВТЦ образцы (побеги или полностью распустившиеся листья и плодоножки) с растений апельсина, мандарина, лимона и грейпфрута, произрастающих в зоне умеренного средиземноморского климата, можно брать в любое время года, а в тропических и субтропических зонах – лучше всего весной и осенью. В этих климатических зонах летом отмечается сниженный титр ВТЦ на растениях мандарина уншиу; соответственно, рекомендуемый период взятия образцов включает все сезоны вегетации, за исключением наиболее жарких (35–40 °С) летних дней. Однако при необходимости и во время периодов жары можно брать образцы с корней растений. Для взятия образцов подходят также цветки и плоды (если имеются) (Cambra *et al.*, 2002). Наиболее подходящий образец – ткань плодоножки в области альбеда (в месте соединения ножки с плодом) либо в остаточной оси плода. Стандартные требования к взятию образцов включают отбор двух молодых побегов или четырех листьев с каждого растения. Для индикации по Ройстакеру (Roistacher, 1991) обычно собирают в любое время года (но желательно в период вегетации) небольшие участки коры без глазков или даже листья инфицированных 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 °С вплоть до 7 дней, плоды – в течение месяца. Использование за пределами этого времени может приводить к снижению титров и риску ложноотрицательных результатов тестирования.

Комбинированные образцы, используемые в качестве единой пробы для проведения серологических или молекулярных тестов, можно собирать совместно (например, два листа или один побег от 1–10 тепличных растений либо 10 листьев или 5 побегов с различных участков кроны каждого взрослого дерева). В некоторых ситуациях (например, для рутинного скрининга на ВТЦ при его значительной распространенности в стране или регионе) можно одновременно тестировать многочисленные растения с использованием комбинированного образца, взятого с ряда растений. Выбор метода исследования – индивидуального растения или комбинированных образцов, с применением серологических или молекулярных тестов – зависит от концентрации вируса в растениях, прогнозируемой распространенности ВТЦ на изучаемой территории (Vidal *et al.*, 2012), порога выявления, свойственного тому или иному тесту, а также уровня надежности, которого требует НОКЗР.

Тлей (нативных или фиксированных в 70%-ном растворе спирта) также можно исследовать на наличие ВТЦ. Насекомых собирают непосредственно из сформировавшихся колоний или из ловушек: рекомендуется использовать всасывающие ловушки, классические желтые чашки Мерики или клеевые ловушки. Собранные образцы предпочтительно исследовать методом ОТ-ПЦР в реальном времени с давленным препаратом (Bertolini *et al.*, 2008) либо с применением других молекулярных тестов (Magroquín *et al.*, 2004).

3.4.2 Приготовление тканевых отпечатков

3.4.2.1 Приготовление тканевых отпечатков для серологического исследования

Аккуратно иссекают молодые побеги, черешки листьев, плодоножки или завязи. Свежевырезанные участки осторожно прижимают к нитроцеллюлозной или эфироцеллюлозной мембране (0,45 мм) и дают полученному отпечатку высохнуть в течение 2–5 мин. Для рутинного серологического тестирования 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 Приготовление тканевых отпечатков и давленных препаратов тлей для молекулярного исследования

Сбор растительного материала рекомендуется производить руками во избежание контаминации образцов при использовании ножниц. 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) помещают несколько частично наслаивающихся друг на друга отпечатков различных листьев на площади примерно 0,5 см² бумаги или мембраны. Отпечаток или след высушивают на воздухе в течение 2–5 мин. Для рутинного тестирования методом молекулярной амплификации делают по одному отпечатку с каждого отобранного черешка листа. Индивидуальные особи тлей раздавливают непосредственно на листе ватмана¹ 3ММ или на положительно заряженной нейлоновой мембране с помощью закругленного доньшка пробирки Эппендорфа¹ так, чтобы образец представлял собой полностью разрушенные ткани (Bertolini *et al.*, 2008). Мембраны с отпечатками или раздавленным биоматериалом можно хранить в сухом и темном месте в течение нескольких месяцев.

В качестве альтернативы для традиционного метода приготовления образца путем экстрагирования были валидированы процедуры прямого приготовления образца (тканевых отпечатков или давленных препаратов) без экстрагирования (Vidal *et al.*, 2012).

3.4.3 Приготовление растительных экстрактов для серологического и молекулярного исследования

Свежий растительный материал, 0,2–0,5 г, режут на мелкие фрагменты с помощью одноразовых бритвенных лезвий или ножниц, обработанных дезинфицирующим раствором во избежание перекрестной контаминации образцов, и помещают в подходящую пробирку или пластиковый пакет. Экстракты для серологического тестирования можно приготавливать в пробирках или пластиковых пакетах. Образцы для молекулярного тестирования следует приготавливать только в индивидуальных пластиковых пакетах во избежание перекрестной контаминации. 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, 0,2 г; дистиллированная вода, 1 л), с добавлением 0,2% натрия диэтилдитиокарбамата (DIECA) или 0,2% меркаптоэтанола, либо другой надлежащим образом валидированный буфер.

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.

3.5 Серологические тесты

Для скрининга большого числа образцов в целях выявления и идентификации ВТЦ настоятельно рекомендуется использовать ИФА с применением валидированных моноклональных или поликлональных антител. Производство моноклональных антител, специфичных к ВТЦ (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990), и других, обзор которых приведен в работе Николаевой с соавт. (Nikolaeva *et al.*, 1996), решило проблему недостаточной диагностической специфичности, характерную для поликлональных антител (Cambra *et al.*, 2011), и таким образом повысило диагностическую чувствительность серологических тестов. Смесь двух моноклональных антител – 3DF1 и 3CA5 – или их рекомбинантных версий (Terrada *et al.*, 2000) позволяет выявить все изоляты ВТЦ, взятые из различных международных коллекций (Cambra *et al.*, 1990). Детальное описание, характеристика и валидация этих моноклональных антител приведены в работе Cambra *et al.* (2000a). Имеется сообщение (Zebzami *et al.*, 1999) о том, что смесь моноклональных антител 4C1 и 1D12, полученных в Марокко, реагирует на широкий спектр штаммов ВТЦ, однако данных о валидации этого метода не имеется.

3.5.1 Прямой ИФА тканевых отпечатков

Прямой ИФА тканевых отпечатков (другие названия: ИФА-иммуоимпринтинг, DTBIA) выполняют по следующей методике, описанной Garnsey *et al.* (1993) и Cambra *et al.* (2000b). Компания Plant Print Diagnostics SL¹ предоставляет полный набор для теста (валидированный в исследовании эффективности тестов и в ряде опубликованных работ) на основе моноклональных антител 3DF1 + 3CA5, специфичных к ВТЦ (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 фирмы Agdia¹.

Мембраны с тканевыми отпечатками (рекомендуемый размер – примерно 7 × 13 см) помещают в подходящую емкость (кювету, герметичный контейнер или пластиковый пакет), заливают 1%-ным 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 °С (последний вариант предпочтителен). На этом этапе рекомендуется применять осторожное перемешивание смеси. 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, полученных путем экспрессии в кишечной палочке (в надлежащем разведении в PBS) (Terrada *et al.*, 2000). Конъюгирующий раствор наливают на мембраны, так чтобы он полностью покрыл их, и затем мембраны выдерживают 3 ч при комнатной температуре и легком взбалтывании. 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), растворенные в соответствии с инструкцией изготовителя до 0,33 мг/мл NBT и 0,175 мг/мл BCIP) и инкубируют до появления пурпурно-фиолетового окрашивания положительных контролей (около 10–15 мин). Реакцию останавливают путем промывания мембран водопроводной водой. Мембраны расправляют на фильтровальной бумаге и оставляют до высыхания. Затем отпечатки микроскопируют при малом увеличении (×10 – ×20). Обнаружение пурпурно-фиолетовых преципитатов в васкулярных участках растительного материала указывает на наличие ВТЦ.

3.5.2 "Сэндвич"-ИФА

ИФА по методу двойных антител ("сэндвич"-ИФА) выполняют по следующей методике, описанной Garnsey и Cambra (1991). Имеются полные наборы для теста на основе валидированных

моноклональных антител 3DF1 + 3CA5, специфичных к ВТЦ (Plant Print Diagnostics SL¹), и на основе различных поликлональных антител (Agdia¹, Agritest¹, Bioreba¹, Loewe¹, Sediag¹).

Две лунки микротитровального 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, рН 9,6 (Na₂CO₃, 1,59 г; NaHCO₃, 2,93 г; дистиллированная вода, 1 л) и добавляют по 200 мкл в каждую лунку. Планшет инкубируют в течение 4 ч при 37 °С или до следующего дня (около 16 ч) при 4 °С. Лунки троекратно промывают соответствующим буфером (PBS, рН 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 инкубирования в течение 16 ч при 4 °С планшеты троекратно промывают, как описано в методике прямого ИФА тканевых отпечатков (раздел 3.5.1). Приготавливают смеси специфических поликлональных или моноклональных (3DF1 + 3CA5) антител, связанных с алкалинфосфатазой, в надлежащих разведениях (примерно 0,1 мкг/мл в PBS с 0,5% БСА) и добавляют по 200 мкл в каждую лунку. После инкубирования в течение 3 ч при 37 °С планшеты вновь промывают, как описано в методике прямого ИФА тканевых отпечатков (раздел 3.5.1). Приготавливают 1 мг/мл раствор алкалинфосфатазы (р-нитрофенилфосфат) в субстратном буфере (97 мл диэтаноламина в 800 мл дистиллированной воды, рН 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 инкубируют 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 из каждой из двух лунок, содержащих исследуемый субстрат, <0,1 или <2× среднее поглощение лунок с отрицательным контролем, содержащим экстракт из здоровых растений. Результат ИФА считается положительным, если средняя величина оптического поглощения из каждой из двух лунок, содержащих исследуемый субстрат, ≥2× среднее поглощение лунок с отрицательным контролем, содержащим экстракт из 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 сравнительного межлабораторного испытания DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение этого метода с другими процедурами и его диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

В то время как использование определенных комбинаций моноклональных антител позволяет специфично выявлять все штаммы ВТЦ с высокой чувствительностью и надежностью, некоторые поликлональные антитела неспецифичны и обладают ограниченной чувствительностью (Cambra *et al.*, 2011). Поэтому в ситуациях, когда для исследования применялись поликлональные антитела, но НОКЗР требует обеспечить особо высокую надежность в идентификации ВТЦ, рекомендуется применять дополнительные методы.

3.6 Молекулярные тесты

После того как стала известна полная нуклеотидная последовательность геномной РНК ВТЦ, 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 инфицированной ткани цитрусового растения или в особях тлей – носителей ВТЦ (Bertolini *et al.*, 2008). Использование методик с высокой пропускной способностью, таких как ОТ-ПЦР в реальном времени, не требует какой-либо постаmplификационной обработки (например, гель-электрофореза) и поэтому занимает меньше

времени и в меньшей степени связано с риском перекрестной контаминации, по сравнению со стандартной 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 индивидуальные пластиковые пакеты во избежание перекрестной контаминации во время выделения. В качестве альтернативного варианта можно фиксировать пятна тканевых экстрактов, отпечатки или раздавленные ткани растения на бумаге или нейлоновой мембране и проводить ОТ-ПЦР в реальном времени (Bertolini et al., 2008). Не рекомендуется использовать образцы в виде пятен или отпечатков для проведения стандартной ПЦР, поскольку ее более низкая чувствительность по сравнению с ОТ-ПЦР в реальном времени может быть причиной 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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (предпочтительно) или при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Хранить следует в небольших порциях во избежание деградации РНК при повторном оттаивании и замораживании.

3.6.1.2 Иммунозахват

Иммунозахват применяют в качестве альтернативы к очищению РНК. Для этого приготавливают разведенную смесь антител, содержащую 1 мкг/мл поликлональных антител, специфичных к ВТЦ, 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 инкубируют в течение 3 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Нагруженные антителами пробирки 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, нагруженным антителами. Пробирки инкубируют не менее 2 ч на льду или, альтернативно, в течение 2 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого микропробирки троекратно промывают с использованием 150 мкл стерильного промывного буфера. В промытых пробирках проводят синтез кДНК и амплификацию путем ПЦР.

3.6.1.3 Синтез кДНК

Поскольку поддержание исходной структуры РНК во время хранения проблематично, 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

По методике Olmos *et al.* (1999) применяют 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; $10\times$ Taq-ДНК-полимеразный буфер, 2,5 мкл; 25 мМ MgCl_2 , 1,5 мкл; 5 мМ дНТП, 1,25 мкл; 4% Triton X-100, 2 мкл; 25 мМ праймер PIN1, 1 мкл; 25 мМ 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, нагруженные 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 элонгации 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 сравнительного межлабораторного испытания DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение с другими процедурами и диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

3.6.3 Вложенная ОТ-ПЦР с иммунозахватом в единственной закрытой пробирке

По методике Olmos *et al.* (1999) применяют следующие праймеры:

PEX1: 5'-TAA ACA ACA CAC ACT STA 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 компартиментализации микропробирки 0,5 мл для проведения вложенной ОТ-ПЦР в единственной закрытой пробирке – по методике Olmos *et al.* (1999). Основная смесь 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 мМ MgCl₂, 3,6 мкл; 5 мМ 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 порции В с продуктами первой амплификации. Пробирку затем вновь помещают в амплификатор и проводят реакцию по следующим параметрам: 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 элонгации 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 сравнительного межлабораторного испытания DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). Сравнение с другими процедурами и диагностические параметры приведены в разделе 3.7.

3.6.4 Общие соображения относительно стандартной и вложенной ОТ-ПЦР

В зависимости от применяемых реагентов или моделей амплификатора протоколы ОТ-ПЦР могут нуждаться в модификации и оптимизации.

Если для выявления ВТЦ применяется стандартная ОТ-ПЦР, рекомендуется использовать ее вариант с иммунозахватом. Стандартная 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 ВТЦ ампликон ожидаемого размера не обнаруживается в тестируемом образце, но выявляется во всех положительных контролях. Результат исследования образца считается положительным, если

специфичный для ВТЦ ампликон ожидаемого размера обнаруживается в тестируемом образце при отсутствии амплификации во всех отрицательных контролях.

3.6.5 ОТ-ПЦР в реальном времени

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

По методике Bertolini *et al.* (2008) применяют 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× AgPath-ID One-Step RT-PCR Master Mix (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 тканевых отпечатков методом ОТ-ПЦР в реальном времени была определена диагностическая чувствительность 0,98, специфичность 0,85, коэффициенты положительной и отрицательной вероятности – соответственно 6,63 и 0,021 (Vidal *et al.*, 2012). Эти диагностические параметры свидетельствуют о том, что исследование тканевых отпечатков методом ОТ-ПЦР в реальном времени является наиболее чувствительным тестом по сравнению с прямым ИФА тканевых отпечатков, валидируя его использование для рутинного выявления и идентификации ВТЦ и убедительно подтверждая предпочтительность данного исследования для проверки любого растительного материала на предмет отсутствия ВТЦ. Высокая чувствительность этого метода позволяет точно анализировать комбинированные образцы (партиями вплоть до 10 деревьев или тепличных саженцев) в качестве одной диагностической пробы при тестировании в течение любого времени года, а также позволяет исследовать различные виды тлей для выявления низких концентраций ВТЦ. Дополнительные диагностические параметры валидации ОТ-ПЦР в реальном времени для исследования тканевых отпечатков приведены в разделе 3.7.

По методике Saponari *et al.* (2008) применяют 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× iScript One-Step RT-PCR Kit for Probes (Bio-Rad1), 12,5 мкл; супермикс для 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, коэффициенты положительной и отрицательной вероятности и послетестовая вероятность заболевания) для данного протокола ОТ-ПЦР в реальном времени не сообщаются.

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

3.6.1 Контроли для молекулярных тестов

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

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

Внутренний контроль. Для ОТ-ПЦР в реальном времени по методике Saponari *et al.* (2008) в качестве внутреннего контроля, чтобы исключить возможность ложноотрицательных результатов в связи с неудачей при экстракции нуклеиновой кислоты или из-за деградации или наличия ингибиторов ОТ-ПЦР, в протокол ОТ-ПЦР можно включить мРНК митохондриального гена NADH-дегидрогеназы 5 (*nad5*). Поскольку речь идет о мишени хозяина, необходимо следить за тем, чтобы лаборатория не была контаминирована ДНК *nad5*, что привело бы к ложной уверенности в реакции внутреннего контроля.

Отрицательный контроль амплификации (без матрицы). Данный контроль необходим для стандартной 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 адекватного количества и качества выделенной нуклеиновой кислоты мишени для ОТ-ПЦР и что вирус-мишень поддается обнаружению. Нуклеиновую кислоту выделяют из ткани инфицированного растения-хозяина, из ткани здорового растения или из тканей насекомого, в которые внесли ВТЦ.

При контроле ОТ-ПЦР следует принять меры для предотвращения аэрозольного перекрестного загрязнения от положительного контроля или положительных образцов.

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

3.6.7.1 Стандартная 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 продуцируют 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

ТСА ССА АСА ТТГ GCA TAA-3'; продукт – 181 п.о.), то отрицательный контроль выделения (ткань здорового растения) (если используется), положительный контроль и каждый из исследуемых образцов должны продуцировать ампликон длиной 115 п.о. Если образцы не приводят к амплификации с праймерами внутреннего контроля, это может свидетельствовать, например, о том, что выделение РНК не удалось, что нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, что в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, подавляющие ОТ-ПЦР, либо что РНК деградировала.

Тест образца считается положительным, если он производит 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 продуцируют кривую амплификации со специфичными для вируса праймерами.

Тест образца будет считаться положительным, если он производит типичную амплификационную кривую в виде экспоненты. Значение порогового цикла (Ct) следует верифицировать в каждой лаборатории при проведении теста в первый раз.

3.7 Валидация путем исследования эффективности теста

В рамках сравнительного межлабораторного (кругового) испытания DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002), проведенного десятью лабораториями с использованием десяти кодированных образцов, включая инфицированные ВТЦ и взятые от здоровых растений из коллекции Валенсийского института сельскохозяйственных исследований (IVIA), точность прямого ИФА тканевых отпечатков с моноклональными антителами 3DF1 + 3CA5 составила 99% (суммарная доля истинно положительных и истинно отрицательных результатов теста среди общего числа исследованных образцов). Данный показатель точности был выше, чем при использовании "сэндвич"-ИФА (точность 98%), ОТ-ПЦР с иммунозахватом (94%) и вложенной ОТ-ПЦР с иммунозахватом в единственной закрытой пробирке (89%). Чувствительность прямого ИФА тканевых отпечатков составила 0,98, а чувствительность остальных трех вышеперечисленных методов – соответственно 0,96, 0,96 и 0,93 (Vidal *et al.*, 2012). Диагностическая специфичность прямого ИФА тканевых отпечатков составила 1,0, а чувствительность остальных трех методов – соответственно 1,0, 0,91 и 0,82. Положительная прогностическая ценность (доля положительных тестов, при которых действительно имеется инфекция; Sackett *et al.*, 1991) прямого ИФА тканевых отпечатков составила 1,0, для остальных методов этот показатель был равен соответственно 1,0, 0,94 и 0,89. Отрицательная прогностическая ценность (Sackett *et al.*, 1991) прямого ИФА тканевых отпечатков составила 0,97, для остальных методов этот показатель был равен соответственно 0,95, 0,94 и 0,88 (Narju *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 ВТЦ, в сравнении с биологической индикацией на мексиканском лайме, ИФА, ОТ-ПЦР с иммунозахватом и вложенной 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 "сэндвич"-ИФА (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 биологическая индикация на мексиканском лайме и ОТ-ПЦР тканевых отпечатков в реальном времени для выявления ВТЦ (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 ВТЦ является метод прямого ИФА тканевых отпечатков.

4. Идентификация агрессивных штаммов ВТЦ

Идентификация штаммов ВТЦ требует проведения биологического, серологического или молекулярного тестирования.

Однако надежно типировать штаммы ВТЦ в зависимости от агрессивности методами на основе нуклеиновых кислот не удастся, поскольку ВТЦ – это фенотип. Генетическая природа высокой биологической вариабельности ВТЦ все еще недостаточно изучена (Mogeno *et al.*, 2008). Также немного известно о биологической роли данного разнообразия и в особенности об эффектах рекомбинации. Кроме того, не было стандартизировано группирование генотипа (Harper, 2013). Для дифференцирования различных штаммов ВТЦ использовали широкий спектр молекулярных методов, в том числе такие, как молекулярная гибридизация, характеристика двухцепочечной РНК, анализ рестриционных фрагментов амплифицированной кДНК ВТЦ, амплификация различных участков генома с помощью ПЦР, ПЦР в реальном времени (Mogeno *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 иммуоферментного анализа и одонитевого конформационного полиморфизма с помощью капиллярного электрофореза (Licciardello *et al.*, 2012). Однако ни один из этих методов не приобрел практического значения для надежной категоризации распространяющихся в естественных условиях штаммов ВТЦ, и ни один из них не был валидирован; таким образом, применение данных методов ограничено научно-исследовательскими задачами.

Ввиду генетической и биологической вариабельности ВТЦ применение для идентификации штаммов данного вируса иных методик, помимо секвенирования, может давать ошибочные результаты. Методика глубокого секвенирования (другое название – секвенирование нового поколения) может быстро дать информацию о геномной последовательности. Однако нуклеотидную последовательность ВТЦ 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 ВТЦ были классифицированы и сгруппированы по параметрам фенотипа, вирулентности, круга хозяев, состава эпитопа и, в более недавний период, по идентичности одного и более генов в геномной последовательности (Mogeno *et al.*, 2008), четких корреляций с биологическим поведением не было найдено (Harper, 2013).

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

- (1) Биологическая индикация с использованием различных индикаторных растений, таких как *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. sinensis* или *C. paradisi* (сорт Дункан) для оценки ямчатости древесины; семена *C. aurantium* или *C. limon* для оценки желтухи семянцев (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 ВТЦ, но отсутствующий в "легких" (менее агрессивных) штаммах (Parru, *et al.*, 1993). Реакция с МСА13 прочно коррелирует со способностью вируса вызывать угнетение жизнедеятельности деревьев, привитых на корневых побегах померанца или лимона. Большинство штаммов ВТЦ, вызывающих ямчатость древесины грейпфрута и апельсина, являются МСА13-положительными.

4.1 Биологическая индикация

Биологическая индикация агрессивных штаммов ВТЦ проводится по методике, описанной в разделе 3.3.

4.2 Серологические тесты с использованием МСА13

4.2.1 Прямой ИФА тканевых отпечатков

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

На мембраны наносят и фиксируют тканевые отпечатки, как описано в разделе 3.5.1. Приготавливают раствор специфичных к ВТЦ 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 и легком взбалтывании. Промывку и проявление мембран, а также считывание и интерпретацию результатов проводят по методике, описанной в разделе 3.5.1. Обнаружение, как правило, мелких пурпурно-фиолетовых преципитатов в васкулярных участках растительного материала указывает на наличие штамма ВТЦ, обладающего повышенной агрессивностью.

4.2.2 "Сэндвич"-ИФА (DAS-ИФА)

"Сэндвич"-ИФА выполняют по следующей методике, описанной Garnsey и Cambra (1991). Набор для теста на основе моноклональных антител МСА13, специфичных к ВТЦ, предоставляет компания Plant Print Diagnostics SL¹.

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

5. Данные

Данные и доказательства 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 обнаружен на данной территории впервые, подлежат хранению с соблюдением отслеживаемости нижеперечисленные дополнительные материалы:

- исходный образец (хранить замороженным при –80 °С либо лиофилизировать и хранить при комнатной температуре);
- экстракты РНК (хранить при –80 °С) и/или тканевые отпечатки и/или пятна растительных экстрактов на бумаге или нейлоновых мембранах (хранить при комнатной температуре);
- продукты ОТ-ПЦР-амплификации (хранить при температуре –20 °С).

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 Agropesquera (INIA) (Уругвай (см. предыдущий раздел: адрес в настоящее время Alico, Inc.)).

Преобладающая часть описанных методик была апробирована в рамках сравнительного межлабораторного испытания 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. Справочные материалы

Настоящее приложение относится к 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) Nº 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.
- Iharco, 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

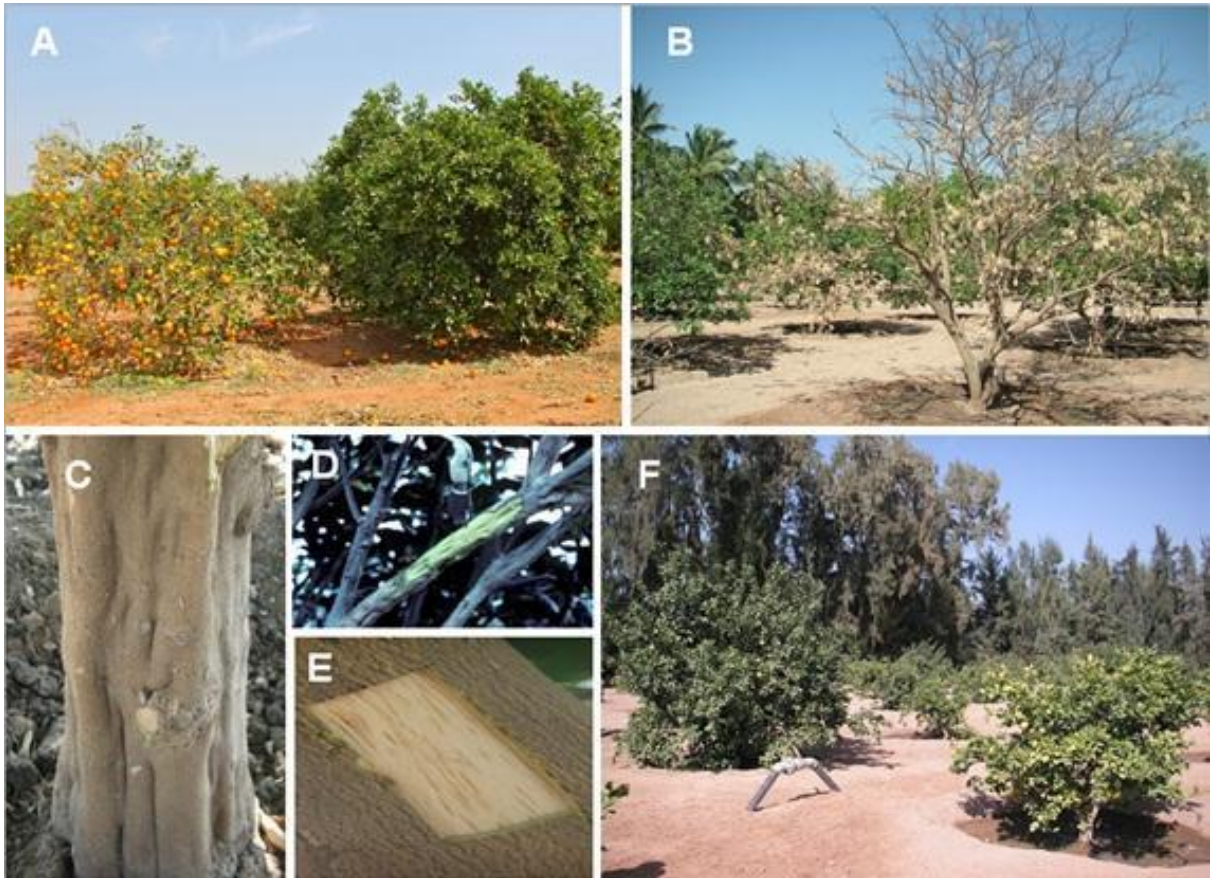


Рисунок 1. Симптомы инфекции, вызванной *вирусом tristeza цитрусовых* (ВТЦ): А – синдром тристецы: угнетение жизнедеятельности апельсинового дерева, привитого на померанце, инфицированном ВТЦ (слева), и здоровое дерево (справа); В – стремительное увядание грейпфрута, привитого на померанце; С – вызванная агрессивным штаммом ВТЦ ямчатость древесины на стволе грейпфрута, привитого на цитранже Тройер; D – резко выраженная ямчатость (бороздчатость) древесины на ветвях грейпфрута; E – ямчатость древесины на стволе апельсина, привитого на мандарине Клеопатра; F – выраженная низкорослость цитранжа Карризо (справа), в сравнении со здоровым деревом (слева).

Фотографии любезно предоставили: (A) P. Moreno; (B, C, E) M. Cambra; (D) L. Navarro; (F) M. Cambra и J.A. Ripa. Все авторы – из Валенсийского института сельскохозяйственных исследований (IVIA), Монкада, Испания.

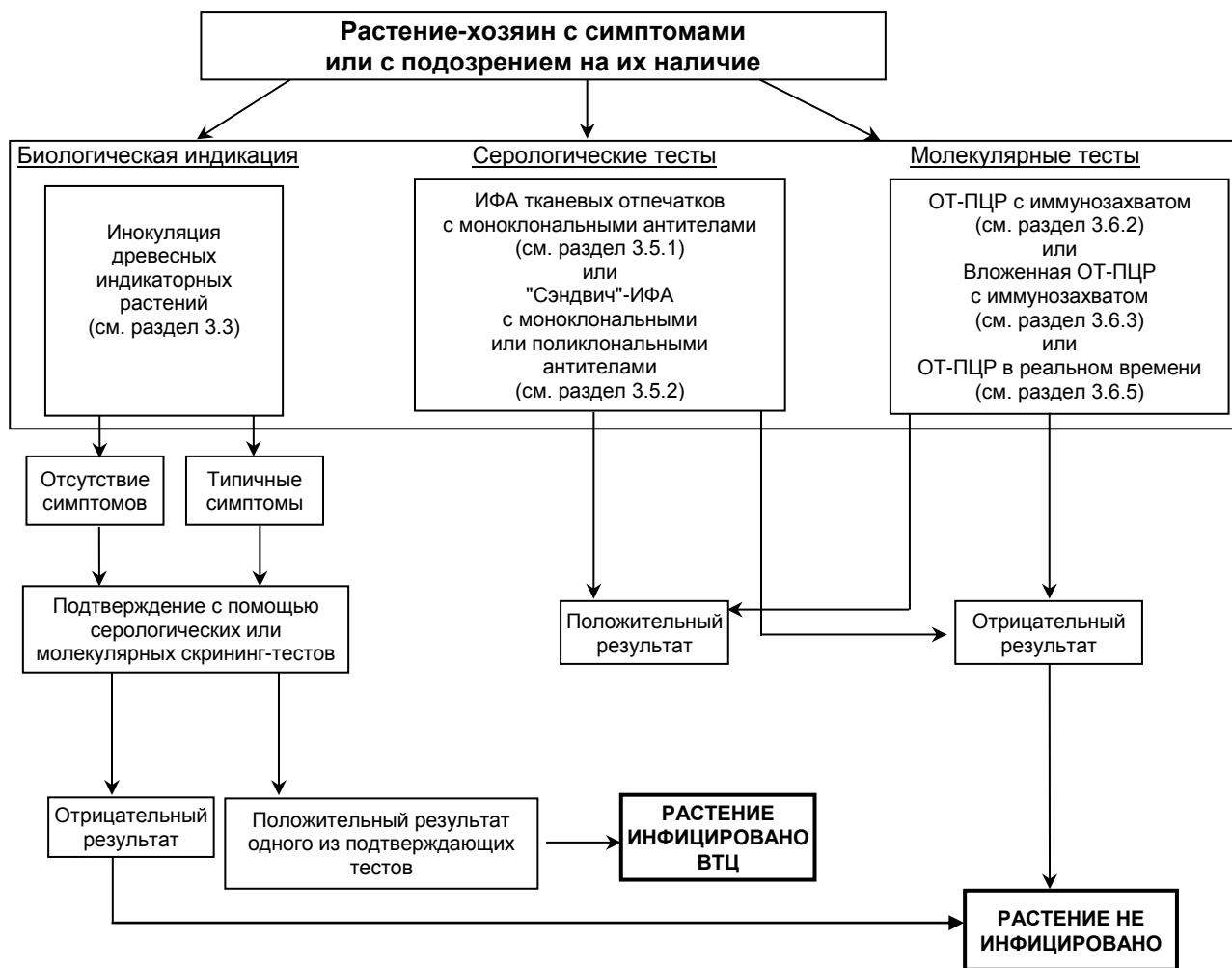


Рисунок 2. Блок-схема процесса выявления и идентификации *вируса tristeza цитрусовых* (ВТЦ). ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскриптаза.

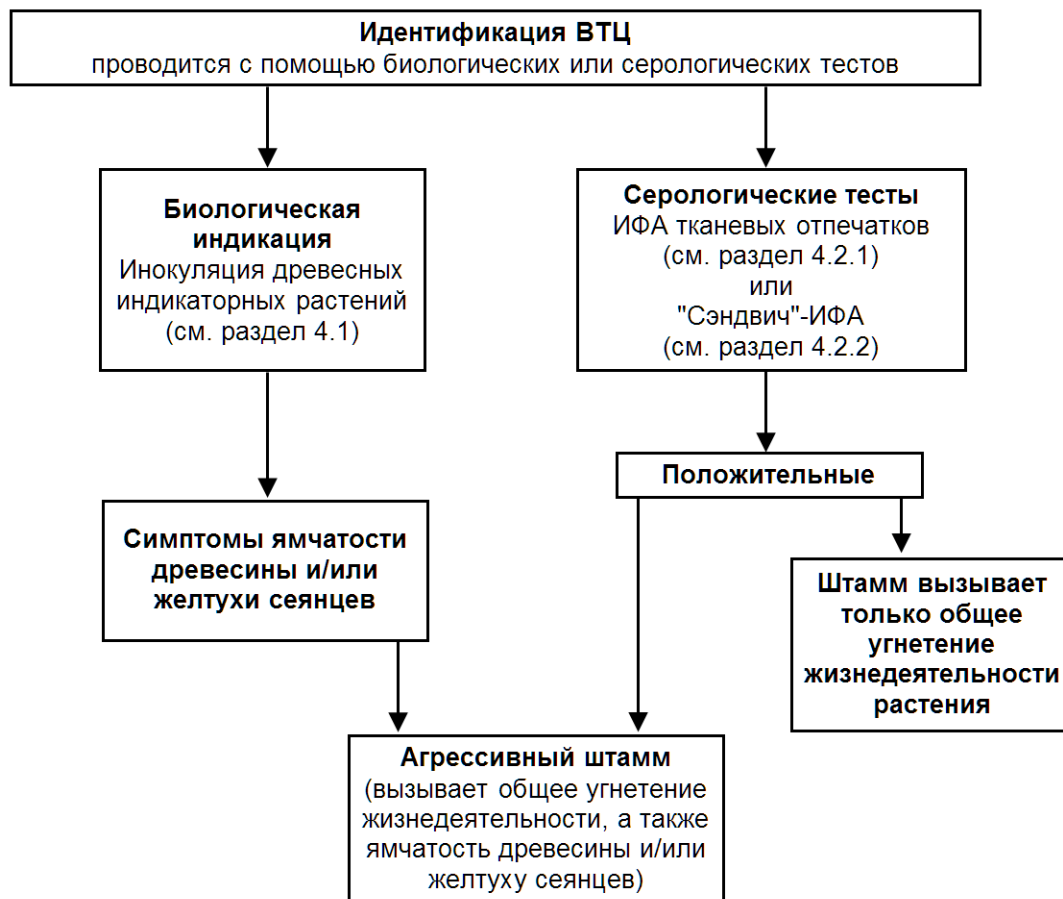


Рисунок 3. Блок-схема процесса идентификации агрессивных штаммов вируса тристецы цитрусовых (ВТЦ). ИФА – иммуноферментный анализ.

История публикации

Не является официальной частью стандарта

2004-11 КС внес новую тему: *Вирус тристецы 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 тристецы цитрусовых (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

История публикации последний раз обновлена: 2017-01.