



РУКОВОДСТВО

по оказанию фитосанитарных диагностических услуг





15
2006
РУ

РУКОВОДСТВО по оказанию фитосанитарных диагностических услуг



Ministry for Primary Industries
Manatū Ahu Matua



Издательские примечания:

Версия 1.1 на английском языке опубликована в марте 2016 г.

Вы это прочитали?

Мы будем благодарны, если вы представите свои комментарии, заполнив простую анкету, состоящую из двух вопросов: <https://www.surveymonkey.com/r/diagnosticsguide>. Это не займет у вас много времени. Ваши ответы помогут Секретариату и Комитету по развитию потенциала МККЗР усовершенствовать этот и другие обучающие ресурсы.

В этом документе представлено руководство по созданию фитосанитарной диагностической лаборатории. Это руководство было разработано как один из компонентов Стратегии МККЗР по развитию национального фитосанитарного потенциала, которая была принята на пятой Сессии Комиссии по фитосанитарным мерам МККЗР (2010 г.). Это руководство разработано экспертами и пересмотрено Комитетом МККЗР по развитию потенциала (при участии экспертов по фитосанитарным вопросам из семи регионов ФАО), представителями Региональных организаций по карантину и защите растений в ходе их технических консультаций и Секретариатом МККЗР. Разработка данного руководства стала возможной благодаря финансовой помощи, предоставленной Фондом «Средства развития стандартов и торговли» (Проект СРСТ-350).

Перевод на русский язык и издание осуществлено Субрегиональным отделением ФАО по Центральной Азии.

Применяемые обозначения и материал в этом информационном продукте не являются выражением мнения Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО) относительно правового статуса или уровня развития какой-либо страны, территории, города или зоны, их властей, или относительно делимитации их границ и рубежей. Упоминание конкретных компаний или продукции производителей независимо от того, запатентована она или нет, не означает, что ФАО поддерживает или рекомендует их, отдавая им предпочтение по сравнению с другими аналогичными компаниями или продукцией, не упомянутыми в данном документе.

Мнения, выраженные в данном информационном продукте, являются мнением автора (авторов) и необязательно отражают мнения или принципы ФАО.

© ФАО, 2016 г.

ФАО приветствует использование, воспроизведение и распространение материала, содержащегося в этом информационном продукте. Если не указано иное, этот материал разрешается копировать, скачивать и распечатывать в целях самообразования, проведения исследований или обучения. Также этот материал может быть использован в некоммерческих продуктах и услугах при условии, что ФАО будет указана как источник и обладатель авторского права, и что при этом никоим образом не предполагается, что ФАО одобряет мнения, продукцию или услуги пользователей.

Все запросы на получение права на перевод и адаптацию, перепродажу и другие коммерческие цели должны вноситься через: <http://www.fao.org/contact-us/licencerequest> или направляться по адресу: copyright@fao.org.

Этот документ не является официальной юридической интерпретацией Международной конвенции по карантину и защите растений или связанных с ней документов и был разработан только в информационных целях. Для перевода этого материала, пожалуйста, обратитесь по адресу: iprc@fao.org, чтобы получить информацию по договору о совместной публикации.



**Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций**

Содержание

Сокращения и аббревиатуры	vii
Выражение признательности	ix
Введение	xi
Зачем нужно руководство по диагностическим лабораториям?	xi
Как пользоваться этим руководством	xiii
Структура руководства	xiv
Раздел 1. Диагностическая лаборатория	1
1. Оперативная основа деятельности диагностической лаборатории	3
Введение	3
1.1 Факторы стабильности и надежности	3
1.2 Стратегические планы	4
1.3 Механизмы финансирования	5
1.4 Правовая поддержка	7
1.5 Кадровые ресурсы	7
1.6 Обучение сотрудников лаборатории	8
2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории	11
Введение	11
2.1 Функции диагностической лаборатории	11
2.2 Расположение лаборатории	13
2.3 Лабораторные помещения	13
2.4 Планы на случай возникновения чрезвычайных ситуаций – карантинная лаборатория	17
2.5 Гигиена	18
2.6 Референтные коллекции	19
2.7 Лабораторные службы	19
2.8 Контроль параметров окружающей среды (движение воздуха, температура и влажность)	20
2.9 Стандартные методы работы	20
2.10 Лабораторное оборудование	20
2.11 Техника безопасности	23
2.12 Утилизация карантинных отходов	24
3. Нематериальная инфраструктура	27
Введение	27
3.1 Система качества	27
3.2 Обязанности руководства	32
3.3 Управление ресурсами	35
3.4 Оценка, анализ и совершенствование	37
3.5 Технические требования	41
3.6 Типовые формы	48
3.7 Система управления информацией в лаборатории	56
3.8 Ссылки	58

Раздел 2. Организация рабочего процесса в лаборатории	61
4. Работа с образцами	63
Краткий обзор	63
Введение	64
4.1 Приемка образцов	64
4.2 Регистрация образцов	64
4.3 Исследование образцов	67
5. Диагностика	71
Введение	71
5.1 Методы диагностики	71
5.2 Верификация новых методов	78
5.3 Обучение персонала лаборатории	78
5.4 Методики проведения диагностики	79
5.5 Дополнительная информация	103
5.6 Библиография	107
6. Создание изображений образцов	113
Введение	113
6.1 Зачем создавать изображения для диагностики?	113
6.2 Что такое научное изображение?	113
6.3 Рабочий процесс	114
7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов	115
Введение	115
7.1 Что такое дистанционная диагностика, и зачем она нам нужна?	115
7.2 Методы обмена информацией при проведении дистанционной микроскопии в режиме реального времени	120
7.3 Процессы дистанционной диагностики для образования и обучения	122
7.4 Выводы	126
8. Референтные коллекции	127
Введение	127
8.1 Общие требования	127
8.2 Энтомологическая референтная коллекция	130
8.3 Референтная коллекция нематод	152
8.4 Референтная коллекция фитопатогенов и гербарий	153
8.5 Другие референтные коллекции	161
9. Отчетность	165
Введение	165
10. Дальнейшие действия с образцом	167
Введение	167
10.1 Утилизация	167
10.2 Сохранение образца или препарата	167
Раздел 3. Другие источники информации	169
11. Библиография	171
Введение	171
Список библиографических названий	171

Рисунки и иллюстрации

1.	Ряд фитосанитарных программ, для которых диагностическая информация и экспертные знания могут быть полезны	xii
2.	Функционирование диагностической лаборатории разделено на две основные сферы, исходные ресурсы и результаты, которые отражены в структуре настоящего руководства	xv
3.	Ориентировочный план лаборатории, на котором показано разделение рабочих зон для разных направлений диагностики	14
4.	Разделение молекулярного и вирусологического блоков в лаборатории	15
5.	Ключевые элементы системы качества	28
6.	Руководство по основным процессам в диагностической лаборатории	29
7.	Руководство по определению вспомогательных процессов, необходимых в диагностической лаборатории	30
8.	Схема процесса пересмотра системы управления	35
9.	Компоненты папки с информацией об обучении сотрудника	37
10.	Форма опросника об удовлетворенности клиентов	39
11.	Типовая форма для регистрации несоответствия	42
12.	Типовая форма регистрации совершенствования качества (ФСК)	43
13.	Общие процессы валидации методов в биологических испытательных лабораториях	46
14.	Общая схема функционирования службы по идентификации вредных организмов	63
15A.	Страница 1 стандартного, двухстраничного бланка заявки на приемку образца, который используется Fera	65
15B.	Страница 2 стандартного, двухстраничного бланка заявки на приемку образца, который используется Fera	66
16.	Модифицированная воронка Бермана для выделения нематод из растительного материала или почвы	96
17.	Модифицированный метод с использованием ванночки для выделения нематод	97
18.	Область ротовой полости и типы ротового аппарата у фитопаразитических нематод	99
19.	Пищеварительная система таксонов фитопаразитических нематод	100
20.	Пример рабочего процесса создания изображений	114
21.	Телемедицина использует интернет для обмена информацией, касающейся пациента, в режиме реального времени	116
22.	Специалист может получить доступ к изображению вредного организма через интернет с устройства «Nikon DS-L2», подсоединенного к камере микроскопа	117
23.	Защитные экраны для сетей LAN	118
24.	Камера Fi-1 и панель DS-L2, подключенные к А – микроскопу; В – Цифровая камера «Nikon» (Fi-1); С – блок управления камерой «Nikon» (DS-L2), который подключается к интернету	119
25.	Аппаратура «Nikon» для дистанционной микроскопии, установленная в лабораториях карантина растений в г. Бангкоке, Таиланд	119
26.	Варианты ИТ-безопасности при установке камеры микроскопа в сети LAN для обеспечения внешнего доступа из интернета	121
27.	Неспециалист в Таиланде использует видео-звонок через Skype для обсуждения образца со специалистами во Вьетнаме. Изображение образца предоставляется специалистам во Вьетнаме через интернет при помощи системы «Nikon DS-L2»	121
28.	Изображением образцов, размещенных под USB-микроскопом, можно поделиться с экспертом через ПО для работы с видео	121

29.	Слева: В пункте досмотра на границе с USB-микроскопа на ПК передаются изображения, которые могут просматривать удаленные специалисты посредством инструментов взаимодействия через интернет, таких как Skype. Центр: USB-микроскоп с 20–200-кратным увеличением. Справа: Пограничный инспектор изучает вредные организмы и создает изображения, используя USB-микроскоп.....	123
30.	В центре: Разнообразные простые аксессуары позволяют мобильным телефонам создавать изображения вредных организмов с большим увеличением. Эти изображения могут быть представлены сообществам через облачные сети для обсуждения. Эти сообщества могут включать в себя местные или региональные НОКЗР. Изображения, размещенные по краям, были получены при помощи беспроводного микроскопа компании «Hot Electronics» и мобильного телефона. Слева расположены фотографии бурой пятнистости папайи. Справа показан целый ряд снимков с разным увеличением, полученных при помощи беспроводного микроскопа	124
31.	Предлагаемая сеть производителей, консультантов, информаторов из службы распространения сельскохозяйственных знаний и специалистов.....	125
32.	Дистанционная диагностика в поле, при которой фото- или видеоизображения вредных организмов записываются на мобильном устройстве и через интернет предоставляются группе людей, которые, вероятно, смогут предложить идентификацию, рекомендацию по борьбе или и то, и другое	126
33.	Малое оборудование для стандартного закрепления насекомых.....	131
34.	Верхний и боковой вид наколотого жука	135
35.	Вид сбоку дважды закрепленного насекомого	136
36.	Вид насекомого, закрепленного на картон, сверху и сбоку	136
37.	Насекомое на картонном треугольнике	136
38.	Вид сверху и сбоку моли с расправленными крыльями	137
39.	Микроинструменты, используемые для приготовления энтомологического препарата	138
40А.	Образец, напрямую наколотый на булавку, демонстрирующий расположение этикеток	140
40Б.	Образец, наколотый на картон, демонстрирующий расположение этикеток и место накалывания	140
41.	Пример этикетки для образца, хранящегося в пробирке.....	141
42.	Нанесение этикетки на образец, зафиксированный на предметном стекле.....	141

Таблицы

1.	Пример расчета мастер-микса для одноэтапной ОТ-ПЦР.....	94
2.	Химические вещества и их категории опасности.....	133
3.	Преимущества, недостатки и типы образцов, подходящих для каждого метода сохранения в гербарии.....	154

Сокращения и аббревиатуры

АФО	Американское фитопатологическое общество
АКИС	Австралийская карантинная и инспекционная служба
БОПР	Американское общество патологии растений
ВТО	Всемирная торговая организация
ГМО	Генетически модифицированный организм
ДН	Додецилсульфат натрия
ЕОКЗР	Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений
ЕС	Европейский союз
ЗУД	Зона управления данными
ИБОМ	Инструкция по безопасному обращению с материалами
ИД	Идентификация
ИС	Изоамиловый спирт
ИСО	Международная организация по стандартизации
ИТ	Информационная технология
КАД	Картофельный агар с декстрозой
ЛЗРОС	Лаборатория здоровья растений и окружающей среды
МДФК	Метод дифференциального фазового контраста
МОФП	Международное общество фитопатологии
МСФМ	Международные стандарты по фитосанитарным мерам
МСП	Министерство сырьевой промышленности, Новая Зеландия
НИР	Научные исследования и разработки
НОКЗР	Национальная организация по карантину и защите растений
НЦБИ	Национальный центр биотехнологической информации
ОВКВ	Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха
ОВП	Описания вирусов растений
ОТ	Обратная транскрипция
ППФ	Протокол передачи файлов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

РОКЗР	Региональная организация по карантину и защите растений
СДВ	Стерильная дистиллированная вода
СК	Совершенствование качества
СОП	Стандартные операционные процедуры
СОС	Соглашение ВТО по применению санитарных и фитосанитарных мер
СУК	Система управления качеством
СУДЛ	Система(ы) управления данными в лаборатории
ТАФ	Триэтиламинный фиксатор
ТЭ	Буфер, содержащий трис-этилендиаминтетрауксусную кислоту
УФ	Ультрафиолетовое излучение
ФСБРТ	Фосфатно-солевой буферный раствор с твином
ЦИДР	Центры по исследованиям, диагностике и реагированию
ЭДТУ	Этилендиаминтетрауксусная кислота
DAS	Сэндвич-вариант ELISA
DOI	Идентификатор цифрового объекта
ELISA	Фермент-связанное иммуносорбентное исследование
Fera	Компания «Fera Science Ltd» (ранее – Агентство по исследованию продуктов питания и окружающей среды, прим.пер.)
HTTP	Протокол передачи гипертекстовых файлов
IgG	Иммуноглобулин G
IP	Интернет-протокол
IPPC	Международная конвенция по карантину и защите растений
LAMP	Петлевая изометрическая амплификация
LAN	Локальная информационная сеть
LFD	Устройства для проведения иммунохроматографического анализа
M-MLV	Вирус мышинного лейкоза Молони
NASH	Спот-гибридизация нуклеиновых кислот
PQR	Информационно-поисковая система ЕОКЗР по карантину растений
ProMED	Программа мониторинга новых болезней
PVP	Поливинилпирролидон
TAS	Тройной сэндвич с антителами (ELISA)
WAN	Сеть широкого доступа

Выражение признательности

Лаборатория здоровья растений и окружающей среды (ЛЗРОС) Новой Зеландии и Компания «Fera Science Ltd» (Fera) благодарят Международную конвенцию по карантину и защите растений (МККЗР) за возможность создания этого руководства, а также всех авторов за их ценный вклад. Вдохновение и замысел руководителя ЛЗРОС Лалит Кумарасингхе (Lalith Kumarasinghe) наряду с поддержкой начальников подразделений г-на Алана Флинна (Alan Flynn), д-ра Бретта Александра (Brett Alexander)

и д-ра Лизы Уорд (Lisa Ward) вызывают чувство огромной благодарности. ЛЗРОС благодарит д-р Шерли Джорджа (Sherly George) за координацию работы над четырьмя главами руководства, а также авторов и д-ра Руди Шницеля (Rudi Schnitzler) за оформление глав. ЛЗРОС также выражает признательность г-же Амирте Франсиз (Amirtha Francis) за первичное редактирование и д-ру Джеймсу Хо (James Haw) и г-же Диане Джоунс (Diane Jones) за рецензию содержания руководства.

Введение

Секретариат Международной конвенции по карантину и защите растений (МККЗР) под руководством Комитета МККЗР по развитию потенциала разработал ряд технических ресурсов для поддержки внедрения МККЗР на национальном уровне. Эти ресурсы предназначены для обеспечения информацией и средствами, которые оказывают поддержку реализации национальных прав, обязанностей и обязательств в рамках МККЗР.

В данном руководстве представлена информация, предназначенная для содействия созданию, управлению и техническому обслуживанию диагностических лабораторий и услуг, в целях оказания содействия национальным фитосанитарным системам.

Зачем нужно руководство по диагностическим лабораториям?

Фитосанитарные системы имеют важное значение для предотвращения интродукции и распространения вредных для растений организмов.

МККЗР – это международное правовое соглашение, которое является основой фитосанитарных мер. МККЗР была принята 182 договаривающимися сторонами, которые сотрудничают для обеспечения продовольственной безопасности, охраны окружающей среды и содействия развитию международной торговли.

МККЗР принимает международные стандарты по фитосанитарным мерам (МСФМ), которые устанавливают требования к различным видам деятельности. Эти МСФМ предоставляют странам основу для применения фитосанитарных мер, которые могут иметь далеко идущие последствия; эти стандарты признаются Соглашением Всемирной торговой ор-

ганизации по применению санитарных и фитосанитарных мер (ВТО-СФС). Согласно тексту Конвенции фитосанитарные меры должны быть технически обоснованы и соразмерны представляемому риску. Чтобы быть технически обоснованными, многие фитосанитарные процедуры и системы, требуемые в соответствии с МККЗР, полагаются на точность диагностики. Поэтому диагностические услуги крайне важны для выполнения обязательств и обязанностей в рамках МККЗР, а также СФС-Соглашения ВТО.

К обязанностям и обязательствам НОКЗР, которые зависят от диагностики, относятся следующие (рис. 1):

- проведение анализа фитосанитарного риска (Статья МККЗР IV.2(e); МСФМ 2 и 11), так как диагностика может предоставить основополагающую информацию о том, какие именно специфические фитосанитарные риски необходимо проанализировать;
- установление фитосанитарных мер в отношении импорта (Статья VII; МСФМ 20), так как эти меры должны основываться на анализе фитосанитарного риска, который должен опираться на результаты диагностики;
- проверка импорта (Статья VII; МСФМ 20), досмотр (Статья VII; МСФМ 20) и нотификация о несоответствии (Статья VII; МСФМ 13), так как диагностика имеет принципиальное значение в части, касающейся обеспечения точной идентификации выявленного вредного организма;
- проведение надзора (Статья VII.2(к); МСФМ 6), так как диагностика предоставляет необходимую информацию об организмах, собранных в ходе направленных обследований, с целью обеспечения достоверной информации о статусе вредных организмов

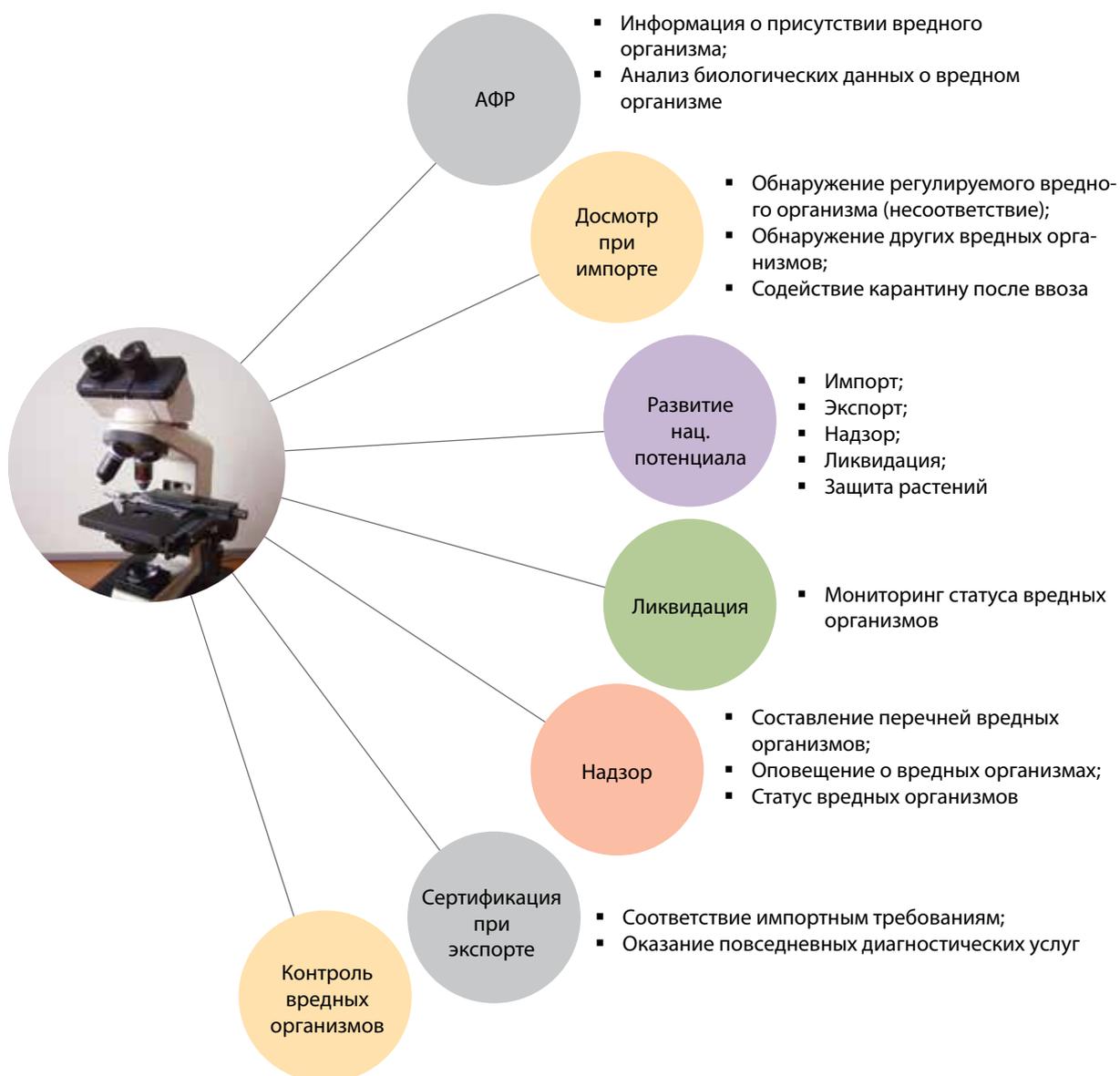


Рисунок 1. Ряд фитосанитарных программ, для которых диагностическая информация и экспертные знания могут быть полезны

(Статья VII.2 (к); МСФМ 8), которая содействует принятию регулирующим органом действий, таких как включение вредных организмов в перечни регулируемых вредных организмов (МСФМ 19) и оповещение о вредных организмах (МСФМ 17).

Диагностика, таким образом, совершенно необходима для научно-обосно-

ванных фитосанитарных мер. Достоверная информация о вредных организмах требует точной диагностики вредного организма; возможность предложить точные и своевременные диагностические услуги и сообщить о результатах такой диагностики, таким образом, принципиально важна для функционирования национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) и выполнения

положений МККЗР. В то время, как многие НОКЗР сами берутся за управление диагностической лабораторией, другие передают сторонним организациям выполнение части работ. В этом руководстве рассматриваются материальные, финансовые требования и требования к персоналу, которым НОКЗР необходимо следовать, чтобы выполнять свои обязательства. Это руководство также вносит предложения относительно того, как осуществлять различные виды деятельности.

Это руководство подготовили:

- Кинг Хай Фан, Санта Франс, Олвин Грин, Дисна Гунавардана, Велком Хо, Лалит Кумарасингхе, Бенедикт Лебас, Кэрол Муир, Сумати Муруган, Терез Оливер; Лаборатория здоровья растений и окружающей среды, Министерство сырьевой промышленности, Новая Зеландия.
- Гэри Конг; Совместный исследовательский центр по биобезопасности растений, Университет Канберры, Австралия.
- Джулиан Смит, Ребекка Викес; Компания «Fera Science Ltd» (Fera), Соединенное Королевство.
- Орландо Соса; МККЗР, ФАО, Италия
- Марк Стэнавэй; Квинслендский технологический университет, Австралия.
- Майкл Томсон; Международный центр сельскохозяйственных исследований (CABI), Серданг, Селангор, Малайзия.

Как пользоваться этим руководством

Это руководство предназначено для руководителей технических программ в НОКЗР с целью создания и поддержания функциональной системы диагностических лабораторий. Оно объединяет в одном месте некоторые оперативные и функциональные аспекты, которые лежат в основе предоставления диагностических услуг. Они включают в себя создание

диагностической лаборатории и некоторые руководящие принципы по типам программ и процедур, основанных на опыте уже созданных лабораторий, которые следует применять. Содержание этого документа было составлено на основе опыта и информации, предоставленной экспертами в различных областях знаний и из разных стран, при участии Комитета МККЗР по развитию потенциала и Секретариата МККЗР. Однако, поскольку каждая лаборатория и услуга должны создаваться с учетом их особых целей и сопутствующих факторов, читателям следует пользоваться этим руководством только как источником общей информации. Существуют дополнительные источники информации и описания конкретного практического опыта (некоторые из них перечислены в разделе 3). НОКЗР рекомендуется изучить различные подходы.

Это руководство охватывает работу официальных лабораторий, предоставляющих диагностические услуги для процедур НОКЗР, таких как надзор, анализ фитосанитарного риска, сертификация экспорта и проверка импорта. Некоторые диагностические лаборатории НОКЗР выполняют множество функций. Например, в рамках национальной политики диагностические лаборатории могут наделяться правом осуществлять официальную фитосанитарную диагностику для целей регулирования в дополнение к диагностическим услугам, оказываемым с другими целями, такими как реализация национальных программ, которые могут включать в себя услуги, оказываемые без предварительной записи производителям и другим лицам, которым нужна сертификация статуса вредного организма. Кроме того, в стране могут существовать и другие лаборатории, которые не проводят фитосанитарную диагностику, но выполняют иные диагностические функции, например, связанные с проведением исследований, обучением и

Введение

услугами для производителей, оказываемыми без предварительной записи. В данном руководстве не рассматривается вопрос наделения подобных лабораторий полномочиями на оказание услуг, предоставляемых НОКЗР¹.

Руководство не предназначено быть исчерпывающим или предписывающим в отношении рассматриваемых диагностических процедур и конкретных методов. Читатель должен помнить о том, что могут существовать и другие подходящие методы, которые можно применять. Тем не менее, независимо от выбранного метода, персонал, проводящий диагностику, должен применять соответствующий «передовой опыт», необходимый для достижения желаемых результатов.

Обратите внимание, что в этом руководстве:

- подробно не рассматриваются способы наделения полномочиями лабораторий, не входящих в структуру НОКЗР, и других поставщиков услуг, или осуществления контроля их деятельности. По этим вопросам разрабатывается отдельный МСФМ;
- не даются подробные рекомендации касательно конкретных диагностических методов;
- не дается нормативное руководство по тому, как следует проводить диагностику, или какие процедуры управления качеством применять.

В случаях, когда приводится техническая информация, она представляет собой иллюстрацию функциональных процедур, которые уже используются другими лабораториями, и не должна толковаться как единственно верная.

Структура руководства

Данное руководство разделено на два основных раздела, в которых рассматриваются вопросы создания диагностической лаборатории, управления ею и приводится процесс работы с образцами, соответственно. В первой части обсуждается оперативная основа деятельности лаборатории, а также материальная и нематериальная инфраструктура, необходимая для оказания диагностических услуг. Во второй главе описаны этапы, которые проходит образец в течение процесса диагностики с момента его получения до определения окончательной судьбы образца. В третьей главе предлагаются источники информации и экспертных знаний, которые НОКЗР, возможно, пожелает использовать.

Исходные ресурсы представляют собой необходимую основу для оказания услуг, и их описание составляет основу Раздела 1.

В Главе 1 объясняется необходимость прочной оперативной основы оказания диагностических услуг, включая необходимый персонал и квалификацию, а также практический бизнес-план, который обеспечивает надежное будущее лабо-

¹ МСФМ 5 (Глоссарий фитосанитарных терминов) дает определение термина «официальный», который охватывает виды деятельности, которые может выполнять национальная организация по карантину и защите растений (НОКЗР) для решения вопросов, связанных с любым компонентом фитосанитарной системы договаривающейся стороны в рамках своих полномочия и под свою ответственность.

Официальный – устанавливаемый, уполномочиваемый или выполняемый национальной организацией по карантину и защите растений (МСФМ 5).

Использование термина «аккредитация» не раз обсуждалось в рамках МККЗР при рассмотрении процесса наделения полномочиями организаций, не являющихся НОКЗР, выполнять фитосанитарные действия от лица НОКЗР, но всегда под ответственность НОКЗР. Эти обсуждения привели к заключению, что НОКЗР не имеют законного права выполнять функции органов по аккредитации на национальном уровне, и что предпочтительные формулировки должны соответствовать терминологии, используемой в определении термина «официальный»: использовать «наделение полномочиями других организаций, не НОКЗР, принимать фитосанитарные меры от лица НОКЗР».

ратории. Материальная инфраструктура (Глава 2) охватывает не только виды помещений и оборудования, которые требуются в лаборатории НОКЗР или у внешнего поставщика услуг, но и управление этими объектами. Нематериальная инфраструктура (Глава 3) включает в себя системы обеспечения качества и системы отслеживания, а также стандартные оперативные процедуры (СОП), от которых зависят эти системы. Также сюда включены системы отчетности, которые обеспечивают получение информации о конкретных результатах диагностики заинтересованными лицами, которым эта информация нужна. Некоторые из этих отчетов – официальное обязательство, а некоторые связаны с передовым опытом

и прозрачностью. Последний элемент исходных ресурсов – это дополнительная информация, необходимая для проверки результатов диагностики.

В разделе 2 отражен рабочий процесс, через который пройдут многие образцы, поступившие в лабораторию (рис. 2). Рабочий процесс начинается (Глава 4) с поступления образца и информации о том, как он был получен. Образец должен быть зарегистрирован и исследован, чтобы определить, что с ним делать. В большей части Главы 5 основное внимание уделяется диагностике: какие методы доступны, какие направления диагностики должны быть задействованы, необходимость фиксировать полез-

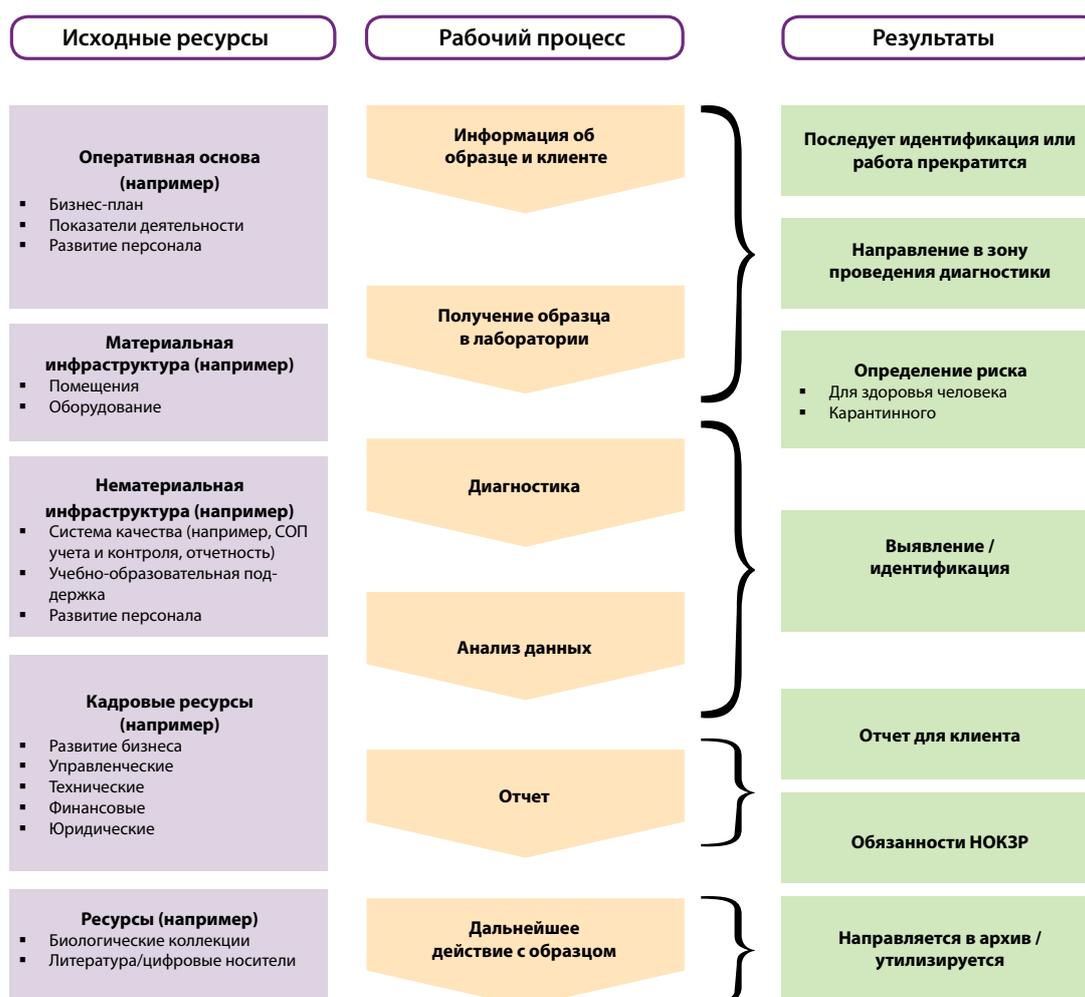


Рисунок 2. Функционирование диагностической лаборатории разделено на две основные сферы, исходные ресурсы и результаты, которые отражены в структуре настоящего руководства

Введение

ные изображения образца, возможность дистанционной диагностики, а также использование и поддержание референтных коллекций. В Главе 6 предлагается введение в создание полезных изображений образцов, что является одним из важнейших элементов дистанционной диагностики (Глава 7). Референтные коллекции, имеющее важнейшее значение для качественной диагностики, рас-

сматриваются в Главе 8. Проверенный результат диагностики должен быть предоставлен всем заинтересованным сторонам (Глава 9), и должны быть приняты решения об окончательной судьбе образца (Глава 10), который, возможно, придется уничтожить, сохранить в архиве в качестве доказательства или в справочных целях, или, в некоторых случаях, вернуть владельцу.



РАЗДЕЛ 1

Оперативная основа деятельности
диагностической лаборатории

1. Оперативная основа деятельности диагностической лаборатории

Введение

НОКЗР должна всегда стремиться к совершенству в предоставлении услуг. Поэтому НОКЗР необходимо определить приоритетные программы и виды деятельности, а также обеспечить наличие достаточных ресурсов. НОКЗР нужна стабильная и достаточная финансовая основа. Во многих случаях государственные бюджетные ассигнования, выделяемые НОКЗР, являются недостаточными, и их объем может меняться из года в год ввиду изменения государственных приоритетов. НОКЗР должны позаботиться о том, чтобы национальная правовая система предусматривала взимание платы за услуги в соответствующих случаях. Они также должны договориться об удержании всего объема этих выплат или его части для обеспечения функционирования и постоянного совершенствования НОКЗР.

Примите во внимание, что НОКЗР не обязана обладать всеми необходимыми компетенциями и материально-техническим обеспечением, но, безусловно, она должна иметь доступ к ним. Для реализации всех фитосанитарных программ, в том числе надзора, диагностики, обработок и регулирования импорта, должны быть выбраны учреждения-партнеры и поставщики услуг. Сторонние поставщики услуг могут быть задействованы через проведение совместных работ или наделение их полномочиями в тех случаях, когда услуги предоставляются, но полная ответственность сохраняется за НОКЗР.

1.1 Факторы стабильности и надежности

Роль фитосанитарной лаборатории НОКЗР в содействии национальному развитию зависит от стабильности и надеж-

ности предоставляемых ею услуг. Поэтому факторы стабильности и надежности должны учитываться при создании лаборатории для обеспечения ее эффективного и предсказуемого функционирования. НОКЗР должна обеспечить создание в своей фитосанитарной диагностической лаборатории условий, способствующих стабильности и надежности ее деятельности, чтобы поддержать различные фитосанитарные программы, реализация которых зависит от ее услуг. Необходимо учитывать следующие условия:

- наличие необходимого количества обученного персонала, обладающего соответствующими уровнями квалификации;
- надлежащее развитие и сохранение персонала;
- доступ к ресурсам и обеспечение источников финансирования;
- наличие ресурсов для решения фитосанитарных экстренных ситуаций и кризисов;
- в случае отсутствия эксперта в штате лаборатории – возможность привлечения эксперта через третьи стороны (национальные или международные).

Во многих странах диагностические услуги предоставляются клиентам бесплатно. Тем не менее, даже в таких случаях НОКЗР должна позаботиться о том, чтобы необходимые ресурсы были заложены в ее бюджет для обеспечения долгосрочного предоставления услуг на том уровне качества и надежности, которого ждут ее клиенты.

1.1.1 Компетенции и общие ресурсы

Для предоставления ряда услуг, которые будут определены национальными

1. Оперативная основа деятельности диагностической лаборатории

приоритетами, фитосанитарной диагностической лаборатории необходимо обладать различными компетенциями и специальными навыками. Например, могут понадобиться отраслевые специалисты для проведения повседневной или специализированной фитосанитарной диагностики в сфере энтомологии, фитопатологии, нематологии, сорных растений и др. В то время как от НОКЗР не требуется обладать всеми требуемыми компетенциями, она должна иметь к ним доступ. Доступ может быть получен через системы сотрудничества или наделения полномочиями, но ответственность несет НОКЗР. Использование системы наделения полномочиями должно быть подкреплено продуманным механизмом возмещения издержек. При создании фитосанитарной диагностической лаборатории (и управлении ею) договаривающаяся сторона должна быть осведомлена о национальных, региональных и международных организациях, способных предоставить дополнительные ресурсы, которыми не обладает НОКЗР. Национальные учреждения, например, университеты, соответствующие научно-исследовательские институты, региональные организации (например, РОКЗР), центры подготовки высококвалифицированных фитосанитарных специалистов, частные компании и международные организации обладают ресурсами, которыми можно воспользоваться.

К обязательным условиям успешного распределения общих ресурсов будут относиться следующие:

- НОКЗР или договаривающаяся сторона должна создать инструменты сотрудничества (например, наделение полномочиями, письма-соглашения, договоры, протоколы о намерениях) с этими учреждениями-партнерами и поставщиками услуг для обеспечения своевременного обслуживания своих лабораторий.

- Учреждения-партнеры и поставщики услуг должны быть проинформированы о национальных обязательствах, которые должны быть выполнены в рамках соответствующих международных конвенций.
- Для учреждений-партнеров должны быть разработаны протоколы, руководства или СОПы, и они должны пройти по ним обучение для обеспечения того, что единообразие результатов их деятельности не нарушается.
- Учреждения-партнеры, действующие от лица НОКЗР, должны быть наделены полномочиями, должны контролироваться, должен проводиться их аудит, и они должны оцениваться на соответствие требованиями, установленным НОКЗР.

Результаты и инструменты сотрудничества должны по необходимости пересматриваться.

1.2 Стратегические планы

В стратегическом плане устанавливается, чего хочет достичь организация в средне- и долгосрочной перспективе, как она собирается это сделать, и каким образом она узнает, что достигла своих целей. Процесс планирования дает возможность партнерам и сотрудникам найти общий язык и участвовать в работе НОКЗР для достижения поставленных ею целей. План будет включать в себя четкую концепцию, формулировку миссии, стратегические задачи и описание организационной культуры, а также подробные планы действий.

Стратегические задачи НОКЗР должны быть определены на конкретный период времени (например, на пять лет), и их достижение должно руководствоваться стремлением выполнить свои обязательства, как указано в МККЗР. МСФМ обеспечивают основу для применения соответствующих фитосанитарных мер. В контексте национального развития, всеобъемлющие задачи могут быть следующими:

- защита национальных растительных ресурсов путем применения соответствующих фитосанитарных мер при импорте;
- содействие получению доступа на рынки и безопасности международной торговли растениями и растительными продуктами путем применения надежной системы сертификации экспорта;
- уменьшение угроз национальной продовольственной безопасности и окружающей среде путем защиты растительных ресурсов.

Каждая стратегическая задача должна подкрепляться определенными и осуществимыми мероприятиями и результатами. Выполнение стратегических задач во многом зависит от имеющихся ресурсов и поддержки заинтересованных сторон.

Предоставление лабораторных услуг по фитосанитарной диагностике должно быть отражено в стратегическом плане НОКЗР, и поэтому важно, чтобы сотрудники, оказывающие эти услуги, принимали участие в разработке плана уже на ранних стадиях. Фитосанитарная диагностическая лаборатория сама может разрабатывать свои собственные стратегические планы. Эти планы, однако, должны быть согласованы со стратегической рамочной программой, разработанной НОКЗР. Во всех стратегических планах особое внимание следует уделять решению оперативных вопросов, таких как наличие рациональной политики использования кадров (требуемое количество, компетентность и специализация персонала, дополнительное внимание обучению и конкурентоспособной заработной плате), а также предоставлению оперативных ресурсов, своевременное наличие которых необходимо лаборатории для проведения требуемых анализов на требуемом уровне достоверности.

1.3 Механизмы финансирования

Механизмы финансирования деятельности фитосанитарной диагностической лаборатории основаны, главным образом, на институциональной структуре, в которую входит НОКЗР, и уровне ее автономности. Фитосанитарные диагностические лаборатории функционируют наиболее эффективно и результативно при наличии необходимой стабильной финансовой ресурсной базы. Во многих странах НОКЗР финансируются за счет государственных ассигнований и взимаемой платы. В этом разделе описываются основные источники финансирования.

1.3.1 Государственный бюджет

Когда НОКЗР зависят только от государственного финансирования, они могут конкурировать с другими государственными учреждениями. Поскольку государственные приоритеты иногда меняются, перераспределение средств может отрицательно сказаться на реализации программ НОКЗР, включая функционирование фитосанитарной диагностической лаборатории. Кроме того, объем ассигнований может меняться из года в год, и это будет влиять на способность НОКЗР выполнять ее стратегические задачи. Государственное финансирование обычно связано с утвержденными планами работы и может ограничить гибкий подход к выделению средств в экстренных ситуациях. Численность персонала может быть ограничена разрешением правительства и государственными ассигнованиями.

1.3.2 Плата за услуги

Получение платы за услуги позволяет НОКЗР, а значит, и фитосанитарным диагностическим лабораториям полностью или частично возмещать затраты на услуги. Система возмещения затрат помогает постоянно улучшать фитосанитарные услуги. Во многих странах, одна-

1. Оперативная основа деятельности диагностической лаборатории

ко, плата за услуги направляется непосредственно в государственную казну, и в соответствии с государственными приоритетами определяется, какая часть выделяется НОКЗР для дальнейшего совершенствования ее услуг, если таковая вообще выделяется. По-видимому, все более распространенной становится ситуация, когда часть от всего объема полученной платы или вся плата за услуги передаются НОКЗР. В этих случаях важно, чтобы средства выделялись на оплату кадровых и оперативных ресурсов лаборатории.

Плата за предоставленные услуги должна:

- быть справедливой, единой и связанной с затратами на оказание услуг;
- быть обоснованной и не представлять барьера для импорта и экспорта;
- регулярно пересматриваться.

1.3.3 Фонд на случай возникновения чрезвычайных ситуаций и другие фонды экстренного финансирования

НОКЗР должна иметь доступ к внеплановым финансовым ресурсам, чтобы иметь возможность реагировать на чрезвычайные фитосанитарные ситуации. К ним относятся оказание диагностических услуг в условиях растущего спроса на эти услуги во время локализации или ликвидации очага интродуцированного карантинного вредного организма или других вредных организмов. В идеале, НОКЗР имеет план на случай возникновения чрезвычайной ситуации, в котором учтен необходимый объем услуг по диагностике вредных организмов и финансовых средств, выделяемых государством и отраслевыми спонсорами. Без такого чрезвычайного фонда НОКЗР может оказаться неспособной отреагировать на распространение карантинного вредного организма, тем самым делая ликвидацию трудно осуществимой или невозможной.

1.3.4 Гранты, помощь и другие отчисления

НОКЗР может привлечь значительные инвестиции для повышения качества услуг и инфраструктуры из внеплановых ассигнований или специальных статей расходов генерального казначейства, совместного финансирования и партнерских соглашений с частным бизнесом, пожертвований или финансовой поддержки со стороны международных и региональных организаций. Инвестиционные кредиты и гранты могут быть получены правительством или автономной НОКЗР от развитой страны или кредитного учреждения в тех случаях, когда могут быть достигнуты четко определенные цели, представляющие значительную выгоду для страны.

1.3.5 Финансовое обеспечение

НОКЗР должна иметь хорошие возможности для получения доступа к финансовым ресурсам с целью обеспечения своего долгосрочного функционирования. На распределение правительством ассигнований влияют его приоритеты. НОКЗР должна быть в приоритетном списке для получения достаточного финансирования. Поэтому необходимо просвещать все заинтересованные стороны, включая политиков и потребителей, о роли диагностических услуг в следующих направлениях:

- конкретные национальные обязательства и функции договаривающихся сторон, как указано в МККЗР;
- издержки и выгоды от выполнения этих функций;
- проблемы получения или сохранения доступа к рынкам экспорта ввиду отсутствия доверия к экспортной сертификации или к заключению соглашений о признании эквивалентности альтернативных санитарных и фитосанитарных мер;
- воздействие и последствия интродукции карантинного вредного орга-

низма для национальной экономики, продовольственной безопасности и окружающей среды, а также потенциальные последствия для благополучия граждан ввиду принятия недостаточных мер по недопущению интродукции вредных организмов.

Следовательно, диагностическая лаборатория при поддержке своей НОКЗР должна четко указать приемлемый объем ресурсов с учетом важности оказываемых ею услуг и добиваться его получения. Такая информационно-разъяснительная работа НОКЗР должна быть отражена в ее стратегическом плане для укрепления ее возможностей находить необходимое финансовое обеспечение и ресурсы для оказания услуг клиентам на удовлетворительном уровне.

1.4 Правовая поддержка

Работа НОКЗР должна опираться на содержательную юридическую основу, учитывающую всю полноту последствий, к которым может привести информация, предоставляемая общественности. Это особенно актуально в контексте идентификации вредных для растений организмов, поскольку заключения по идентификации или выявлению вредного организма могут иметь серьезные последствия для торговли, а вовлеченные коммерческие сектора могут понести значительные финансовые убытки. Соответственно, НОКЗР должна иметь возможность получить соответствующую профессиональную правовую консультацию своего штатного юриста или юриста, привлеченного посредством договоренностей с третьей стороной.

1.5 Кадровые ресурсы

Персонал НОКЗР является ее главным ресурсом, и во всем мире наблюдается нехватка персонала, обладающего надлежащими навыками. Таким образом, кадровая служба – ключевой элемент,

взаимодействующий с руководством для обеспечения эффективного обучения персонала, профессионального развития и планирования кадрового резерва. Смотрите также разделы 3.2 и 3.3 в Главе 3 «Системы управления качеством».

1.5.1 Роли и обязанности сотрудников лаборатории

В следующем разделе описывается универсальный набор компетенций, важный для работы диагностической лаборатории. Количество персонала, выполняющего определенную роль, будет зависеть от общего спроса на диагностические услуги. Помимо общих финансовых ограничений, кадрового потенциала и степени специализации персонала на работу сотрудников влияют: происхождение, разнообразие и объемы исследуемых образцов, ожидаемые сроки выполнения работы и необходимость увеличить штат для работы в критических ситуациях, таких как реагирование на проникновение вредных организмов.

1.5.1.1 Техническая поддержка

Специалисты технической поддержки выполняют в лаборатории ряд функций.

Ключевые сферы ответственности включают в себя:

- получение образцов и их занесение в базу данных (эта работа также может выполняться административным персоналом);
- подготовку и обработку образцов для идентификации;
- утилизацию образцов или подготовку образцов для их включения в референтную коллекцию;
- создание изображений образцов для библиотеки изображений;
- предварительную идентификацию вредного организма;
- поддержание референтной коллекции и библиотеки изображений.

1. Оперативная основа деятельности диагностической лаборатории

1.5.1.2 Эксперт по диагностике

Эксперты по диагностике оказывают диагностические и консультативные услуги по экзотическим и новым вредным организмам и болезням, поражающим растения или наземную окружающую среду, выявленным при проведении надзора, исследований, идентификации на границе и после пересечения границы, и карантина после ввоза.

Ключевые сферы ответственности включают в себя:

- окончательную идентификацию образца;
- научный анализ, подготовку отчетов и консультации по критическому анализу данных, интерпретацию результатов и анализ тенденций и последствий;
- консультирование по вопросам национальных диагностических стандартов;
- управление проектами;
- подготовку изображений для библиотеки изображений.

1.5.1.3 Хозяйственное управление и административная поддержка

Технический характер услуг по диагностике вредных для растений организмов требует сильного хозяйственного управления и административной поддержки, особенно касательно оборудования, помещений и технического обслуживания. Наличие квалифицированного персонала для технического обслуживания оборудования и организации ремонта имеет большое значение для повседневной деятельности лаборатории. Также чрезвычайно важно понимать, какие расходы связаны с амортизацией и заменой оборудования и помещений. Включение этих затрат в бизнес-план является необходимой частью функционирования НОКЗР.

Ключевые сферы ответственности включают в себя:

- управление финансовыми ресурсами;
- закупку и инвентаризацию оборудования и расходных материалов;
- управление системами информационных технологий (ИТ);
- техническое обслуживание зданий (отопление, сантехника и т.д.);
- обеспечение надлежащего функционирования систем утилизации биологических отходов и систем обеспечения биологической безопасности.

1.5.1.4 Руководитель лабораторией

Роль руководства должна быть определена, и эту роль зачастую лучше всего поручать персоналу, наделенному управленческими функциями. Эти люди берут на себя ответственность за выполнение различных ненаучных задач, но, главным образом, они обеспечивают максимально эффективное использование технических возможностей. Контроль достижения ключевых показателей эффективности работы также входит в функции руководства. Важнейшие результаты профессионального развития и планирования кадрового резерва также входят в обязанности руководства.

Ключевые сферы ответственности включают в себя:

- функциональное руководство;
- управление персоналом (подбор кадров, потребности в обучении и т.д.);
- бизнес и стратегию;
- финансы и контракты.

1.6 Обучение сотрудников лаборатории

Согласно Статье IV.2 (з) МККЗР в обязанности официальной НОКЗР входит «обучение и развитие штата работников». Эффективное обучение, возможность наработать опыт и продемонстрировать свою квалификацию обеспечат успешную и надежную диагностику.

Может потребоваться ряд обучающих занятий прежде, чем наставник и стажер согласятся, что стажер компетентен выполнять задачи без контроля за ним; все учебные занятия должны быть задокументированы. Все этапы обучения должны фиксироваться документально и должны охватывать:

- Этап 1. Чтение соответствующих инструкций (например, СОП);
- Этап 2. Наблюдение за выполнением задачи, осуществляемое обученным сотрудником;
- Этап 3. Выполнение задачи под контролем;
- Этап 4. Оценка компетентности выполнять задачу без контроля.

Во всех возможных случаях, подтверждающие данные или опыт, используемые как часть процесса оценки компетентности, должны быть документально зафиксированы. Компетентность оценивается посредством использования, по мере возможности, хотя бы одного из следующих способов:

- эксперименты по диагностике намеренно зараженного образца;
- повторный анализ образцов, диагностика которых уже была проведена ранее;
- анализ референтных материалов или материалов для квалификационного тестирования;

- сравнение результатов наставника и стажера.

Критерии приемлемости документируются и, как правило, устанавливаются на уровне допустимых пределов контроля качества для метода. Дата разрешения на выполнение задач без контроля указывается на оценочном формуляре наряду с подтверждением руководителя подразделения. Руководители подразделений должны гарантировать, что представленные и задокументированные доказательства являются верными и надлежащими.

Допустимо, чтобы сотрудники самостоятельно учились проводить определенные процедуры (например, административные процедуры или простые экспериментальные методы) посредством чтения СОП. В этих случаях сотрудник укажет в учебной карточке, что занимался самостоятельно.

Лаборатории часто стараются участвовать в схемах квалификационного тестирования. Квалификационное тестирование определяет качество выполнения отдельными лабораториями конкретных анализов или измерений и используется для осуществления контроля качества работы, проводимой лабораториями. Также это тестирование непрерывно предоставляет подтверждающие данные о компетентности отдельного специалиста.

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

Введение

Рекомендации в этой главе основаны, главным образом, на опыте существующих фитосанитарных и экологических лабораторий (ФЭЛ), созданных при Центрах по исследованию и диагностике (ЦИД) и Группам реагирования (ГР) Министерства сырьевой промышленности Новой Зеландии. Также рассматривались следующие справочные материалы:

- **Берждес Л.В., Найт Т.Е., Тесориеро Л. и Фан Х.Т.** 2008 г. «Руководство по диагностике болезней растений во Вьетнаме». Монография АЦМСИ №129. Канберра, Австралийский центр международных сельскохозяйственных исследований. 210 с. / **Burgess, L.W., Knight, T.E., Tesoriero, L. & Phan, H.T.** 2008. Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. ACIAR Monograph No. 129. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research. 210 pp. Документ доступен по ссылке: http://aciar.gov.au/files/node/8613/mn129_diagnostic_manual_for_plant_diseases_in_viet_13726.pdf (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).
- Региональный офис ВТО в Юго-Восточной Азии. 2008 г. «Руководство по созданию вирусологической лаборатории в развивающихся странах». Нью-Дели, Региональный офис Всемирной торговой организации в Юго-Восточной Азии. Документ доступен по ссылке: http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B4249.pdf?ua=1 (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).
- «Создание диагностической лаборатории» в М.А. Конноли, под ред.

«Борьба с болезнями, передающимися контактным путем, в чрезвычайных ситуациях – руководство для применения в полевых условиях». Женева, Всемирная торговая организация, С. 253–267 / Setting up a diagnostic laboratory. In M.A. Connolly, ed. Communicable disease control in emergencies – a field manual. Geneva, World Health Organization, pp. 253–267. Документ доступен по ссылке: <http://www.unhcr.org/456c3ce92.pdf> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

- **Скоглунд Л.Г. и Блант. Т.** 2012 г. «Опыт фитосанитарной диагностической лаборатории». Сен-Пол, Миннесота. Американское фитопатологическое общество. Материалы АФС от 2012-05 / **Skoglund, L.G. & Blunt, T.** 2012. The plant diagnostic lab experience. St Paul, MN, American Phytopathological Society. APSFeatures 2012-05. (Идентификатор цифрового объекта (DOI): 10.1094/APSFeature-2012-05). Документ доступен по ссылке: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/diagnostician.aspx> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

2.1 Функции диагностической лаборатории

Быстрая и точная диагностика проблем здоровья растений является основной функцией фитосанитарной диагностической лаборатории, важной для поддержания здорового состояния фермерского производства, сельскохозяйственных культур, лесов, ландшафтов и мест общего пользования, а также для защиты стран от проникновения экзотических вредителей и болезней через границы.

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

Диагностическая лаборатория несет ответственность за:

- обеспечение быстрой и точной диагностики вредителей и болезней;
- регистрацию и хранение данных о присутствии вредных организмов;
- выявление и отслеживание инвазивных вредных организмов;
- содействие отклику на запросы клиентов;
- предоставление своевременных и рентабельных услуг.

Диагностическая лаборатория может оказывать помощь в распространении знаний, проведении исследований и обучении на уровне административно-территориальной единицы или страны, а также может осуществлять обследования сельскохозяйственных культур и предоставление услуг по фитосанитарному регулированию.

Диагностическая лаборатория может оказывать диагностические услуги по следующим направлениям: бактериология, ботаника, энтомология, микология, нематология и вирусология. В лаборатории могут проводиться следующие анализы:

- Бактериология и микология: выделение и выращивание в питательной среде грибов и бактерий позволяет проводить их идентификацию при помощи морфологических, биохимических и молекулярных анализов. Поддержание коллекции культур экзотических грибов и бактерий (положительные контроли) необходимо для того, чтобы можно было проводить сравнительные испытания в целях точной идентификации.
- Ботаника²: идентификация сорняков и пораженных болезнью растений-хозяев для других направлений диагностики.

- Энтомология: идентификация беспозвоночных проводится при помощи морфологического анализа, сравнения с идентификационными ключами и референтными образцами, а также при помощи молекулярных методов. Незрелые особи беспозвоночных могут быть выращены до более поздних стадий развития или до взрослых особей для проведения более точного таксономического определения или для сбора референтного материала; если есть подозрение, что организм является экзотическим, его разведение должно проводиться в изолированном помещении для разведения насекомых. Все выращенные беспозвоночные особи должны быть умерщвлены по завершении работ.
- Нематология: выделение нематод из субстратов и их идентификация с помощью морфологических и молекулярных анализов.
- Вирусология: различные методы могут использоваться для идентификации и классификации вирусов растений, виридов и организмов, культуру которых невозможно выделить, таких как фитоплазмы и *Liberibacter*. В зависимости от болезни могут быть проведены следующие анализы: трансмиссионная электронная микроскопия, биотест с применением травянистых и древесных растений-индикаторов, серологические и молекулярные методы.

Диагностическая лаборатория должна соответствовать следующим принципам:

- должна быть в состоянии проводить необходимые виды анализов;
- должна быть достаточно большой для обеспечения необходимой пропускной способности исследуемых образцов;

² Ботаника может быть интегрирована в другие направления диагностики, либо эта услуга может быть оказана местными гербариями, музеями и университетами

- должна быть безопасной и комфортной для персонала;
- должна стабильно функционировать в долгосрочной перспективе.

Для соответствия этим требованиям лаборатория должна иметь:

- подходящее здание или помещение (помещения), надлежащим образом расположенное и оснащенное;
- необходимое количество сотрудников, которые обучены и обладают квалификацией для проведения необходимых анализов;
- внутренний и внешний контроль качества для обеспечения согласованности и точности результатов;
- политику безопасности, основанную на проводимых анализах и рисках, представляемых организмами;
- техническую поддержку и материально-техническое обеспечение.

2.2 Расположение лаборатории

Диагностическая лаборатория должна располагаться в конструктивно прочной капитальной постройке. Внутренние стены и полы должны быть герметизированы краской или подходящим герметизирующим материалом, чтобы их легко можно было очищать или дезинфицировать.

Предпочтительно, чтобы диагностическая лаборатория была разделена на лаборатории бактериологии, микологии, энтомологии, нематологии и вирусологии (рис. 3 и 4). Если это не представляется возможным, все эти направления диагностики могут быть размещены в одной комнате с четко разграниченными зонами. Зоны для пробоподготовки, подготовки реактивов для полимеразной цепной реакции (ПЦР) и амплификации ДНК должны быть физически отделены друг от друга, чтобы предотвратить перекрестную контаминацию ДНК. Если это не представляется возможным, эти зоны должны быть, как минимум, хорошо обособлены друг от друга в пределах одной комнаты, чтобы избежать

перекрестной контаминации, и персонал должен следовать строгим лабораторным правилам (например, менять перчатки при перемещении из одной зоны в другую; пипетки и наконечники не должны попадать из одной зоны в другую).

Лаборатория может работать с образцами, представляющими различную степень потенциального риска для биобезопасности, такими как образцы материалов, в которых на пограничном досмотре обнаружены вредные организмы, и материалов из мест хранения транзитных грузов. Работа с этими образцами, представляющими высокую степень риска, должна проводиться в отдельной изолированной зоне. Подозрительные экзотические образцы беспозвоночных могут быть приведены в состояние нежизнеспособных особей перед их идентификацией или анализами вне изолированной зоны.

2.3 Лабораторные помещения

2.3.1 Диагностическая лаборатория

Рабочие столы, сиденья и другие лабораторные поверхности являются легко моющимися, гладкими, водонепроницаемыми, устойчивыми к кислоте, щелочи и органическим растворителям. Рабочие поверхности должны быть подходящей высоты (90 см для рабочих столов и 75 см для микроскопного стола).

- Лабораторные сиденья должны быть достаточно высокими, чтобы обеспечить комфортную рабочую позу за столом (стулья или кресла с регулируемой высотой), и они должны быть такими, чтобы их можно было продезинфицировать при помощи дезинфицирующих средств, когда это требуется.
- Открытые участки между столами, шкафами и оборудованием и под ними должны быть доступны для очистки.
- Место хранения внутри или за пределами лабораторной зоны должно быть достаточно вместительным для расходных материалов, тем самым

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории



Рисунок 3. Ориентировочный план лаборатории, на котором показано разделение рабочих зон для разных направлений диагностики

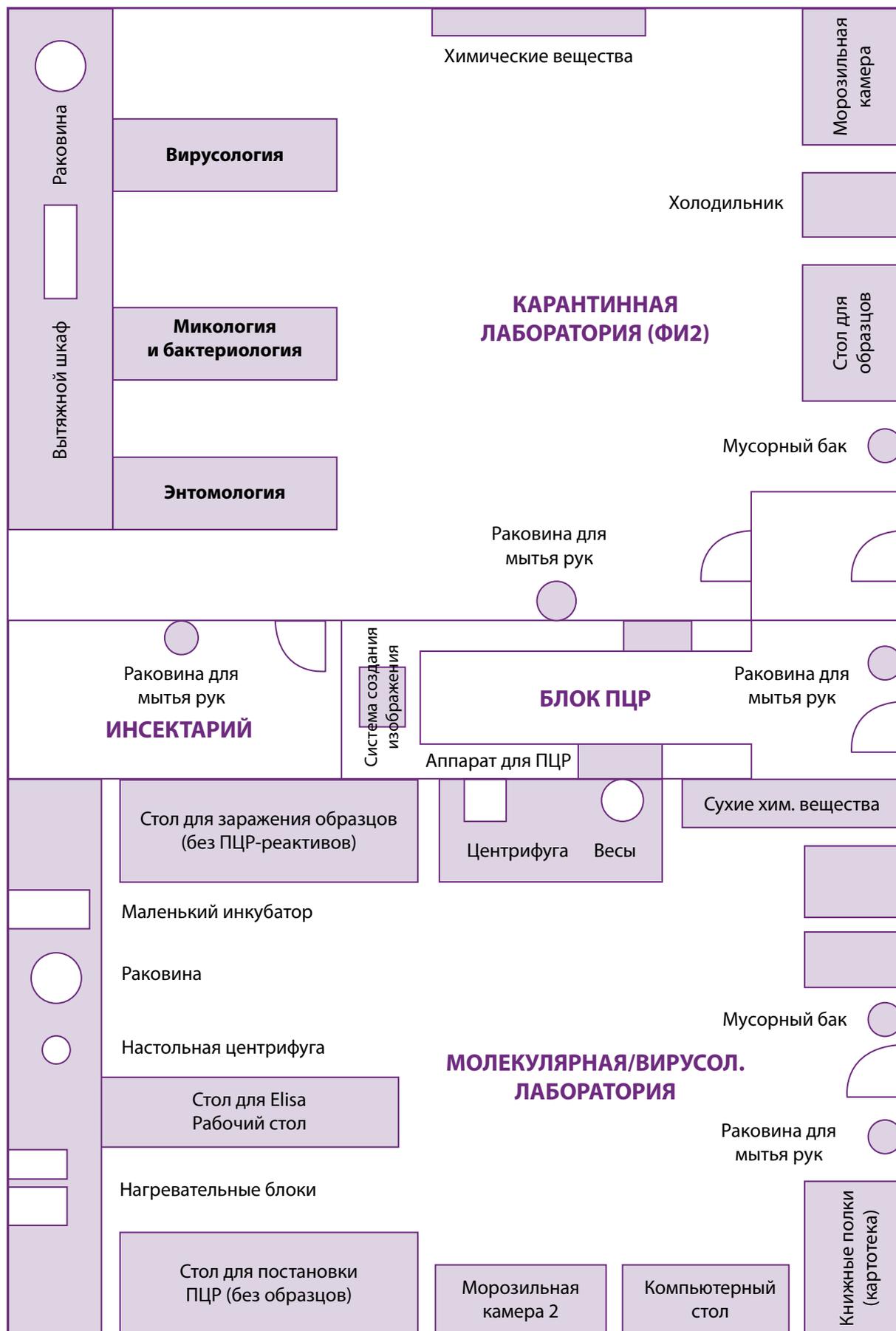


Рисунок 4. Разделение молекулярного и вирусологического блоков в лаборатории

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

предотвращая беспорядок на столах и в проходах между ними.

- Для стерилизации сред и буферов необходим автоклав.
- Окна и двери должны быть оснащены запорными механизмами. Открытые окна должны быть оснащены москитной сеткой. Все внутренние двери должны иметь смотровое окно.
- Наружные двери не должны вести непосредственно в лабораторию, а должны выходить в коммуникационный коридор.
- Помещения для личных вещей, верхней одежды, а также комнаты для приема пищи и туалеты должны располагаться за пределами рабочей зоны лаборатории.
- Раковины для мытья рук с проточной водопроводной водой должны быть предусмотрены в каждом помещении лаборатории, желательна около входной двери.

2.3.2 Лаборатория изоляции

- Знак биологической опасности и ограничения доступа в лабораторию должен быть размещен на видном месте у входа в лабораторию.
- Если в лаборатории используется искусственная вентиляция, для поступления направленного в лабораторию потока воздуха применяется вытяжная вентиляция.
- В лаборатории изоляции не должно быть открывающихся окон.
- Лаборатории изоляции должны быть оборудованы раковинами для мытья рук, расположенными у выходов.
- Для химического обеззараживания в лаборатории должен быть расположен экстренный аварийный душ.
- Должно быть предусмотрено место для промывки глаз.
- В лаборатории изоляции должна располагаться постоянно функционирующая электронная ловушка для насекомых.

- Аэрозольный баллончик с инсектицидом должен храниться в лаборатории изоляции на случай вылета летающих насекомых во время процедуры работы с образцами. Инсектицидное масло не должно использоваться в помещении, где разводят насекомых.
- Мебель должна эргономно подходить для использования в предназначенных целях.
- Рабочие столы, полы, стены, сиденья и другие лабораторные поверхности являются легко моющимися, гладкими, водонепроницаемыми, устойчивыми к кислоте, щелочи и органическим растворителям.
- Должны быть предусмотрены контейнеры для инфицированных материалов и запас промаркированных дезинфицирующих веществ для использования в целях обеззараживания.
- Морозильная камера или холодильник с морозильной камерой должны располагаться внутри лаборатории изоляции в целях уничтожения или снижения активности беспозвоночных особей, хранения больных или зараженных растительных материалов, реактивов и химических веществ, а также временного хранения зараженного материала растения-хозяина и упаковки до того, как они будут помещены в карантинный мусорный бак для уничтожения.
- В карантинном мусорном баке должно быть два мешка для мусора и внутренний мешок (т.е. тот, в который помещаются отходы), и он должен быть промаркирован знаком биологической опасности.
- Автоклав должен располагаться внутри лаборатории изоляции для стерилизации инфицированного материала до того, как его утилизируют в карантинном мусорном баке.
- Если есть большая вероятность того, что в воздух попадет значительное количество воздушно-капельной инфекции или спор, следует использовать

бокс биологической опасности (биологической безопасности) класса II.

2.4 Планы на случай возникновения чрезвычайных ситуаций – карантинная лаборатория

Все происшествия и инциденты, связанные с потерей или попаданием в окружающую среду экзотических организмов (включая генетически модифицированные организмы (ГМО), созданные для диагностических целей), будут незамедлительно доведены до сведения соответствующих организаций после того, как такие события выявляются (например, в течение 24 часов после обнаружения нарушения).

О нижеследующем будут незамедлительно уведомлены руководитель лаборатории или управляющий объектом:

- любое происшествие или инцидент, связанные с экзотическими организмами;
- любая потеря или попадание в окружающую среду экзотических организмов;
- любая утрата или нарушение условий изоляции;
- любой намеренный срыв работы лаборатории изоляции или подозрения о существовании такого намерения.

Необходимо устранять разливы веществ, содержащих микроорганизмы, или других биологически опасных веществ. Устранение разливов биологически опасных веществ зависит от группы риска, к которой относится материал, и от объема разлива этого материала. В целом, разливы биологически опасных веществ в изолированных помещениях – опасны в минимальной степени, а возможный объем разлива – невелик.

Следует запланировать работу по минимизации возможностей разлива. Чистящие материалы и оборудование должны храниться в соответствующих

помещениях с пометкой «Не входить» и «Биологическая опасность»; также должны иметься в наличии подходящие дезинфицирующие вещества, абсорбирующие материалы, защитная спецодежда (например, перчатки, халаты) и соответствующие контейнеры.

2.4.1 Процедуры в случае попадания беспозвоночных в окружающую среду

- Проинформируйте других пользователей, находящихся в помещении.
- Убедитесь в том, что все живые особи находятся в безопасности, перед выходом из карантинной лаборатории.
- Изолируйте зону, закрыв дверь.
- Не допускайте перемещения людей через эту зону, заперев двери, если необходимо.
- Осмотрите прилегающую зону, в которую могли попасть беспозвоночные.
- Распылите необходимое количество инсектицида, и в течение пяти минут не входите в прилегающую зону, чтобы обеспечить нейтрализацию.
- Расширьте зону осмотра, охватив близлежащие зоны, если невозможно обнаружить место нахождения беспозвоночных особей.
- Как можно скорее проинформируйте руководителя лаборатории.
- Пересмотрите процедуры и утвердите корректирующее действие по предотвращению повторного возникновения подобного инцидента.

2.4.2 Процедура после разлива материала с новыми микроорганизмами

- Проинформируйте других пользователей, находящихся в помещении.
- Наденьте защитную одежду, такую как перчатки и халаты, если она еще не надета.
- Если разлито жидкое вещество и его объем таков, что представляет опас-

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

ность распространения, ограничьте его распространение при помощи абсорбирующих материалов, таких как бумажные полотенца, поместив их на разлив.

- Используйте дезинфицирующие вещества с конечной концентрацией 1%-ного раствора гипохлорита натрия или другого доступного в продаже дезинфицирующего вещества.
- Оставьте дезинфицирующее вещество на разливе, как минимум, на 30 минут для эффективной дезинфекции до очистки пола от разлива.
- Используйте этот же дезинфицирующий раствор для протирания прилегающей зоны, которая может быть засорена.
- Переместите весь засоренный материал и дезинфицирующий раствор в систему утилизации карантинных отходов.
- Снимите защитную одежду и положите ее в пакеты для автоклавирования (или баки для карантинных отходов, если это одежда разового применения), и тщательно вымойте руки.
- Как можно скорее проинформируйте руководителя лаборатории и управляющего лабораторией.
- Пересмотрите процедуры и утвердите корректирующее действие по предотвращению повторного возникновения подобного инцидента.

2.4.3 Процедура индивидуальной санитарной обработки

- Незамедлительно наденьте (если она на вас еще не надета) или поменяйте (если необходимо) защитную одежду, такую как перчатки и халаты.
- Если одежда, кожа или волосы засорены спорами или воздушно-капельным выбросом, переоденьтесь в свежую защитную одежду и промойте засоренную кожу или волосы.
- Проинформируйте других лиц, работающих в этой же зоне, о необходимости принятия защитных мер.

- Примите меры для предотвращения дальнейшего высвобождения спор или воздушно-капельного выброса и очистите зону.
- Поместите защитную одежду и засоренную верхнюю личную одежду индивидуального использования и обувь в отдельные пакеты для надлежащей безопасной очистки (может потребоваться провести автоклавирование до их стирки).
- Уведомите о происшествии руководителя лаборатории.

2.4.4 Процедура в случае пожара

- Лаборатория должна быть оснащена системой пожарной сигнализации.
- Используйте огнетушитель, если это безопасно.
- Незамедлительно следуйте пожарной процедуре и процедуре аварийной эвакуации.

2.4.5 Процедура по предотвращению кражи и намеренного срыва функционирования помещения изоляции

- Не разрешается несанкционированное удаление жизнеспособных экзотических организмов.
- Доступ в помещения для изоляции будут иметь только пользователи, имеющие разрешение.
- В нерабочее время лаборатории изоляции запираются на ключ.

2.5 Гигиена

Повседневная очистка столов, полов и лабораторного оборудования позволит сохранять высокую степень чистоты в помещениях.

Оборудование для очистки, используемое в карантинной лаборатории, должно быть использовано только для этой цели и должно оставаться в этом помещении.

- **Влажная уборка:** Для очистки полов проводится влажная уборка раствором на основе моющего средства. Ведро должно быть оснащено отжимом. Такое оборудование должно использоваться только для уборки в изоляционном помещении и храниться в нем.
- **Сухая уборка:** Для сухой очистки, если таковая применяется, используется швабра, удерживающая пыль.
- **Чистка пылесосом:** Не использовать пылесос.
- **Подметание:** Метлы не используются, поскольку они создают взвешенную пыль, что может увеличить загрязнение в лаборатории.

2.6 Референтные коллекции

Референтные коллекции, в которых вредные организмы сохраняются и хранятся в течение длительного времени для дальнейшего использования в качестве референтных материалов, являются бесценным ресурсом в диагностическом процессе. Референтная коллекция должна быть создана в конструктивно прочном капитальном здании с цельными стенами, крышей, полом, потолком и дверью. Не должно быть окон или световых люков в крыше, так как солнечный свет может повредить образцы. Референтная коллекция требует защиты от атмосферных условий, таких как влажность и вредные организмы, которые способны разрушить образцы, и следующие условия являются желательными.

Рекомендуемая температура:

- 18-19°C для энтомологических коллекций и гербария;
- -80°C для заморозки экстрактов ДНК, живых культур и зараженного растительного материала, которые используются в качестве положительного контроля.

Рекомендуемая относительная влажность:

- ниже 50% (для энтомологических коллекций и фитопатологических коллекций).

Отсутствие эффекта вибрации.

Смотрите Главу 8, посвященную референтным коллекциям, для получения более подробного описания технических условий.

2.7 Лабораторные службы

- Надлежащее водоснабжение имеет важное значение, и может потребоваться система очистки, если источник воды может быть засорен. Лаборатории также потребуются наличие воды, не содержащей минералы.
- Необходимо достаточное электроснабжение. Если местное электроснабжение является недостаточным или непостоянным, может понадобиться генератор. Мощность генератора будет зависеть от ожидаемой нагрузки и от того, предназначен ли он для непрерывного или периодического использования. Если все электричество, поступающее в лабораторию, производится ее собственным генератором, а часть лабораторного оборудования должна работать непрерывно, то обязательно наличие запасного генератора. Если энергоснабжение в городе непостоянно, необходима автоматическая система переключения на генератор на случай, если энергоснабжение прекращается.
- Газоснабжение необходимо для горелок Бунзена.
- Должна быть проведена надлежащая канализационная система. Если используется общественная канализационная система, система утилизации лабораторных отходов должна быть оснащена уловителем химических или биологических разливов во избежание засорения общественной системы.

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

- Должна функционировать надлежащая система утилизации карантинных отходов (например, установки для сжигания отходов); проконсультируйтесь с местными властями.
- Насекомые, грызуны и любые другие вредители не должны допускаться в лабораторную зону во избежание вторичного засорения.

2.8 Контроль параметров окружающей среды (движение воздуха, температура и влажность)

- Движение воздуха и обдув в основной диагностической лаборатории, как правило, могут быть обеспечены с помощью окон и дверей. Все окна должны быть оснащены средствами затенения от солнечного света.
- Лаборатории, в которых проводится работа с патогенами, должны быть обеспечены однонаправленным обдувом через помещение наружу для защиты персонала лаборатории в период проведения работ.
- Лабораторные функции не могут легко выполняться при экстремальных температурах (выше 30°C) и влажности. Следует также отметить, что некоторые диагностические анализы дают непредсказуемые результаты при температуре выше 28°C. Во всей лаборатории воздух должен кондиционироваться для поддержания среды, свободной от пыли, и температуры окружающей среды 22-25°C. Повторное пропускание воздуха через систему кондиционирования не подходит для микробиологических лабораторий из-за возможной рециркуляции патогенных микроорганизмов.
- Не следует использовать вентиляторы во избежание рассеивания микроорганизмов.

2.9 Стандартные методы работы

- Доступ в помещение имеет только определенный персонал.
- Сотрудники лаборатории должны информировать технический и обслуживающий персонал об особой микробиологической или другой опасности в лаборатории.
- Двери в помещении должны быть всегда закрыты.
- Лаборатории изоляции также запираются на ключ в нерабочее время.
- Пользователи, которым разрешен доступ, получают инструкции по процедурам и требованиям изоляции, а также обучаются работе с экзотическими организмами. Все пользователи, которым разрешен доступ, ежегодно проходят курсы повышения квалификации.
- Выращивание экзотических организмов должно осуществляться в отдельном помещении в условиях изоляции.
- В помещении для изоляции следует все время носить лабораторные халаты и закрытую обувь. Лабораторные халаты следует снимать при выходе из лаборатории и оставлять на предоставленных вешалках.
- В лабораториях не разрешается пить, принимать пищу или курить.
- При выходе из лаборатории сотрудники лаборатории должны всегда мыть руки.

2.10 Лабораторное оборудование

Оборудование, необходимое для лаборатории, зависит от функций, объема работы, типа образцов, бюджета и т.д. Перечни оборудования, приведенные ниже, даны только в качестве руководства и не являются исчерпывающими. Кроме того, одно и то же оборудование может быть использовано в различных целях по разным диагностическим направлениям.

2.10.1 Морфологическая идентификация

2.10.1.1 Энтомология

Для идентификации насекомых лаборатории требуются:

- биологический микроскоп, оснащенный объективом (масляно-иммерсионным) с 5-, 20-, 40-, а также 60- и 100-кратным увеличением и со встроенной шкалой на одном окуляре для проведения измерений;
- препаровальный микроскоп (предпочтительно 2-3 штуки в зависимости от количества пользователей) с 50-кратным увеличением и встроенной шкалой на одном окуляре для проведения измерений;
- холодильник с морозильной камерой для хранения материалов и умерщвления насекомых;
- книжная полка для хранения пособий, методических инструкций и научных работ;
- компьютер с доступом в Интернет для поиска информации, доступа к библиотеке изображений и электронной почте.

2.10.1.2 Бактериология, микология и нематология

Для идентификации бактерий, грибов и нематод лаборатории требуются:

- препаровальный микроскоп для исследования образцов растений на выявление грибных структур и для выделения нематод, со встроенной шкалой на одном окуляре для проведения измерений;
- биологический микроскоп, оснащенный линзами объектива (масляно-иммерсионными) с 10-, 20-, 40- и 100-кратным увеличением, со встроенной шкалой на одном окуляре для проведения измерений;
- камера ламинарного потока для разливания сред и выделения из растительных тканей;

- холодильник с морозильной камерой для хранения сред в бутылках, а также чашек Петри со средами;
- рекомендуются электронные весы с точностью до 0,1 г и 0,001 г;
- водяной термостат;
- измеритель pH;
- автоклавы: один – для стерилизации, другой – для дезинфекции;
- сушильный шкаф для стерилизации стеклянной лабораторной посуды;
- большие рабочие столы для работы с образцами, микроскопического исследования и поддержания культур;
- книжная полка для хранения пособий, методических инструкций и научных работ.

2.10.1.3 Вирусология

Для идентификации вирусов лаборатории требуются:

- вытяжной шкаф (если проводится очистка вирусов);
- холодильник и морозильные камеры (-20°C; -80°C для хранения растительной ткани);
- измеритель pH;
- магнитная мешалка и нагревательная плитка;
- электронные весы для взвешивания химических веществ (с точностью до 0,001 г);
- настольная центрифуга;
- пипетки (1000 мкл, 200 мкл) и наконечники без фильтров;
- изделия из стекла, такие как мерные колбы, мерные цилиндры, баллоны для хранения (50 мкл, 100 мкл, 250 мкл, 500 мкл и 1000 мкл);
- системы очистки или дистилляции воды;
- автоклав (для стерилизации);
- льдогенератор;
- оборудование для измельчения: измельчитель для ELISA, или ступка и пестик, или полиэтиленовый пакет и валик;

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

- сушильный шкаф для сушки стеклянной лабораторной посуды (необязательно);
- пробирки для микроцентрифуги (1,5 мл или 2 мл);
- стелажы или шкафы для химических веществ;
- шкафы для хранения химических веществ: один для легковоспламеняющихся и один – для коррозионных растворов;
- лабораторный халат, перчатки, маски и очки;
- мусорные баки (карантинные и некарантинные);
- бумажные и дезинфицирующие салфетки;
- трансмиссионный электронный микроскоп с камерой;
- пинцеты и сеточки (гриды);
- красители (уранилацетат или фосфорновольфрамовая кислота);
- высоко- и ультра-высокоскоростные центрифуги (необязательно, только для очистки вирусов);
- охлаждаемая настольная центрифуга;
- пластиковые принадлежности для центрифуги.

2.10.1.4 Иммунологический анализ

Для проведения иммунологического анализа лаборатории требуется:

- холодильник и морозильные камеры (-20°C и -80°C);
- измеритель pH;
- магнитная мешалка и нагревательная плитка;
- электронные весы для взвешивания химических веществ (с точностью до 0,001 г);
- настольная центрифуга;
- пипетки (1000 μ л, 200 μ л, 20 μ л, 10 μ л) и наконечники без фильтров;
- изделия из стекла, такие как мерные колбы, мерные цилиндры, баллоны для хранения (50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл и 1000 мл);

- контейнер с жидким азотом и изотермические перчатки (необязательно; полезны для измельчения очень твердой ткани);
- система очистки или дистилляции воды;
- автоклавы: один – для стерилизации и один – для дезинфекции;
- льдогенератор;
- оборудование для измельчения: измельчитель для ELISA, или ступка и пестик, или полиэтиленовый пакет и валик;
- сушильный шкаф для сушки стеклянной лабораторной посуды (необязательно);
- пробирки для микроцентрифуги (1,5 мл или 2 мл);
- вортекс-миксер (необязательно);
- стелажы или шкафы для химических веществ;
- 2 шкафа для хранения химических веществ: один для легковоспламеняющихся и один – для коррозионных растворов;
- лабораторный халат, перчатки, маски и очки;
- мусорные баки (карантинные и некарантинные);
- бумажные и дезинфицирующие салфетки;
- инкубатор (необязательно, зависит от температуры, при которой необходимо проводить инкубирование для ELISA);
- планшетный ридер для ELISA;
- устройство для мойки планшетов для ELISA или мягкие бутылки.

2.10.1.5 Молекулярный анализ

Для проведения молекулярного анализа лаборатории требуются:

- вытяжной шкаф (может не понадобиться, если используется коммерческая тест-система для выделения);
- холодильник и морозильные камеры (-20°C; -80°C для хранения нуклеиновых кислот и отдельных частей тест-системы для клонирования);

- измеритель pH;
- магнитная мешалка и нагревательная плитка;
- электронные весы для взвешивания химических веществ (с точностью до 0,001 г);
- настольная центрифуга;
- пипетки (1000 μ л, 200 μ л, 20 μ л, 10 μ л) и наконечники с фильтром; пипетки и наконечники, специально предназначенные для реактивов ПЦР и введения нуклеиновых кислот;
- изделия из стекла, такие как мерные колбы, мерные цилиндры, баллоны для хранения (50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл и 1000 мл);
- контейнер с жидким азотом и изо-термические перчатки (необязательно; полезны для измельчения очень твердой ткани);
- системы очистки или дистилляции воды;
- автоклавы: один – для стерилизации, один – для дезинфекции;
- льдогенератор;
- оборудование для измельчения: например, ступка и пестик или полиэтиленовый пакет и валик;
- сушильный шкаф для сушки стеклянной лабораторной посуды (необязательно);
- пробирки для микроцентрифуги (1,5 мл или 2 мл);
- вортекс-миксер (необязательно);
- стелажы или шкафы для химических веществ
- 2 шкафа для хранения химических веществ: один для легковоспламеняющихся и другой – для коррозионных растворов;
- лабораторный халат, перчатки, маски и очки;
- мусорные баки (карантинные и некарантинные);
- бумажные и дезинфицирующие салфетки;
- сухие нагревательные блоки (не менее 2-х, установленные на разные температурные режимы);
- микроволновая печь;

- спектрофотометр (достаточно чувствительный для считывания количества и качества нуклеиновых кислот);
- прибор для проведения ПЦР (традиционной и в реальном времени);
- аппарат для гелевого электрофореза;
- прибор для УФ-просвечивания или бокс с кварцевой лампой (безопаснее ультрафиолетового излучения);
- водяной термостат (для клонирования);
- инкубатор-счетчик (для клонирования);
- бокс биологической безопасности класса II (для клонирования).

2.11 Техника безопасности

Безопасность персонала лаборатории должна быть в числе главных приоритетов при ее создании. Безопасность работы в лаборатории зависит от выполнения основных мер безопасности и надлежащего обучения персонала как правилам безопасности, так и правильным методам работы. Лаборатория должна располагать письменным документом по технике безопасности, которую всегда должны соблюдать.

2.11.1 Общие принципы безопасности

- Должна иметься аптечка первой помощи, и не менее двух или трех штатных сотрудников должны пройти подготовку по оказанию первой помощи и постоянно присутствовать в лаборатории в рабочее время.
- Только сотрудники лаборатории и уполномоченные пользователи должны иметь разрешение входить в рабочую зону лаборатории.
- Сотрудники лаборатории должны носить защитную одежду, которую следует снимать при выходе из лаборатории. Ее не следует носить во вспомогательных зонах лаборатории, таких как офисы штатных сотрудников.
- Следует носить закрытую обувь. Обувь с открытым носком не подходит для ношения в лаборатории.

2. Материальная инфраструктура фитосанитарной диагностической лаборатории

- Должны иметься перчатки, очки и маски; их следует носить при работе с опасными материалами и при работе в молекулярной лаборатории.
- Перчатки и маски не предназначены для повторного использования и должны быть утилизированы с лабораторными отходами.
- Весь засоренный материал (например, стеклянная лабораторная посуда) следует дезинфицировать перед мытьем.
- Должны иметься соответствующие контейнеры (контейнер для утилизации острых предметов, пластиковые пакеты, дезинфицирующие контейнеры) и дезинфицирующее средство.
- Должно быть отведено место для промывания глаз и аварийного душа.
- В лаборатории должно быть запрещено принимать пищу, пить и курить.
- Столы должны очищаться и дезинфицироваться после каждого использования.
- Лабораторный персонал должен мыть руки перед выходом из лаборатории (даже если используются перчатки во время работы).

Все разливы и другие происшествия должны быть доведены до сведения управляющего лабораторией.

2.12 Утилизация карантинных отходов

2.12.1 Микроорганизмы

Микроорганизмы (например, бактерии, грибы, вирусы, вириды, фитоплазмы) в части, касающейся утилизации, классифицируются как инфекционный материал. Они должны быть собраны в прочный полиэтиленовый пакет с символом биологической опасности и стерилизованы паром под давлением (т.е. автоклавированы) в прочном контейнере.

После автоклавирования горловина пакета скручивается, перевязывается лен-

той и помещается в пакет из долговечного пластика. Когда этот пакет будет считаться заполненным (не допускайте перегрузки пакета, чтобы его было легко перемещать), его горловина скручивается, перевязывается клейкой лентой, складывается пополам и вновь перевязывается лентой («лебединая шея»). Пакет помещается в твердый, запираемый мусорный бак с внутренним мешком для карантинных отходов и перемещается в место обработки карантинных отходов для утилизации.

Примечание: это относится к химическим и медицинским, а также карантинным отходам. Использование услуг зарегистрированной компании, занимающейся утилизацией отходов, не требует получения разрешения на перемещение отходов.

2.12.2 Растительный материал

Растительный материал для утилизации должен содержаться в прочном пластиковом пакете с символом биологической опасности. Горловина пакета должна быть скручена, перевязана клейкой лентой, сложена вдвое и перевязана вновь («лебединая шея»). Этот пакет помещается в пакет из долговечного пластика. Горловина этого второго пакета вновь скручивается, перевязывается клейкой лентой, складывается вдвое и вновь перевязывается, а затем отходы в двойном пакете помещаются в твердый, запираемый мусорный бак с внутренним мешком для карантинных отходов. Когда бак заполнится отходами в двойных пакетах, внутренний мешок перевязывается таким же образом. Запертый бак перемещается в место обработки карантинных отходов для утилизации.

2.12.3 Клеточные линии и т.д.

Клеточные линии, бактериальные векторы, материал, полученный из клеточных линий, среды и другие водные растворы, которые вступают в контакт с

бактериальными векторами или клеточными линиями, для утилизации обрабатываются аналогичным способом.

Все отходы, содержащие ГМО, будут классифицированы как инфекционный материал, и должны быть утилизированы в безопасном режиме. Могут применяться следующие протоколы:

- **Жидкости** автоклавировуются или стерилизуются химическим способом. Так как для ослабления растворов путем автоклавирования требуется разное количество времени, может быть предпочтительно провести химическую стерилизацию растворов, а не автоклавировать их.
- **Стеклянная лабораторная посуда** стерилизуется химическим способом, если она была засорена ГМО или микроорганизмами. В противном случае она промывается обычным способом с использованием лабораторного моющего средства, а затем автоклавировается перед использованием (если требуется).
- **Шприцы, иглы, стеклянные пипетки Пастера и лезвия бритвы должны** пройти высокотемпературную термическую обработку или стерилизацию паром посредством утилизации медицинских отходов. Эти отходы должны быть помещены в разрешенную к применению посуду из твердого пластика, которая после

заполнения должна быть герметизирована и перемещена в место обработки карантинных отходов для утилизации.

- **Пластиковые лабораторные принадлежности** (пластиковые чашки, пробирки, наконечники для пипеток и флаконы), перчатки, чашки с агаровой средой и засоренные салфетки, агарозные гели, содержащие рекомбинантную ДНК, и твердые одноразовые пластиковые пипетки должны пройти высокотемпературную термическую обработку или стерилизацию паром посредством утилизации медицинских отходов.

Отходы должны быть помещены в небольшие полиэтиленовые пакеты, которые перед выносом из лаборатории или места, в котором они складывались, надежно перевязываются.

Эти пластиковые пакеты помещаются в большой полиэтиленовый пакет, помеченный символом «биологическая опасность». Когда этот пакет заполнится, его горловина должна быть скручена, перевязана клейкой лентой, согнута пополам и перевязана вновь («лебединая шея»). Этот пакет помещается в твердый, запираемый мусорный бак с внутренним мешком для карантинных отходов и перемещается в место обработки карантинных отходов для утилизации.

3. Нематериальная инфраструктура

Введение

Нематериальная инфраструктура относится ко всем службам обеспечения, необходимым для функционирования диагностической лаборатории. Она в виде стандартных операционных процедур (СОП) и системы управления данными направляет формирование диагностической лаборатории. Это наиболее важный элемент для создания в лаборатории продуктивной, инновационной среды, свободной от риска.

3.1 Система качества

3.1.1 Важность системы качества

Существует несколько факторов, которые могут побудить организацию начать применять систему качества; это такие факторы как:

- требования соответствовать ожиданиям клиента;
- требования органа регулирования;
- спрос на внутреннем и внешнем рынках специализированных товаров;
- выявление критических элементов и управление ими (управление риском) для ускорения роста бизнеса.

Ключевые элементы системы управления качеством – это люди, процессы и информация (рис. 5). Взаимодействие между этими элементами создает хорошо организованную систему управления качеством для удовлетворения потребностей клиентов и, тем самым, для достижения задач по обеспечению качества в организации.

Разработка системы управления качеством и управление этой системой требуют затрат на большее количество персонала, оборудования, помещений, на методы осуществления деятельности и, наконец, на обучение персонала,

необходимое для адаптации к новым требованиям по обеспечению качества. Однако польза от внедрения системы управления качеством превосходит затраты. Применение системы управления качеством имеет следующие преимущества:

- обеспечение большей согласованности и надежности процессов, используемых для производства услуг и продуктов;
- выполнение требований органов регулирования работы с клиентами и т.д.
- обеспечение удовлетворенности клиентов путем эффективного применения системы, включая процессы для постоянного улучшения и предотвращения возникновения случаев несоответствия;
- усовершенствование деятельности посредством применения системы управления качеством;
- повышение эффективности и продуктивности проведения анализов и повышение доверия к результатам и продуктам на национальном и международном уровнях;
- сохранение высокого уровня оказания услуг в постоянно меняющихся, технологически сложных и динамических условиях;
- обеспечение лучшей отслеживаемости документации, референтных материалов и т.д.
- создание единообразных и усовершенствованных программ обучения и введения в специальность для персонала посредством подробного ознакомления с системой;
- применение технически валидированных методов, которые оцениваются техническими экспертами на практике.

3. Нематериальная инфраструктура

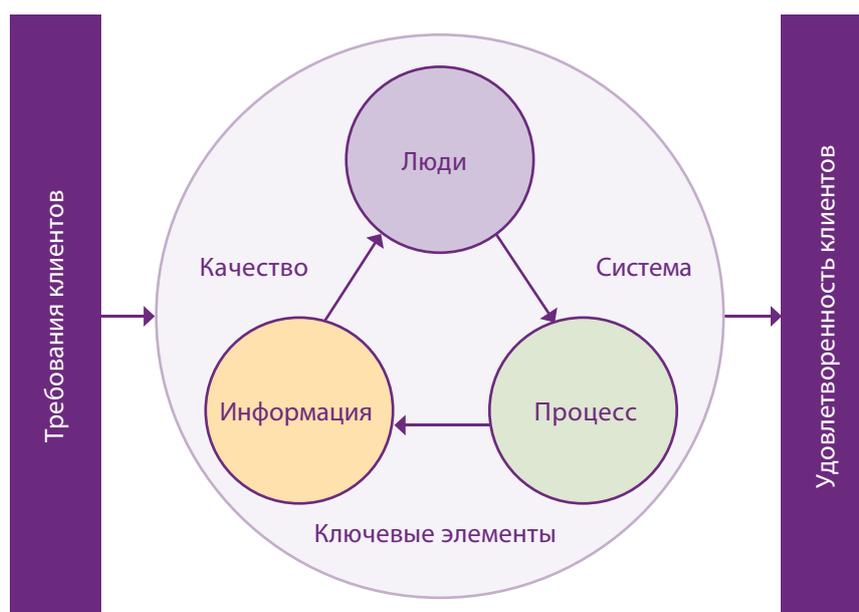


Рисунок 5. Ключевые элементы системы качества

Когда система управления качеством организации прошла сертификацию, этим официальным признанием утверждается техническая компетентность организации после оценки процессов, ресурсов, помещений, персонала и других ключевых факторов, относящихся к качеству оказываемых диагностических услуг или влияющих на него.

Более того, весь потенциал системы управления качеством станет очевидным, когда организация столкнется с неожиданной проблемой разрешения непредвиденной ситуации, например, когда потребуются проведение анализа в случае возникновения очага новой болезни или принятие ответных мер в отношении, например, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (бактериальный рак киви) или первичного очага плодовой мухи, и в условиях быстро развивающихся ситуаций в лабораторию поступают тысячи образцов. Эта вышеописанная ситуация может быть легко разрешена при помощи налаженного и успешного процесса проведения лабораторных анализов, подкрепленного системами документирования анализов, регистрации данных и отслеживаемости образцов, а также обучения нового персонала.

Системный подход к повседневной деятельности освобождает руководство от необходимости вмешиваться в процесс, тем самым дает ему возможность сосредоточиться на вопросах, требующих инициативы, внесения изменений или совершенствования. Другими словами, системы управления качеством могут оптимизировать 80% нашей работы и устранить необходимость применять инициативу при принятии каждого решения. В таком случае освободившееся время может быть использовано для оставшихся 20% деятельности, когда необходимо решать реальные проблемы и определять и внедрять реальные усовершенствования.

3.1.2 Структура системы качества

При создании системы качества необходимо принять во внимание два важнейших вида требований: общие требования к системе управления качеством (СУК) и технические требования. Требования к управлению относятся, главным образом, к функционированию и эффективности системы управления качеством, используемой в лаборатории или компании. Технические требования предъявляются к компетентности персо-

нала, к методологии, оборудованию для калибровки и проведения анализов, а также к методам проведения анализов.

3.1.3 Система управления качеством

3.1.3.1 Общие требования

Если организация желает разработать систему управления качеством в соответствии с общими требованиями к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий (ИСО/МЭК 17025) или любыми другими стандартами ИСО, международный стандарт рекомендует тщательно ознакомиться со всеми требованиями стандарта. Международный стандарт также рекомендует «процессный подход» к разработке и применению системы управления качеством, который позволяет контролировать взаимодействие между отдельными процессами и их взаимосвязь в рамках общих системных процессов. Для успешного функционирования организация должна создать, документировать, применять, поддерживать и постоянно улучшать СУК посредством:

- четкого определения действий или процессов для СУК и управления ими (рис. 6);

- документирования определенных процессов;
- понимания последовательностей этих процессов или взаимодействия между ними и описания того, как результаты одного процесса служат исходным компонентом для другого процесса;
- определения критериев для обеспечения эффективного функционирования процессов и их контроля (например, критерии оценки образца до его принятия для проведения анализа, ключевые показатели качества работы оборудования для получения желаемых результатов);
- планирования в целях управления процессами, проводимыми сторонними специалистами, которые способны повлиять на запланированные результаты, и осуществление контроля за этими процессами;
- разработки специальных методов, необходимых для функционирования и контроля каждого процесса, задействованного в СУК – в виде рабочих инструкций, руководств, технологических карт и т.д.



Рисунок 6. Руководство по основным процессам в диагностической лаборатории

3. Нематериальная инфраструктура

- обеспечения наличия ресурсов и информации, необходимых для поддержания функционирования и контроля этих процессов – ресурсы включают в себя помещение, оборудование, персонал, химические вещества, реактивы (рис. 7); информация включает в себя ведомости учета работы, рабочие инструкции, графики.
- контроль, измерение и анализ этих процессов для отслеживания результативности СУК путем проведения внутренних аудитов;
- принятие мер, необходимых для достижения требуемых результатов и постоянного улучшения этих процессов.



Рисунок 7. Руководство по определению вспомогательных процессов, необходимых в диагностической лаборатории

3.1.3.2 Требования к документации

Разработка документов организации по СУК зависит от ее размера, видов деятельности, которую она осуществляет, и сложности ее деятельности. СУК должна включать в себя:

- политику обеспечения качества и формулировку целей в области качества;
- руководство по обеспечению качества, подробно описывающее функционирование СУК;
- документированные процедуры, как минимум, для следующих шести сфер³:
 - контроль документов;
 - контроль карточек учета показателей качества;
 - внутренний аудит;
 - контроль несоответствия;
 - корректирующие действия;
 - предупредительные действия;
- другие документированные процедуры в соответствии с требованиями организации для демонстрации эффективности применения СУК;

³ Процедуры для некоторых видов деятельности можно объединить в единую документированную процедуру (например, корректирующее действие и превентивное действие) или можно документировать определенный вид деятельности, используя более одной документированной процедуры (например, внутренние аудиты).

- документированная процедура организации делопроизводства; документы могут быть как в бумажном, так и в электронном формате. Эта процедура подробно описывает, как идентифицируются, хранятся, контролируются, содержатся, уничтожаются и изменяются карточки учета показателей качества.

Важно, чтобы все документы и учетные записи, являющиеся частью СУК, контролировались надлежащим образом.

3.1.3.3 Контроль документов

Документ – это информация, записанная на бумажном или электронном носителе. В документе могут быть указаны требования (например, чертеж или техническая спецификация), даны рекомендации/инструкции (например, план обеспечения качества) или показаны результаты или свидетельства проведения работ (например, учетные данные).

Все документы, которые относятся к процессам СУК, должны подвергаться контролю. Организация должна иметь собственную документированную процедуру как для бумажных, так и для электронных документов, охватывающую следующее:

- Как составляется (стиль, образец и т.д.) и пересматривается документ: документы также должны быть легко идентифицируемы по цели и сфере применения.
- Как и кем утверждаются документы: использоваться могут только утвержденные документы.
- Как документы издаются или делаются доступными для пользования: если вы решили хранить определенные документы в различных местах, применяйте какой-либо метод документооборота, чтобы все пользователи применяли последнюю версию документа.

- Как проводится пересмотр и обновление документов: периодически проводите оценку необходимости проведения пересмотра или обновления документов по СУК. Если в документы вносятся изменения, они должны вновь пройти утверждение в целях соответствия требованиям.
- Как указывается информация о проведении пересмотра на самом документе: укажите изменения, внесенные в документ, чтобы пользователи точно знали, какие конкретно изменения были внесены.
- Как обеспечивается удобочитаемость документа и возможность его восстановления: регулярно проверяйте состояние часто используемых копий документов для определения необходимости их замены.
- Как содержатся и хранятся документы: устаревшие документы могут явиться причиной множества проблем, если не проводить их контроль. Если используется электронная версия документа – убедитесь в том, что на рабочих местах доступна последняя версия документа в режиме «только для чтения». Устаревшие документы должны быть незамедлительно удалены. Если используется бумажная версия документов – удалите устаревшие документы через систему документооборота.
- Как документы заносятся в архив: убедитесь в том, что все подобные документы должным образом идентифицированы, снабжены указателями и систематизированы. Желательно ограничить или контролировать доступ к этим документам.
- Индексный указатель всех текущих документов, даты их издания и внесения изменений.

Примечание: выявление несоответствий процессу контроля документов – один из самых частых результатов аудита.

3. Нематериальная инфраструктура

3.1.3.4 Руководство по написанию документов

При написании:

- придерживайтесь простого, практичного и гибкого стиля;
- давайте «ровно столько информации, сколько нужно» и не более того;
- пишите на доступном языке, который понимает и использует ваш персонал;
- используйте блок-схемы или рисунки, в случае необходимости;
- добивайтесь ясности и максимальной краткости каждого документа;
- пишите документ (будь то процедура, формуляры, ведомости и т.д.), только если это необходимо.

3.1.3.5 Контроль качества учетов качества

Учетная запись представляет собой специальный документ, в котором приводятся свидетельства достигнутых результатов или проведенной работы, ведомости учета проведения анализов, данные о калибровке, учебные ведомости и т.д.

- Обеспечьте наличие документированной процедуры по контролю карточек учета показателей качества, указав уполномоченный орган, способ идентификации, хранения, защиты, восстановления и уничтожения карточек. Эта информация должна быть определена для карточек, которые хранятся в бумажном или электронном виде.
- Обеспечьте разборчивость, возможность легкой идентификации и восстанавливаемость записей.
- Обеспечьте, чтобы несанкционированное внесение изменений в карточки не допускалось, и чтобы изменения регистрировались и датировались. Исходная информация по-прежнему должна быть видимой.

- Обеспечьте хранение карточек надлежащим образом, чтобы минимизировать ущерб, повреждение или потерю.
- Обеспечьте хранение карточек в упорядоченном виде, чтобы облегчить их поиск (составление указателей и систематизация бумажных или электронных карточек).
- Ведите список всех различных категорий карточек и установите период хранения для каждой категории (досмотр и анализ, продажи и закупки, анализ системы управления, калибровка, обучение и т.д.). Период хранения зависит от заказчика, нормативно-правовых отраслевых или организационных требований и политики.
- Уничтожение карточек проводится по окончании установленного периода хранения. Уничтожение карточек может осуществляться путем сжигания или измельчения, после чего карточки не подлежат восстановлению, или путем хранения в защищенном архиве, расположенном в лаборатории или за ее пределами, в течение неограниченного периода времени.

3.2 Обязанности руководства

3.2.1 Политика и задачи в области качества

Политика и задачи в области качества значимы для достижения целей и ожиданий организации, а также для удовлетворения потребностей клиентов организации. В этом заявлении о принципах проводимой политики должно быть указано, на чем сосредоточены усилия по обеспечению качества. Таким образом, оно должно:

- быть актуальным и соответствовать деятельности организации и услугам, которые она оказывает своим клиентам;
- быть основано на ценностях организации, ее видении, миссии и применяемой бизнес-стратегии;

- не противоречить закону и соответствующим национальным и международным стандартам;
- обеспечивать основу для установления и пересмотра задач в области качества;
- быть разработанной высшим руководством или полностью поддерживаться им;
- постоянно пересматриваться через определенные промежутки времени (например, ежегодно) на заседаниях высшего руководства в целях обеспечения соответствия политики и задач бизнес-целям;
- обеспечивать осведомленность всех тех, кто участвует в разработке, применении и поддержании системы качества.

Примечание: Политика является динамичным документом и должна меняться по мере изменения потребностей организации, направлений и изменения деловой активности.

Ставьте задачи в области качества, исходя из политики организации в области качества, чтобы обеспечить выполнение обязательств, взятых на себя организацией в политике в области качества. Задачи затем документируются и пересматриваются высшим руководством. Эти задачи должны быть:

- значимыми;
- измеримыми (то, чего вы хотите достичь, и как вы это измеряете);
- распределены с указанием ответственности за установление, достижение, результаты выполнения и мониторинг.

Высшее руководство должно определить планы действий, которые необходимы для выполнения этих задач. Они должны продемонстрировать свою приверженность постоянному улучшению, а затем документировать задачи для уведомления всех тех, кто вовлечен в СУК.

3.2.2 Руководство по качеству

Руководство по качеству демонстрирует и документирует приверженность организации к поддержанию высокого уровня качества и оказания услуг. Организация должна разработать и поддерживать руководство по качеству. Руководство по качеству описывает систему управления качеством и указывает, как она должна функционировать. Оно должно содержать:

- сферу применения СУК с подробной информацией о каких-либо исключениях, заявленных организацией;
- документированные процедуры, разработанные для СУК, для управления компанией (процедуры, принципы деятельности, формы, ведомости и т.д. или ссылки на такие документированные процедуры);
- описание взаимодействия между процессами СУК.

Руководство по качеству может быть объединено с другими руководствами по системам управления (бизнес-руководствами), но рекомендуется, чтобы оно было простым и отдельным от бизнес-руководств. Одно руководство может быть достаточным для потребностей небольшой компании, в то время как крупной организации может потребоваться несколько руководств.

Рекомендуется обратиться к третьей стороне с просьбой проанализировать СУК и руководство по качеству перед подачей заявления на сертификацию.

3.2.3 Ответственность и полномочия руководства

Высшее руководство организации должно определить бизнес-функции и их взаимосвязи в рамках организации, в том числе обязанности и полномочия:

- Кто несет полную ответственность за управление организацией или компанией?

3. Нематериальная инфраструктура

- Кто несет полную ответственность за обеспечение того, что СУК поддерживается и совершенствуется, а также за то, что системные проблемы своевременно решаются?
- Кто несет ответственность за поддержание уровня качества и применение СУК в команде или группе?
- Кто несет ответственность за техническое функционирование компании, и кто является заместителями ответственных лиц, выполняющими эти функции в их отсутствие?
- Кто несет ответственность за развитие, поддержание, контроль, отчетность и содействие постоянному управлению системами качества с помощью руководств, обучения, работы в команде и оказания помощи?

Важная роль высшего руководства заключается в назначении члена руководящего состава уполномоченным по качеству, который обладает достаточными полномочиями для эффективного выполнения обязанностей по СУК. Назначаемый предпочтительно должен быть членом высшего руководства, но это условие не является обязательным.

Высшему руководству, возможно, придется доказать факт назначения уполномоченного по качеству путем объявления о назначении, посещения заседаний по пересмотру СУК и предоставления поддержки, полномочий и ресурсов для деятельности по СУК. Уполномоченный представитель может быть штатным сотрудником или нанят по договору подряда.

3.2.3.1 Роль уполномоченного по качеству

- Контакттировать и взаимодействовать с людьми, как внутри, так и за пределами организации, назначать, уполномочивать и контролировать их, а также готовить отчеты.

- Помогать владельцам процессов в разработке процессов и применении соответствующих стандартных требований.
- Отчитываться перед высшим руководством о результатах применения СУК на совещаниях по пересмотру системы управления и других совещаниях.

Организация должна обеспечить определение и документирование обязанностей, полномочий и взаимодействия персонала, который занимается управлением, выполнением и проверкой работы, которая влияет на качество. Эти обязанности должны быть доведены до сведения персонала в целях обеспечения эффективного управления качеством.

Структура, место и роль персонала в рамках организации могут быть представлены в виде организационной схемы.

3.2.4 Пересмотр системы управления

Пересмотры системы управления – это процессы внутреннего контроля, осуществляемого высшим руководством, которое проводит пересмотр СУК организации с целью обеспечения ее постоянной стабильности и эффективности, и вносит все необходимые изменения или улучшения, включая изменения в политику и задачи в области качества организации. Схема процесса показана на рис. 8.

3.2.4.1 Уполномоченный по качеству

Уполномоченный по качеству отчитывается о результатах применения СУК перед высшим руководством на совещаниях по пересмотру системы управления. Информация для отчета основывается на результатах измерений и мониторинга (например, внутренний аудит и отзывы клиентов). Эта информация составляется из всех данных, предоставляемых владельцами процессов.



Рисунок 8. Схема процесса пересмотра системы управления

3.2.4.2 Исходные данные для пересмотра

Исходные данные для пересмотра системы управления включают в себя, но не ограничиваются текущими результатами деятельности и возможностями улучшения.

3.2.4.3 Результаты пересмотра

Результаты пересмотра системы управления включают в себя, но не ограничиваются решениями и действиями.

3.3 Управление ресурсами

Высшее руководство несет ответственность за обеспечение ресурсами для разработки и поддержания СУК организации. Важно иметь достаточно ресурсов для выполнения требований клиентов, в противном случае существует вероятность возникновения несоответствий (т.е. несоблюдение процедурных требований) в результате недостаточного или неправильного использования ресурсов. Например, необходимо проверить наличие достаточных кадровых, материальных ресурсов и оборудования

для обеспечения своевременного оказания услуг, проведения анализов, производства и поставки продуктов.

Ресурсы могут включать в себя:

- людей;
- оборудование;
- реактивы и материалы;
- информацию (это могут быть процедуры или рабочие инструкции);
- помещения;
- рабочие условия;
- финансы.

Полезно начать с определения характера потребностей в ресурсах для каждого процесса и определить наличие ресурсов на этапе бизнес-планирования. Фактический объем необходимых ресурсов может меняться ежедневно и на протяжении более длительных периодов времени, поэтому высшее руководство должно регулярно проводить пересмотр результатов СУК.

Подумайте о разработке показателей эффективности деятельности для каждой из основных категорий используемых ресурсов, таких как техника и

3. Нематериальная инфраструктура

оборудование, кадровые ресурсы, помещения и условия, транспорт и системы связи, для определения эффективности использования этих ресурсов.

3.3.1 Кадровые ресурсы

Квалифицированный персонал требуется для производства продуктов, проведения анализов и оказания услуг в соответствии с документацией на продукт или с требованием к услуге. Персонал должен быть компетентен и иметь соответствующее образование, подготовку, навыки и опыт.

Высшее руководство при планировании потребностей в ресурсах должно обеспечить:

- определение критериев компетентности, оценку навыков и определение потребности в обучении персонала, работающего в каждом процессе, который влияет на качество продукта или услуги;
- разработку требований к обучению отдельных сотрудников как части ежегодного процесса планирования и оценку эффективности этого обучения при пересмотре результатов деятельности; полезно иметь учебную таблицу, в которой указывается компетентность сотрудника и обучение, которое он прошел, и которая используется и для планирования в будущем;
- понимание персоналом своих функций и обязанностей в проведении работы. Это будет указано в должностных обязанностях сотрудника и плане выполнения работы;
- понимание персоналом требований к качеству, относящихся к их сфере деятельности – содействовать повышению осведомленности о методах обеспечения качества путем проведения групповых обсуждений и участия в процессе планирования обеспечения качества;

- разработку ведомостей по введению в специальность и оценке компетентности;
- определение того, какие данные должны быть сохранены касательно образования, профессиональной подготовки, навыков и опыта – эти данные должны продемонстрировать эффективную работу персонала, работающего в СУК, например, в папке с информацией об обучении;
- создание процедуры для описания процесса введения в специальность, обязательного для всех новых сотрудников, управление внутренними и внешними обучающими курсами и поддержание данных об обучении персонала и способах оценки навыков и профессиональной подготовки для обеспечения того, что все сотрудники проходят обучение в соответствии с требованиями, и что только должным образом обученный персонал или персонал под надлежащим контролем осуществляет выполнение работ.

Пример: все сотрудники могут получить папку с информацией об обучении в течение их вводного инструктажа; эта папка:

- маркирована ФИО сотрудника;
- разделена на секции, как показано на рис. 9.

3.3.2 Инфраструктура, размещение и условия

Требования к видам инфраструктурных ресурсов, необходимых для организации, могут включать в себя:

- здание;
- рабочее пространство;
- аппаратурное и программное обеспечение;
- вспомогательные службы.

Эта инфраструктура должна определяться, обеспечиваться и поддерживаться высшим руководством. Более того,



Рисунок 9. Компоненты папки с информацией об обучении сотрудника

должны применяться системы для ситуационного и профилактического обслуживания инфраструктуры.

Ключевые факторы, которые следует учесть при планировании инфраструктуры, включают в себя:

- текущее наличие и потенциал;
- будущие потребности;
- расширение для роста;
- планы на случай возникновения чрезвычайной ситуации и связь с текущими и будущими программами.

Для достижения качества продуктов и услуг, соответствующих требованиям клиента, организация должна принимать решения по условиям рабочей среды и управлять ими.

Рабочая среда связана с условиями, в которых выполняется работа, включая физические, экологические и другие факторы, такие как шум, температура, влажность, освещение, погода, эргономика, гигиена, чистота, засорение окружающей среды, соответствующие помещения (буфет, кафетерий, уборные), санитарные нормы и техника безопасно-

сти, чистота в помещениях во избежание засорения.

Степень, в которой вышеуказанные факторы могут быть применимы к какой-либо организации, будет зависеть от размера лаборатории, риска и других факторов. Основное внимание следует уделить безопасности сотрудников, социальному обеспечению и соответствию продуктов. Отраслевые требования и другие нормативные положения помогут предоставить руководство по приемлемым стандартам рабочей среды.

3.4 Оценка, анализ и совершенствование

Организации необходимо планировать и применять процедуры для оценки, анализа и повышения эффективности СУК. Основное внимание следует уделить тому:

- соответствуют ли продукты и услуги требованиям клиента;
- соответствуют ли используемые процессы стандартным требованиям;
- постоянно ли повышается эффективность СУК.

3. Нематериальная инфраструктура

3.4.1 Мониторинг и оценка

Организация может начать мониторинг и оценку с задач по удовлетворению требований клиентов, а затем медленно развивать значимые задачи по ключевым процессам и процессам, подверженным риску, так как первоначальные цели достигнуты. Необходимо проводить мониторинг и оценку в отношении следующих сфер.

3.4.1.1 Удовлетворение клиентов

Организации необходимо проводить мониторинг отзывов клиентов о выполнении основных услуг организации. Отзывы клиентов могут быть собраны на основе опросов клиентов, исследования мнений пользователей, отзывов по полученным продуктам и услугам, анализа коммерческих потерь, положительных отзывов, жалоб и т.д. Высшее руководство должно решить, как, когда и кем будет проводиться опрос, и какой тип информации будет запрашиваться у клиента. Пример вопросника, который диагностическая лаборатория может включать в свое исследование отзывов клиентов, приведен на рис. 10.

Организация также может предоставить клиентам возможность получить доступ в помещение или лабораторию, чтобы они могли увидеть, как проводятся анализы. Это создает престиж и дает дополнительную возможность собрать информацию о требованиях клиентов.

3.4.1.2 Внутренние аудиты

Аудиты должны проводиться в соответствии с документированной процедурой для обеспечения обратной связи с целью управления эффективностью применяемой СУК.

Последним этапом в процессе внедрения СУК является проведение внутреннего аудита качества с целью определения несоответствий, если таковые имеются, в рамках недавно внедренной системы.

Важно регулярно проводить этот вид аудита даже после внедрения СУК в организации для мониторинга эффективности работы с учетом поставленных целей. Результаты аудита должны быть доведены до сведения высшего руководства. Штатный персонал должен быть обучен проведению таких аудитов. Отчеты о проведении аудитов и их результатов необходимо хранить как ключевой источник исходных данных. Задачи аудита включают в себя:

- оценку существующей системы по соблюдению стандартов, собственных процессов организации и процедур с целью проверки эффективности работы, используя четкое содержание и методологию аудита;
- определение возможностей улучшения существующей системы;
- определение недостатков в СУК;
- демонстрацию постоянного улучшения, которое происходит.

3.4.1.3 Мониторинг и оценка продукта (контроль качества)

Качество продуктов, анализов и услуг контролируется и оценивается с целью обеспечения потребностей и требований клиентов. Это осуществляется посредством проведения проверки и тестирования в отношении:

- оценки продукта и характеристик анализа;
- проверки результатов, полученных на различных этапах процессов;
- предоставления доказательств соответствия критериям приемлемости путем регулярного использования сертифицированных референтных материалов;
- участия в межлабораторных сравнительных испытаниях или программах квалификационного тестирования;
- содействия получению разрешения на выпуск продукта;
- повтора анализов с использованием тех же или других методов;

Примечание: Используйте 5-бальную шкалу, согласно которой 1 – очень плохое качество, а 5 – отличное качество.			
1. Как вы оцените лабораторию / компанию по следующим характеристикам оказываемых услуг?			
Скорость предоставления результатов			
Технические возможности			
Формат отчетов			
Предоставленная информация и консультации			
Доступность и дружелюбие			
Гибкость в удовлетворении ваших потребностей			
Цена			
Общее впечатление от работы			
2. По вашему мнению, какой самый лучший аспект услуг, предложенных лабораторией/компанией?			
3. По вашему мнению, есть ли услуги, которые можно улучшить? Как их можно улучшить?			
4. Каким образом, по вашему мнению, лаборатория может усовершенствовать взаимодействие с вами?			
5. Если бы вы могли получить доступ к информации через сеть интранет, то какой тип информации был бы полезен?			
6. Любые другие комментарии			
ФИО опрашиваемого:		Опрос провел:	
Должность опрашиваемого:		Организация:	
Местоположение:		Дата:	

Рисунок 10. Форма опросника об удовлетворенности клиентов

3. Нематериальная инфраструктура

- при необходимости, повторного проведения анализа;
- выполнения указанных видов деятельности перед поставкой.

Должны применяться процедуры для контроля валидности анализов и результатов, для анализа данных с целью выявления тенденций и несоответствующих результатов, для проведения расследований по выявленным ошибкам и тенденциям, а также для предотвращения рассылки ошибочных результатов.

Информация, которую получают в ходе деятельности по мониторингу и оценке организации, должна собираться и анализироваться с целью постоянного повышения эффективности СУК. Дополнительные данные, полученные в результате проведения внутреннего аудита, предложения сотрудников и жалобы клиентов также могут быть использованы в этих целях.

3.4.1.4 *Контроль несоответствующих продуктов*

Несмотря на наилучшие намерения, обучение и постоянное взаимодействие, компоненты СУК и деятельность организации могут быть неэффективными или недостаточными для предотвращения производства бракованных продуктов, ненадлежащих услуг, а также жалоб.

Несоответствие может быть выявлено в различных местах системы управления и технических операций (например, контроль качества, аудиты, жалобы, калибровка оборудования, стандарты, контроли или расходные материалы не соответствуют спецификации). Но при возникновении подобных ситуаций важно, чтобы СУК устраняла эти недостатки. Они должны быть зарегистрированы как несоответствия, и должны быть применены процессы для реагирования на возникшие проблемы и их исправление.

Процедура должна содержать информацию о том:

- кто несет ответственность за принятие решений при выявлении несоответствующей работы, например, сбой работы?
- какие действия должны быть незамедлительно выполнены при выявлении несоответствия работы (например, документация, уведомление руководящего персонала)?
- как оценить значимость несоответствия работы;
- уведомление клиента и отзыв результатов анализа или продуктов;
- корректирующие действия, которые необходимо принять, и определение возможности повторного возникновения несоответствия работы.

3.4.2 **Совершенствование**

Совершенствование – скорее упреждающий процесс для определения возможностей совершенствования, а не реакция на выявление проблем (несоответствий) или жалоб.

Организация должна постоянно повышать эффективность своей СУК посредством использования политики в области качества, задач в области качества, результатов аудита, корректирующих и предупредительных действий, а также пересмотра системы управления. Постоянное совершенствование СУК является необходимым требованием эффективной стратегии по управлению качеством.

3.4.2.1 *Корректирующее действие*

Корректирующее действие принимается при отступлении от утвержденной процедуры или политики. Несоответствие обычно выявляется в результате аудита, но могут быть случаи, когда несоответствия обнаруживаются не в результате аудита, а, например, в результате получения жалоб или пересмотра системы управления.

Документированная процедура должна быть разработана организацией для

предотвращения повторения ранее выявленных несоответствий.

- Распределите соответствующие полномочия для осуществления корректирующего действия.
- Определите характер и основную причину несоответствия.
- Определите и примените необходимое корректирующее действие для предотвращения повторения несоответствия – это может потребовать изменения методов управления с целью создания, внесения изменений или пересмотра контролей, таких как процедуры или обучение, во избежание повторения несоответствий.
- Подумайте, что может и будет сделано для мониторинга корректирующего действия.
- Запишите любые изменения в документированных процедурах, вносимые в результате корректирующего действия.

Примечание: Могут быть разработаны форма или ведомость (рис. 11) для регистрации несоответствия, которое было выявлено, а затем переданы персоналу для принятия каких-либо корректирующих действий.

3.4.2.2 Предупредительное действие

Документированная процедура необходима, в первую очередь, для предотвращения потенциальных несоответствий. Это, в свою очередь, требует от организации активно выявлять и устранять причины потенциальных несоответствий или определять возможности совершенствования при помощи инструментов общего управления качеством.

Разработайте процедуру, которая:

- определяет штатного сотрудника для выполнения действия, необходимого для реализации совершенствования;
- устанавливает согласованные сроки для завершения действия;

- проводит мониторинг хода работы через какую-либо систему отслеживания;
- определяет, требуются ли какие-либо последующие действия, и организует их выполнение;
- требует подписи уполномоченного лица по завершении;
- ведет учет документации по выполненной работе для систематизации в СУК.

Примечание: Могут быть разработаны форма или ведомость (рис. 12) для регистрации возможности совершенствования, которая была определена, а затем передана назначенному персоналу для выполнения необходимого действия.

3.5 Технические требования

Многие факторы определяют правильность и достоверность результатов анализов, проведенных в лаборатории, включая, но не ограничиваясь:

- закупками;
- человеческими факторами;
- размещением и условиями среды;
- методами проведения анализов и методами валидации;
- оборудованием и отслеживаемостью его измерения;
- работой с исследуемыми объектами.

3.5.1 Закупки

Организация должна уменьшить и предотвратить появление любой возникающей проблемы при помощи эффективной системы закупок для производства качественных продуктов и оказания качественных услуг. Поэтому все закупки должны соответствовать определенным требованиям организации посредством:

- создания методов для оценки поставщиков или подрядчиков;
- установления критериев отбора закупаемых продуктов, а также поставщиков и подрядчиков – документация,

3. Нематериальная инфраструктура

Номер несоответствия:	Источник: Оборудование/контроль качества/жалоба/аудит
Несоответствие:	Группа:
Опишите природу несоответствия:	
Дата выдачи:	Подпись:
Анализ причин:	
Опишите основную причину несоответствия:	Лицо, которое проведет анализ:
Дата проведения:	Дата завершения:
Лицо, проводящее анализ причины:	Подпись:
Корректирующее действие (я) (что было сделано для применения корректирующего действия?)	
Вероятнее всего, действия устранят эту проблему и предотвратят ее повторение	
Дата завершения:	Подпись:
Лицо, проводящее действие:	
Последующие мероприятия/завершение:	Необходимость проведения аудита: да/нет
Что уже сделано и будет сделано для мониторинга корректирующих действий?	
Дата завершения:	Подпись:

Рисунок 11. Типовая форма для регистрации несоответствия

Номер совершенствования качества:	Источник: Оборудование/контроль качества/жалоба/аудит
Совершенствование качества:	
Определите возможные источники совершенствования:	
Дата выдачи:	Подпись:
Действия, принятые для совершенствования качества:	
Лицо, которое примет действие:	Согласованная дата завершения:
Дата завершения:	Подпись:
Лицо, принимающее действие (я) по внедрению совершенствования качества:	
Последующие мероприятия/завершение:	Необходимость проведения аудита: да/нет:
Что уже сделано и будет сделано для мониторинга совершенствования (если применимо, приложите объективное доказательство к заполненной ФСК)?	
Дата завершения:	Подпись:

Рисунок 12. Типовая форма регистрации совершенствования качества (ФСК)

3. Нематериальная инфраструктура

подготовленная во время закупки (например, договор поставки, кредитная карта или другие квитанции, товарная накладная), включая данные, описывающие закупаемые услуги и расходные материалы, должна быть заранее рассмотрена и одобрена в плане технического содержания до ее выпуска, чтобы уменьшить риски поставки несоответствующей продукции.

После окончательного получения услуги или поставки продукта должен быть осуществлен процесс, обеспечивающий проверку их соответствия потребностям и требованиям организации.

3.5.2 Персонал

Необходимо, чтобы руководство лабораторией обеспечивало персонал, работающий в лаборатории, возможностью обучения лабораторным методам и использованию приборов для того, чтобы только компетентно обученный персонал или персонал под соответствующим контролем проводил анализы, оценку результатов и подписывал отчеты о проведенных анализах. Персонал, который проходит обучение, должен проводить анализы под соответствующим контролем. Руководство несет ответственность за следующее:

- определение навыков, требуемых для сотрудников, работающих в их сфере;
- обеспечение проведения оценки и обучения;
- обеспечение компетентности наставника;
- обеспечение того, что отбираются соответствующие учебные модули и соблюдаются соответствующие критерии, с целью выполнения лабораторных процедур, которые, как ожидается, персонал будет осуществлять;
- обеспечение того, что стажер не участвует в применении методов лабораторных анализов;

- до того момента, пока в его учебной ведомости не будет указано владение им основными лабораторными навыками;
- обеспечение того, чтобы стажер использовал оборудование, описанное в основных модулях по оборудованию, только когда его учебная ведомость демонстрирует его компетентность по основному оборудованию.

Для получения подробной информации смотрите раздел 1.5 «Кадровые ресурсы».

3.5.3 Размещение и условия среды

Лабораторные помещения, используемые для проведения анализов, должны обеспечивать правильное их выполнение. Технические требования к помещениям и условиям среды, которые могут повлиять на результаты анализов, должны быть документированы в технических процедурах. Также необходимо проводить мониторинг, контролировать и регистрировать условия (биологическую стерильность, пыль, влажность, температуру, электроснабжение и т.д.) согласно соответствующим спецификациям, если эти условия влияют на качество анализов. Внимание к доступу в определенные зоны проведения анализов, надлежащая уборка и эффективное разделение несовместимых видов деятельности необходимы для предотвращения перекрестной контаминации.

3.5.4 Метод анализа и его валидация

Лаборатория должна применять стандартные процедуры проведения анализов, признанные на международном или национальном уровне, или нестандартные процедуры (методы, используемые внутри организации), которые прошли соответствующую валидацию и которые применяются регулярно. Если лаборатория использует стандартные методы, она должна поддерживать последние версии стандартных методов со справочными текстами. Лаборатория должна провести

проверку того, что она может правильно использовать стандартные методы для достижения соответствующего предела обнаружения, селективности, повторяемости и воспроизводимости до начала проведения анализов.

Нестандартные методы – это методы, используемые внутри организации, которые могут включать в себя:

- методы, разработанные лабораторией;
- модифицированные стандартные методы проведения анализов;
- методы, взятые из научных публикаций, но не прошедшие валидацию.

Лаборатория должна провести валидацию этих методов для проверки того, что нестандартные методы соответствуют цели, и сохранять все документы, связанные с этим процессом, в справочных целях. Смотрите общие процессы метода валидации на рис. 13.

3.5.5 Оборудование и прослеживаемость его измерений

Лаборатория должна быть оснащена всем необходимым оборудованием, для правильного проведения анализов. Калибровка и измерения, проводимые лабораторией, должны соответствовать требованиям международных стандартов и полностью прослеживаться. Руководство несет ответственность за:

- обеспечение уникальной идентификации каждой единицы оборудования в лаборатории;
- обеспечение того, что первичная валидация или калибровка нового оборудования имеет место перед его использованием для подтверждения того, что данное изделие соответствует критериям закупки, и демонстрирует, что оборудование и его компоненты соответствуют спецификациям, используемым для исходных критериев приемлемости;

- обеспечение того, что оборудование, используемое для проведения анализов, способно предоставить ожидаемую точность анализов;
- обеспечение своевременного выполнения требований по сервисному обслуживанию, калибровке и техническому обслуживанию всего оборудования, используемого для проведения анализов;
- обеспечение того, что документация (например, пользовательские журналы, ведомость технического обслуживания) является актуальной;
- при необходимости, обеспечение принятия соответствующего корректирующего действия;
- обеспечение письменного оформления процедуры по использованию и техническому обслуживанию оборудования, а также того, что к работе с оборудованием допускается только авторизованный персонал, использующий новейшие инструкции;
- обеспечение указания статуса калибровки на оборудовании;
- при необходимости обеспечение прослеживаемости калибровок по международной системе единиц (СИ).

3.5.6 Работа с исследуемыми объектами

Лаборатория должна разработать документированную процедуру для получения, обработки, защиты, хранения, перевозки, сохранения и утилизации объектов, полученных для анализа в лаборатории. Эта процедура должна указывать:

- как однозначно идентифицировать каждый исследуемый объект в лаборатории таким образом, чтобы эта идентификация сохранялась в течение всего процесса проведения анализа;
- как зарегистрировать нарушения, связанные с объектами, если таковые имеются, а также как консультироваться с клиентом для получения дальнейших необходимых инструкций или уточнения действий;

3. Нематериальная инфраструктура

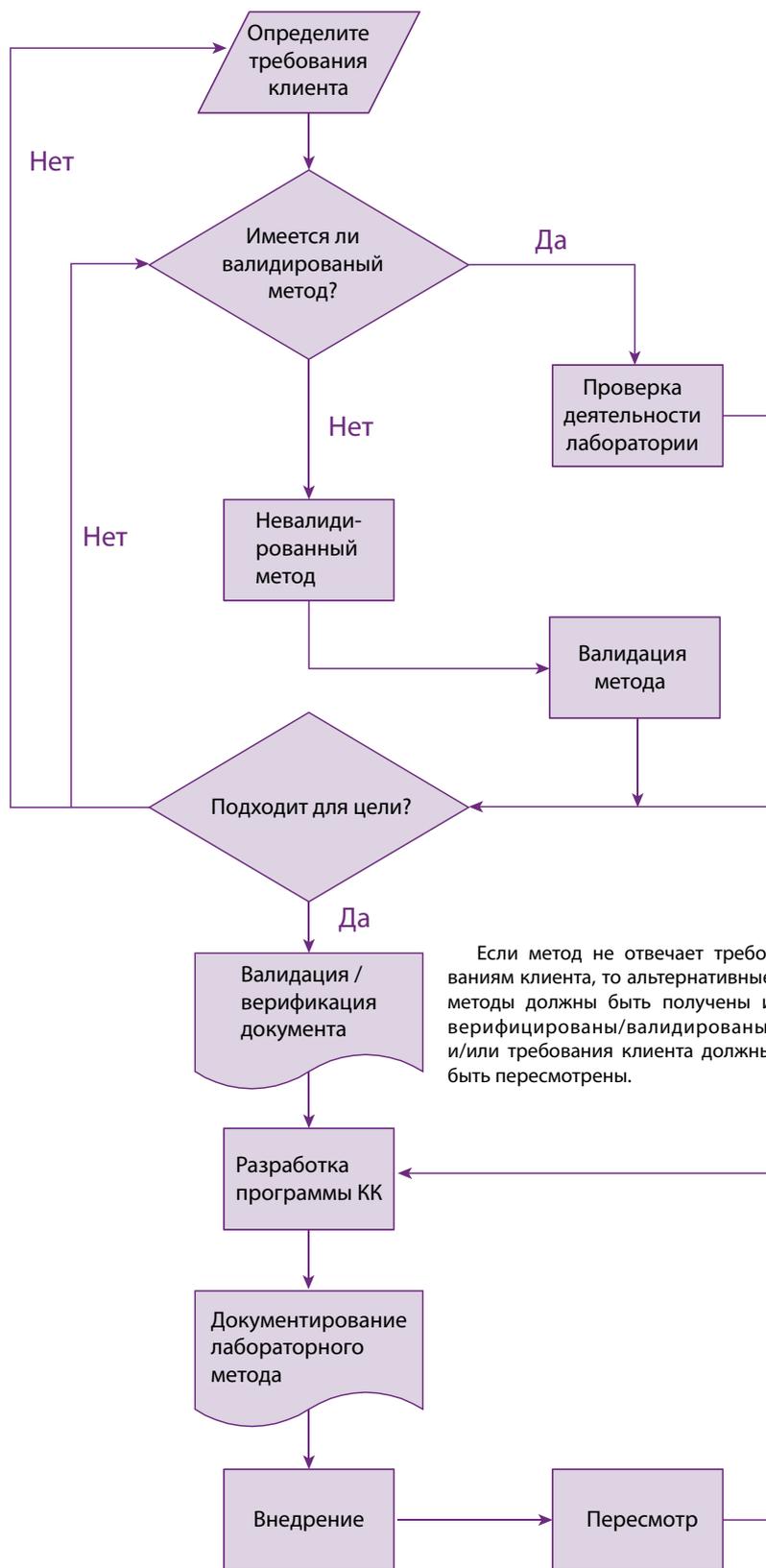


Рисунок 13. Общие процессы валидации методов в биологических испытательных лабораториях

Биологическое исследование

Требования клиентов должны быть определены и должны включать в себя, но не ограничиваться следующим:

- почему проводится анализ?
- есть ли предел спецификации?
- какая точность требуется?
- какой предел обнаружения/точности требуется?
- время между получением и исполнением?
- стоимость (включая разработку)?

Источник **валидированного метода**:

- международные стандарты;
- национальные стандарты;
- другие валидированные методы,

Например, ASTM, AOAC, AOCS, APHA и т.д.

Проверка работы лаборатории

посредством:

- квалификационного тестирования;
- референтных материалов;
- определения предела обнаружения;
- определения повторяемости;
- определения воспроизводимости;
- проверенных расходных материалов.

Невалидированные методы

могут быть получены:

- из журналов;
- от клиентов;
- путем разработки в лаборатории.

Все методы должны быть **валидированы**, например, посредством:

- квалификационного тестирования;
- референтных материалов;
- подтверждения линейности;
- подтверждения специфичности;
- оценки устойчивости;
- эффектов матрицы/намеренного заражения;
- определения предела обнаружения;
- определения повторяемости/воспроизводимости;
- проверенных расходных материалов.

Разработка **стандартной программы**

контроля качества: например,

- копии;
- материалы для намеренного заражения;
- референтные материалы;
- квалификационное тестирование.

После внедрения должна быть инициирована программа пересмотра.

Источник: Специальные критерии по международной аккредитации Новой Зеландии (IANZ) - биологические испытания; используется с разрешения IANZ.

- как избежать ухудшения состояния объекта в ходе работы, хранения и подготовки.

3.5.7 Заключение договоров субподряда на проведение анализов

Если лаборатория желает привлечь к проведению работы субподрядчика, ей следует учесть следующие критерии:

- удостовериться в том, что работа осуществляется субподрядчиками с соответствующей квалификацией;
- уведомить клиента о таких действиях;
- гарантировать, что ответственность за работу субподрядчика несет лаборатория;
- обеспечить ведение списка субподрядчиков и регистрацию доказательств компетентности каждого субподрядчика для выполнения данной работы.

3. Нематериальная инфраструктура

3.6 Типовые формы

Руководство по качеству

Название руководства по качеству						
Регистрация информации по контролю документа						
Номер версии	Дата выпуска	Описание	Автор	Рецензент	Редактор	Лицо, его утвердившее
Содержание [со следующими разделами]						
Руководство по качеству «АБВ»						
1. Цель [Опишите причину процедуры, такую как руководство по системе управления качеством с целью подробного указания политики и целей организации в области качества, обязанностей персонала, системы управления и т.д.]						
2. Область применения [Опишите, в отношении чего или кого применяется процедура]						
3. Действия [Включите соответствующую информацию по теме, описываемой текстом и/или блок-схемой. Она определит людей, ответственных за эффективный контроль реализации деятельности]						
3.1 Введение в организацию и ее функции						
3.2 Политика в области качества Подпись (владельца организации):				Дата:		
3.3 Цели в области качества Подпись (владельца организации):				Дата:		
3.4 Должностные обязанности [Опишите роли и обязанности персонала, включая требования к качеству. Должностные обязанности должны быть подписаны сотрудниками]						

3.5 Соглашение по показателям работы

[Включите процесс, посредством которого организация/компания улучшает показатели работы своих сотрудников и проводит постоянную оценку возможностей для организации. Это помогает руководству в улучшении навыков и способностей персонала. Полезно разрабатывать ежегодные планы по показателям работы для всех постоянных сотрудников]

3.6 Кодекс корпоративной этики

[Кодекс корпоративной этики устанавливает, что ваша организация (как работодатель) ожидает от своих сотрудников, и что сотрудники могут ожидать от работодателя. Дайте подробное описание]

3.7 Операционные процедуры системы управления и ее местоположение

[Укажите, где получить доступ к контролируемым версиям руководств по управлению бизнесом и рабочим инструкциям]

3.8 Пересмотр системы управления

[Опишите, кто организует совещание, что будет обсуждаться, как часто оно будет проводиться, и т.д.]

3.9 Аудиты

[Опишите все о внутренних и внешних аудитах, и как они проводятся в организации, включая частоту проведения, ведомости, отчеты, последующие действия и т.д.]

3.10 Работа с положительными отзывами и жалобами

[Опишите, как обрабатываются положительные отзывы/жалобы, полученные от клиентов, сотрудников или других сторон, о деятельности организации, в том числе, как получить жалобу, вести учет, обрабатывать жалобу, рассматривать и контролировать жалобы и проводить их мониторинг, аудиты и т.д.]

3.11 Работа по корректирующему действию и совершенствованию качества

[Опишите работу по несоответствиям и улучшению возможностей, выявленных по результатам оценки анализов/продуктов, когда какая-либо часть валидированного оборудования не откалибрована, и когда стандарты, контроль или расходные материалы не соответствуют спецификации, сбои программ контроля качества и т.д.]

3.12 Система управления документами

[Опишите, каким образом составляется, пересматривается, уполномочивается, издается, контролируется и сохраняется процедура, роли и обязанности и связанные с ними принципы и правила, участвующие в системе управления документами, и типовые формы написания новых процедур]

3.13 Конфиденциальность клиентов

3.14 Пересмотр контракта

[Опишите, каким образом организация будет оценивать свою способность взять на себя обязательства выполнить новый проект или новую работу, которая не является повседневной работой]

3. Нематериальная инфраструктура

3.15 Обслуживание клиента

[Опишите политику организации по обслуживанию клиентов, и как клиент может внести запрос на посещение для наблюдения за работой.]

3.16 Опрос клиентов

[Опишите, как будут проводиться опросы клиентов и как часто, кто их организует и сводит воедино опросы и результаты]

3.17 Обязанности руководства и персонала

[Опишите, кто владеет системой управления качеством организации и несет полную ответственность за нее, кто отслеживает поддержание и совершенствование системы управления качеством и гарантирует, что системные проблемы решаются своевременно, ответственность персонала, схема организационной структуры для описания структуры организации, и т.д.]

3.18 Технические обязанности и заместители

[Опишите, кто несет полную техническую ответственность за функционирование лаборатории/компании, и кто является заместителями в случае отсутствия ответственных лиц]

4. Справочные дополнительные документы / рабочие инструкции

Руководство по системе контроля документов

Название системы контроля документов для АБВ							
Регистрация информации по контролю документа							
Регистрация информации по контролю документа	Номер версии	Дата выпуска	Описание	Автор	Рецензент	Редактор	Лицо, его утвердившее
Содержание [со следующими разделами]							
Руководство по системе контроля документов для «АБВ»							
1. Цель [Опишите роли и обязанности, и связанные с ними принципы и правила, участвующие в системе управления документами, как процедура составляется, рассматривается, уполномочивается, публикуется, контролируется и сохраняется, и разные типовые формы]							
2. Область применения [Опишите, в отношении чего или кого применяется процедура]							
3. Действия [Укажите соответствующую информацию по этой теме, описанную текстом и/или блок-схемой. Она будет идентифицировать людей, ответственных за эффективный контроль выполнения деятельности]							
3.1 Описание процедуры [Опишите процедуры, когда они разрабатываются, кто несет ответственность за обеспечение процедурой для бесперебойного функционирования системы качества]							
3.2 Роли и обязанности [Опишите роли и обязанности сотрудников, участвующих в системе управления документами]							
3.3 Система нумерации [Опишите, как будет даваться уникальный номер документа для процедуры, и кто несет ответственность, и как они будут поддерживать систему нумерации]							

3. Нематериальная инфраструктура

3.4 Процедуры – подготовка, стиль и формат

[Опишите, как создать процедуру, а затем ее стиль и формат для следующих действий: Название; Документ СОП №; Страница №; Запись информации по управлению документом; Верхний и нижний колонтитулы, Справочный вспомогательный документ; типовые формы для разных типов процедур, т.е. оборудования, методов проведения анализов и т.д.]

3.5 Процедура контроля

[Опишите управление процессом контроля документов для соответствия стандарту 17025, включая основной индекс всех текущих СОП и даты их публикации и/или внесения изменений]

3.6 Процедура публикации

[Опишите, как документы/процедуры издаются в контролируемой среде, в которой хранятся контролируемые бумажные копии и т.д.]

3.7 Пересмотр процедуры

[Опишите политику пересмотра процедуры, критерии и периодичность обновления процедур]

3.8 Процедура хранения

[Опишите политику хранения предыдущих версий процедур, и кто несет ответственность за их сохранение]

4. Ссылки на вспомогательные документы/рабочие инструкции

Метод проведения анализа

Название метода проведения анализа						
Регистрация информации по контролю документа						
Номер версии	Дата выпуска	Описание	Автор	Рецензент	Редактор	Лицо, его утвердившее
Содержание [со следующими разделами] Название метода проведения анализа						
1. Цель [Методы проведения анализа относятся к лабораторным процедурам и являются внутренними документами, которые обеспечивают руководство для персонала: <ul style="list-style-type: none">▪ как определить наличие специфических анализов или определить присутствующее количество;▪ как описать процесс идентификации образцов. Опишите цель написания этой процедуры проведения анализа]						
2. Принцип [Опишите, как работает процедура]						
3. Область применения [Опишите, в какой области или в отношении кого применяется процедура]						
4. Ограничения метода [Опишите факторы, влияющие на уровень идентификации, достижимый с помощью данного метода проведения анализа, такие как качество образца, стадия развития, контаминация в случае проведения ПЦР/ПЦР в реальном времени, диагностическая чувствительность и специфичность, а также насколько хорошо был валидирован метод ПЦР в реальном времени, таксономическая путаница, ограничения времени и т.д.]						
5. Требования к образцу [Опишите, какой образец и как должен быть зафиксирован на предметном стекле/извлечен для идентификации с использованием морфологических признаков или молекулярных методов. Например, ДНК, РНК или кДНК, полученные из исследуемых образцов, положительных и отрицательных контролей для молекулярных методов]						

3. Нематериальная инфраструктура

6. Материал для контроля качества

[Опишите образцы, которые будут использоваться в качестве (референтных) материалов контроля качества, например референтные коллекции и другие национальные коллекции. Для молекулярных методов определить следующее:

- **Отрицательный контроль:** В некоторых обстоятельствах должны быть включены образцы тех же самых или сходных видов хозяев, что и исследуемые образцы, свободные от патогена.
- **Положительный контроль:** ДНК патогена, ДНК или РНК беспозвоночных, длина которой охватывает участок, подлежащий амплификации с помощью ПЦР или ПЦР в реальном времени, соответственно. Она может быть извлечена из растения, плазмиды, бактериальной или грибной культуры или беспозвоночного. Положительный контроль будет использоваться в концентрации примерно в 1000 раз больше, чем предел обнаружения ПЦР.
- **Внутренний контроль:** Для каждого образца одновременно или в качестве альтернативы может использоваться внутренний контроль, в котором была получена отрицательная реакция на патоген-мишень. Внутренние контроли позволяют выявлять РНК или ДНК растений или ДНК бактерий, грибов, беспозвоночных или нематод.
- **Отсутствие типового контроля (вода в качестве контроля):** Нуклеиновая кислота не добавляется в реакционную смесь]

7. Процедура контроля качества

[Опишите калибровку оборудования, проверку критических параметров, регулярное участие в квалификационном тестировании и оценку неопределенности измерений (НИ)]

8. Оборудование

[Перечислите все оборудование, необходимое для проведения анализа]

9. Реактивы и растворы

[Перечислите все реактивы и растворы, полученные из них]

10. Процедура

[Подробно опишите метод, вплоть до этапов выявления]

11. Интерпретация и запись результатов

12. Расчеты

[Подробно опишите расчеты, если требуется]

13. Отчет о результатах

14. Справочные документы

15. Приложения

Типовая форма по работе с образцом

Название процедуры работы с образцом						
Номер версии	Дата выпуска	Описание	Автор	Рецензент	Редактор	Владелец
Содержание [со следующими разделами]						
1. Цель [Опишите работу с образцами, поступающими в лабораторию, которая включает в себя следующее: <ul style="list-style-type: none">▪ Как документируются образцы▪ Как образцы готовятся к обработке▪ Как проводятся идентификация▪ Как готовится отчет по идентификации▪ Как образцы высылаются для проведения внешнего анализа/валидации]						
2. Область применения [Опишите, в какой области или в отношении кого применяется процедура]						
3. Действия [Опишите, как вести работу с образцом, включая следующее: <ul style="list-style-type: none">▪ Как образцы доставляются в лабораторию▪ Каким инструкциям по охране здоровья и безопасности необходимо следовать перед началом работы с образцами▪ Роли и обязанности приемщика▪ Как хранить образцы▪ Как присвоить уникальный идентификационный номер образцам для их отслеживаемости▪ Роли и обязанности диагностического персонала по работе с образцами▪ Что делать при получении непригодных образцов▪ Обработка и анализ образцов▪ Сообщение о результатах клиенту уполномоченным лицом▪ Как сохранить или утилизировать образцы▪ Как отправить образцы для внешнего анализа/валидации]						
4. Приложения						

3. Нематериальная инфраструктура

3.7 Система управления информацией в лаборатории

3.7.1 Введение

Система управления информацией в лаборатории (СУИЛ) – это метод, при помощи которого лаборатория получает, анализирует, хранит и сообщает о лабораторных данных. Она помогает лаборатории управлять и систематизировать лабораторные данные и свою деятельность. Она помогает лаборатории отслеживать образцы, повышать точность вводимой информации об образце, увеличивает пропускную способность и, наконец, повышает эффективность работы.

3.7.2 Необходимость системы управления информацией в лаборатории

Сбор, обработка и распространение информации о вредных для растений организмах имеет решающее значение для проведения надзора, исследования первичных очагов, принятия ответных мер и содействия проведению переговоров по доступу на рынок и т.д. Важно обладать диагностической информацией, доступной для своевременного и обоснованного принятия решений. Без соответствующей системы управления информацией извлечение информации об образце, связанном с ним анализе и составление отчетов будет осуществляться вручную и будет трудоемким процессом. Лаборатории должны обеспечить, что их результаты ясны, не содержат ошибок и соответствуют стандартам обеспечения и контроля качества, установленным регулирующими органами (ИСО 9001/ИСО 17025). Если лаборатория генерирует большой объем информации, проводя повседневные анализы и будучи обязанной выполнять работу с образцами в сжатые сроки, необходимо позаботиться о безопасности и целостности данных.

Специально разработанная система управления информацией поможет лабо-

ратории быстрее и надежнее производить точные и воспроизводимые результаты. Информацию об образце по результатам лабораторного анализа будет легче хранить и отслеживать с момента приема образца до момента сообщения результатов. Также лаборатория может оценить обнаружения вредителей и болезней на определенных товарах (взаимосвязь между хозяином и вредным организмом), статус их ликвидации, историю наблюдений и т.д., для проведения надзора и научно-исследовательской деятельности.

3.7.3 Управление информацией в лаборатории

Лаборатории придется определить, какой тип системы ей необходимо применять для управления информацией об образце. Это решение должно быть основано на анализе потребностей и деятельности лаборатории. Следующие факторы могут быть приняты во внимание при принятии решений:

- размер организации или лаборатории;
- количество повседневных анализов в неделю или месяц;
- общее количество полученных образцов;
- нормативные требования;
- требования клиентов;
- необходимость проведения анализа и сообщения результатов в более сжатые сроки;
- как адаптироваться к проблемам или справиться с ними в будущем, например, со значительным увеличением объема данных.

3.7.4 Инструменты управления информацией в лаборатории

3.7.4.1 Учетные записи на бумажных носителях

По-прежнему можно использовать простую систему учета с использовани-

ем бумажных носителей. Есть определенные преимущества в использовании ручной системы учета данных: ее дешевле внедрить, нет необходимости во всеобъемлющей или дорогостоящей программе обучения применению специализированного программного обеспечения, риск искажения данных гораздо меньше и т.д. Но ее главные недостатки заключаются в том, что для извлечения данных требуется время, особенно при обработке большого объема данных, а также усложняется обмен информацией.

3.7.4.2 Ведомости

Электронная ведомость (например, MS Excel) является цифровым эквивалентом бумажной ведомости. Она может быть использована для хранения и управления данными. Электронные ведомости просты в использовании, но трудно управляемы, если слишком много информации заносится в одну таблицу. Становится все труднее ее редактировать или найти в ней часть информации. Отсутствует контроль версий, что создает путаницу и неточность, когда электронные ведомости выдаются нескольким штатным сотрудникам. Нет никакого контроля или жестких правил в отношении типа информации, которая может быть занесена в определенный столбец электронной ведомости. Поэтому данные могут стать неточными и могут поставить под угрозу целостность результатов.

3.7.4.3 Базы данных

База данных (например, MS Access, Oracle), как правило, используется для хранения больших объемов информации. Организация может хранить любые файлы в базе данных, включая файлы Word, изображения и PDF-файлы. Данные могут отправляться другим лицам в формате файлов PDF или Excel. База данных помогает установить взаимосвязь между типами данных для быстрого доступа к информации и одновременного

обновления. Правки могут вноситься легко, и несколько человек могут иметь доступ к одному набору данных при помощи систем управления базами данных, при этом сохраняется целостность данных. Базы данных обеспечивают большую комплексность с точки зрения управления данными, но нуждаются в технической поддержке посредством программирования или SQL-кода.

3.7.4.4 Готовое программное обеспечение (например, LIMS, Q-pulse)

Специализированное программное обеспечение предназначено для оптимизации и расширения лабораторных операций посредством потоковой организации данных в лаборатории. Такое программное обеспечение может быть использовано для:

- приемки, регистрации и маркировки образца;
- распределения работы (например, анализов по каждому образцу);
- проверки состояния работы;
- отслеживания учетных записей и образцов;
- создания отчетов о проведении анализов после применения контроля качества.

Эти системы должны быть адаптированы под потребности пользователей. С использованием клиент-серверных инструментов система позволяет обрабатывать данные в любой точке сети. Более того, с модулями на основе веб-технологий в системе пользователи могут вынести операции за пределы лаборатории.

3.7.5 Что хранить

СУИЛ позволяет организации хранить различные части информации, необходимой для выполнения функций лаборатории. Они могут включать в себя лабораторные протоколы, список реактивов, изображения, информацию об образце,

3. Нематериальная инфраструктура

информацию об оборудовании; при этом минимумом является следующее.

3.7.5.1 Регистрация образца и информация о доступе

СУИЛ используется для хранения следующей информации о регистрации образца и о доступе:

- дата приемки образца;
- уникальный номер доступа (для прослеживаемости образца);
- анализы, которые должны быть проведены;
- направление диагностики (энтмология, микология, вирусология, нематология);
- контактные данные заказчика;
- регистрационный номер заказчика;
- количество полученных пробирок;
- симптомы образца, если таковые имеются;
- срочный или повседневный анализ;
- данные об обнаружении образца на хозяине (почва, сорт, контейнер, какое-либо растение и его части и т.д.);
- данные о стране происхождения и месте нахождения.

3.7.5.2 Данные по идентификации

- порядок;
- семейство;
- род;
- вид;
- стадия развития;
- состояние (живой или мертвый);
- данные о специалисте, проводившем идентификацию;
- дата проведения идентификации;
- дата получения окончательного ответа;
- расценки, если таковые имеются;
- новое сообщение (новый хозяин или новая связь).

3.8 Ссылки

- **Международная организация по стандартизации (ИСО).** 2008 г. ИСО 9001:2008: «Системы менеджмента качества. Требования.» Доступно по ссылке: <http://www.iso.org/iso/>

[catalogue_detail?csnumber=46486](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail?csnumber=46486) (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

- **Международная организация по стандартизации (ИСО).** 2005 г. ИСО/МЭК 17025:2005: «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий». Доступно по ссылке: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=39883 (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 года).
- **Орган по международной аккредитации Новой Зеландии (IANZ),** май 2011 г. «Научные критерии аккредитации – Биологические испытания». 4-е издание. Доступно по ссылке: <http://www.ianz.govt.nz/services/accreditation-2/accreditation/laboratories/biological/> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 года).
- **Крог П.** 2012 г. «Жизненный цикл файла: понимание потока данных». Филадельфия, Пенсильвания. Американское общество фотографов СМИ / **Krogh, P.** 2012. File lifecycle: understanding workflow. Philadelphia, PA, American Society of Media Photographers. Документ доступен по ссылке: <http://dpbestflow.org/file-lifecycle/file-lifecycle-overview> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 года).
- **Ло П.Л. и Бланк Р.Х.** 1989 г. «Обследования видов щитовок-щитоносцев (Hemiptera: Diaspididae) в садах киви». Журнал «Энтомолог Новой Зеландии», 12: 1–4 / **Lo, P.L. & Blank, R.H.** 1989. A survey of armoured scale species (Hemiptera: Diaspididae) in kiwifruit orchards. NZ Entomologist, 12: 1–4.
- **Стандартные операционные процедуры** (2014 год). Неопубликованное. Новая Зеландия, Лаборатория здоровья растений и окружающей среды, Министерство сырьевой промышленности.

- **Томсон М., Лионс А., Кумарасингх Л., Пек Д.Р., Конг Г., Шаттук С. и Ла Салле Дж.** 2011 г. «Дистанционная микроскопия: успешное применение в обеспечении фитосанитарной биологической безопасности в Австралии и Новой Зеландии» «Австралийский энтомологический журнал», 50: 1–6 / **Thompson, M., Lyons, A., Kumarasinghe, L., Peck, D.R., Kong, G., Shattuck, S. & La Salle, J.** 2011. Remote microscopy: a success story in Australian and New Zealand plant biosecurity. *Australian Journal of Entomology*, Идентификатор цифрового объекта (DOI): 10.1111/j.1440-6055.2010.00803.x.
- **Уокер К.** 2012 г. «Руководство пользователя по библиотеке изображений «PaDIL»». Неопубликованное руководство пользователя. Музей Виктории, Австралия / **Walker, K.** 2012. PaDIL user guide. Unpublished user guide. Museum Victoria, Australia.



РАЗДЕЛ 2

Организация рабочего процесса в лаборатории

4. Работа с образцами

Краткий обзор

В этом разделе дается обзор ключевых методов, используемых для выявления и идентификации вредных для растений организмов. Существует целый ряд методов, доступных для специалиста по диагностике – от визуального исследования под микроскопом до секвенирования ДНК. Будет дано общее руководство по процессу исследования и отбора образцов, а также по этапам проведения диагностики. Подробно описываются широко используемые методы, и приводятся несколько примеров по разным группам вредных организмов.

На рис. 14 приведена общая схема функционирования службы по идентификации вредных организмов. В центре показан рабочий процесс, слева – исходные ресурсы, а справа – результаты. Эта схема приводится для того, чтобы целиком показать всю систему основных видов деятельности, этапов и моментов принятия решений, которые служат отличительным признаком службы по идентификации вредных организмов. Это не «предписанная практика», которой нужно следовать, и не исчерпывающее описание системы, однако предназначение этой схемы заключается в содействии появлению независимых идей о том, как можно реализовать имеющиеся возможности в контексте вашей конкретной ситуации.

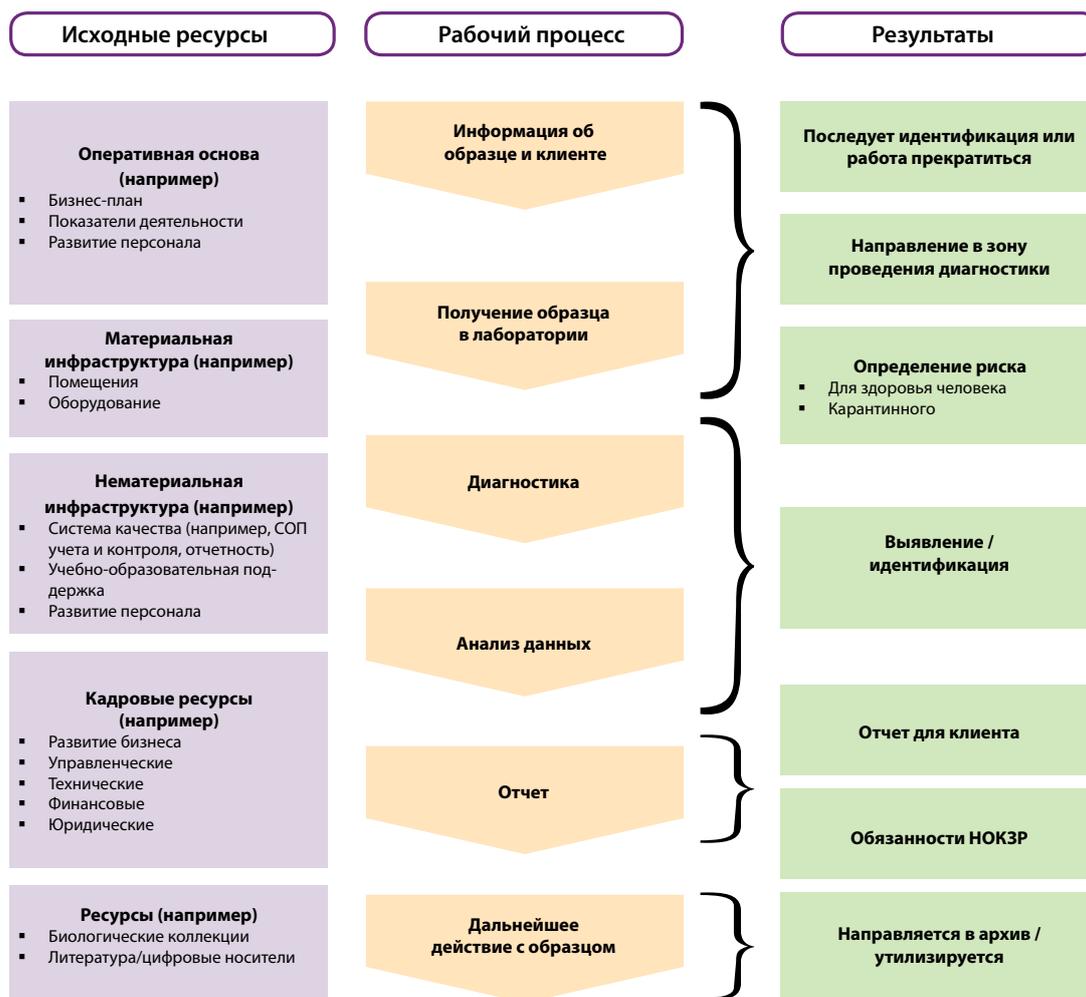


Рисунок 14. Общая схема функционирования службы по идентификации вредных организмов

4. Работа с образцами

Данная схема отражает структуру последующих разделов и глав и показывает, как эти сферы деятельности взаимодействуют, обеспечивая эффективное функционирование службы по идентификации вредных организмов.

Введение

Образцы могут поступать в лабораторию из множества источников и сопровождаться разными заявками. Важно, чтобы эти образцы и заявки, сопровождающие их, надлежащим образом регистрировались и затем перемещались по лаборатории и отслеживались до того момента, когда может быть принято окончательное решение.

4.1 Приемка образцов

В большинстве случаев можно ожидать, что образцы поступают через инспекторов; однако в зависимости от работы лаборатории образцы также могут поступать от фермеров, представителей сельскохозяйственной отрасли и населения. Поэтому объем информации, который может быть собран об образце, будет разным. Несмотря на это, чем больше сведений можно получить об образце, тем выше вероятность получения быстрого и точного результата диагностики. Поэтому фитосанитарным диагностическим лабораториям при приемке образцов рекомендуется давать клиентам для заполнения информационные бланки, чтобы они могли задокументировать относящуюся к делу информацию. На этих бланках должны быть отражены такие сведения, как:

- контактные данные лица или организации, которые вносят заявку на диагностику образца;
- данные об образце, например, тип растения, возраст растений;
- проблема, например, симптомы, процент пораженных растений;
- история выращивания растения.

В процессе приемки образцов клиент должен получить ожидаемую им информацию, т.е. информацию о том, существует ли соответствующий анализ, каковы стоимость и сроки предоставления отчета.

Объем информации с указанием основного описания и характеристик фитосанитарных симптомов, который может быть представлен на бланке заявки, не ограничен; однако необходимо стремиться к получению минимального объема описания, такого как – поражены ли листья, побеги, плоды или корни, наблюдается ли некроз, пожелтение, усыхание или увядание.

4.2 Регистрация образцов

Когда образец поступает в лабораторию для анализа, он должен сопровождаться документами с заявкой на приемку образца (как описано выше; например, рис. 15). Сведения об образце должны затем быть внесены в систему регистрации, и образцу должен быть присвоен уникальный идентификационный код или номер. Это позволит отслеживать образец и легко связать результаты диагностики с данными о клиенте с целью быстрого предоставления точной отчетности.

Образцы должны доставляться в центральный пункт, где их можно открыть и зарегистрировать. Для определения того, какой диагностической группе следует направить образец, проведите оценку информации в документах для установления необходимого анализа или основных симптомов, указанных клиентом. Проверьте наличие всех важных сведений, таких как:

- наименование отправителя – название компании и контактные данные;
- адрес и контактные номера/адрес эл. почты;
- кодовый номер (кодовые номера) клиента;

Бланк заявки на приемку образца в Фито-Клинику, 2015 г.			
ФИО:		Ваш справ.номер:	
Компания:		Договор-заявка №:	
Адрес:		ФИО и адрес для отправки счета (если отличается)	
Индекс:		Номер НДС	
Тел:		Факс:	
Моб.тел:		Эл.почта:	
Хотите ли вы зарегистрироваться в системе «SamTrack»?  (Наша бесплатная и безопасная онлайн система отслеживания образцов, позволяющая быстро и легко получить доступ к информации о вашем образце)*			
Образец – Чтобы помочь нам с проведением диагностики, пожалуйста, попытайтесь указать как можно больше информации			
Род, вид и сорт растения: (Или тип семян / растительного материала / почвы)			
Метод размножения / посадки (например, семена, черенки и т.д.):		Возраст растений или дата посева:	
Растения выращиваются в открытом или закрытом грунте, или это продукт запаса?			
Какие пестициды / гербициды использовались и когда?			
Проблема			
Какие симптомы вы наблюдали?			
Например, пятнистость листьев, усыхание, увядание			
По вашему мнению, что может быть причиной?		Бактерии  Грибы  Вредитель  Нематода  Вирус 	
Распределение симптомов и пораженная часть растения (корни, стебли и т.д.)?		% пораженных растений	
Когда проблему впервые заметили?			
Если вы хотите, чтобы был проведен конкретный анализ из нашего прайс-листа, пожалуйста, укажите какой:			
Другая информация: история посевов и типы выращиваемых рядом растений, уклон, температура, влажность, орошение, отчетность.			
Настоящим я разрешаю Фито-Клинике Fera проводить анализы этого образца и соглашаюсь со стандартными положениями и условиями Fera.			
Подписано:		Дата:	
ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: Неподписанные бланки рассматриваться не будут.			
Мы можем использовать ваши контактные данные для отправки вам информации о наших услугах/предложениях/событиях; однако ваши данные не будут переданы никакому стороннему лицу за пределами Fera. Пожалуйста, поставьте здесь галочку, если вы хотите отказаться от получения такого рода информации и хотите получать только информацию, относящуюся к вашему образцу (образцам)			
Настоящим Fera исключает всю ответственность за любые претензии, потери, запросы или убытки какого-либо характера (предвиделись ли такие претензии, потери, запросы или убытки, были известны или нет), возникающие из или в связи с услугами и подготовкой любого технического или научного отчета, включая без ограничения косвенные или побочные убытки или потери реальной или предполагаемой прибыли (включая потерю прибыли по контрактам); неполучение доходов, потерю бизнеса; потерю возможности; потерю ожидаемой экономии; потерю неосознаваемых активов; потерю репутации; потерю или повреждение данных; упущенные возможности использования денег или иное, и независимо от факта получения информации о возможности таких претензий, потерь, запросов или убытков и от их возникновения в результате небрежности (включая халатность) в рамках контракта или по иным причинам. Это заявление не влияет на ваши законные права.			

Рисунок 15А. Страница 1 стандартного, двухстраничного бланка заявки на приемку образца, который используется Fera

4. Работа с образцами

Отправка вашего образца на диагностику

Как выбрать образец – Образец, который вы отправляете, дает ключ к диагностике, поэтому, пожалуйста, примите во внимание следующее:

- Постарайтесь отправить образец с типичными признаками проблемы – нам необходимо увидеть весь комплекс симптомов.
- Что касается болезней, пожалуйста, включите в образец часть, которая включает границу между здоровой и больной тканью, и если это возможно, включите здоровый материал для сравнения, обозначив его как таковой.
- Если симптомы на листьях или побегах проявляются в виде общего изменения цвета или усыхания, указывая на возможное повреждение корней, в таком случае, пожалуйста, отправьте нам все растение целиком (если возможно) и включите корни и окружающую их почву.
- Если вы предполагаете, что проблема вызвана нематодами, пожалуйста, включите отдельные образцы почвы как из зоны заражения, так и с границы зараженной зоны.

Как упаковать образец

Целые растения	Поместите влажный корневой ком в пластиковый пакет, который запечатывается вокруг стебля растения. Поместите все растение во второй пластиковый пакет, заполните его небольшим количеством воздуха и запечатайте.
Листья и побеги Диагностика вирусных болезней: Диагностика других / неизвестных болезней:	Поместите в пластиковый пакет, заполните его небольшим количеством воздуха и запечатайте. Заверните образец в слегка намоченную фильтровальную бумагу, поместите в пластиковый пакет, заполните его небольшим количеством воздуха и запечатайте.
Сочные материалы	Например, фрукты, овощи, клубни (кроме картофеля), луковицы, клубнелуковицы и т.д. Заверните в сухую фильтровальную бумагу, если они гниют/трескаются, пожалуйста, заверните каждый из них по отдельности. Поместите в пластиковый пакет, заполните его небольшим количеством воздуха и запечатайте.
Беспозвоночные вредители	Образцы беспозвоночных вредителей (насекомых, пауков, клещей и т.д.) следует помещать в герметичный пластмассовый контейнер.
Клубни картофеля Диагностика, связанная с беспозвоночными вредителями: Диагностика других / неизвестных болезней:	Заверните в сухую фильтровальную бумагу. Поместите в пластиковый пакет, заполните его небольшим количеством воздуха и запечатайте. Заверните в сухую фильтровальную бумагу. Не помещайте в пластиковый пакет.
Образцы почвы	Для анализа на нематоды. Поместите 500 г почвы в крепкий пластиковый пакет и запечатайте его.
Образцы семян	Позаботьтесь о том, чтобы семена были надежно упакованы.

Все образцы должны быть помещены в крепкие картонные коробки и надежно упакованы с добавлением скатанной бумаги. В отдельный пакет поместите свой бланк заявки на приемку образца и запечатайте коробку

Отправьте ваш образец по адресу: Фито-Клиника Fera Сэнд Хаттон Йорк YO41 1LZ Соединенное Королевство

В идеале, образцы следует отправлять через курьерскую службу экспресс-доставки или почтовым отправлением первого класса, чтобы они были получены Fera на следующий день. Если возможно, не отправляйте образцы накануне выходных дней или государственных праздников, однако, если это событие – неизбежно, то на наружной части упаковки сделайте отметку «Пожалуйста, заморозьте при получении», если необходимо.

Если у вас есть вопросы, обращайтесь: Горячая линия Фито-Клиники Тел: 01904 462324 Факс: 01904 462147
Эл. почта: plantclinic@fera.gsi.gov.uk

*Система «SamTrack» - это наша бесплатная и безопасная онлайн система отслеживания образцов, позволяющая быстро и легко получить доступ к информации о вашем образце. Вы можете зарегистрироваться в этой системе по ссылке: <http://samtrack.fera.defra.gov.uk/>. После регистрации вы получите уникальное имя пользователя и пароль, а также инструкции по пользованию системой.

Использование Системы «SamTrack» обеспечивает актуальной информацией 24 часа в сутки. Вы можете:

- Проверить, когда мы получили ваш образец (ваши образцы), и кто с ними работает.
- Проверить, какие вредители и болезни были идентифицированы, проверить отчет и увидеть краткий обзор по всем образцам, которые вы нам присылали.
- Получить доступ к информации в нерабочее время.

- идентичность растения – хозяина (растений-хозяев) / образца (образцов);
- какой анализ требуется провести.

Если отсутствует бланк заявки на приемку образца, или информации недостаточно, свяжитесь с клиентом для получения требуемой информации.

При регистрации образца следует зафиксировать следующие сведения:

- данные о клиенте (как указано выше);
- осуществлен ли отбор этого образца в рамках направленного обследования;
- идентичность растения-хозяина (растений-хозяев) / образца (образцов);
- сорт растения;
- тип образца;
- страна происхождения;
- дата получения;
- диагностическая группа (отдел), которая будет работать с образцом;
- уникальный идентификационный код или номер образца.

4.3 Исследование образцов

Как только образец был получен и сведения об образце были записаны, он готов для исследования. Первоначальная проверка может включать в себя:

- сведения о хозяине и регистрационные номера образца;
- пригоден ли образец для исследования, т.е. очевидные признаки чрезмерного гниения отсутствуют;
- присутствуют ли летающие или подвижные насекомые, которых, возможно, необходимо изолировать;
- имеет ли присланный образец отношение к заявленной проблеме.

После установления соответствия образца требованиям первичной проверки, работа с ним переходит на этап диагностики. Образцы, для которых заявлен конкретный анализ (например,

диагностика картофеля на выявление вирусов), напрямую передаются соответствующему специалисту по диагностике. Однако, в случае с образцами, в отношении которых поступил запрос на определение этиологии неизвестной болезни, требуется предварительное расследование. В следующих разделах описываются некоторые базовые наблюдения, которые могут позволить наиболее точно предположить, к каким таксонам относятся возбудители или вредители, и направление диагностики.

4.3.1 Корни, клубни, луковицы и клубнелуковицы

Симптомы – проверить наличие дефектов, физического повреждения, галлов или цист, чрезмерно разросшихся корней, гниения и т.д. Если гниение имеет место, установите сухое оно или влажное, внутреннее или поверхностное, существенное или несущественное, переходит ли на узловую корень.

Осмотр – сначала осмотрите образец, не трогая прикрепленную к нему почву. Затем осторожно удалите почву тупым инструментом или путем встряхивания и сделайте повторный осмотр. И, наконец, смойте всю почву и еще раз осмотрите образец. На каждом этапе осматривайте поверхности под препаровальной лупой и ищите мицелий, плодовые тела, склероции, стелющиеся гифы, мицелий, напоминающий шнурки или корни растений, и т.д. Сделайте поперечные и горизонтальные срезы больших кусков материала (например, клубней) и посмотрите, имеет ли место изменение цвета сосудов или наблюдается ли общее гниение.

Осмотр под микроскопом – подготовьте препарат на предметном стекле и исследуйте его на наличие грибных структур; посмотрите, наблюдается ли движение бактерий.

4. Работа с образцами

Анализы – выделите из лидирующего края, используйте флотационный метод, метод приманок, проведите инкубацию, инокуляцию, проверьте почву (уровень рН и электрическую проводимость).

Просмотрите информационный листок по образцу – проблемы с культивированием (например, переувлажнение), вопросы хранения (например, заморозки, перегрев, нехватка кислорода), уплотнение грунта или луговой мергель («хардпен»), загрязнение грунтовых вод (например, утечка канализации), дата посадки в грунт или горшок, проявление симптомов, спектр пораженных хозяев, распространение (местами или широкое распространение), предыдущая история посевов, анализы питательности, применение химических препаратов (например, пестицидов или регуляторов роста, таких как ингибиторы прорастания) и т.д.

4.3.2 Основа стебля

Симптомы – проверьте наличие пораженных участков, язв, галлов, вторичных корней, изменения цвета сосудов, признаков повреждений беспозвоночными вредителями (например, экскременты насекомых, паутина, слизь слизи или улиток).

Осмотр – ищите мицелий, плодовые тела (например, склероции, пикниды), сделайте поперечные и продольные срезы и посмотрите, имеет ли место изменение цвета сосудов, несовместимость прививки и т.д.

Осмотр под микроскопом – подготовьте препараты на предметных стеклах и исследуйте их на наличие грибных структур, изменение цвета сосудов, посмотрите, наблюдается ли движение бактерий.

Анализы – выделите из лидирующего края, используйте метод приманок, проведите инкубацию, инокуляцию и используйте флотационный метод.

Просмотрите информационный листок по образцу – повреждения позвоночными вредителями (например, кроликами, оленями и т.д.), физические повреждения (например, стрижка газонов), повреждения, вызванные погодными условиями (например, качание на ветру, заморозки, засуха, применение каменной соли зимой), почвоулучшители и мульча, и т.д.

4.3.3 Стебли и стволы

Симптомы – проверьте наличие физических повреждений и ран, пораженных участков, язв, галлов, изменения цвета сосудов, повреждений беспозвоночными вредителями (например, червоточины, паутина, экскременты насекомых) и т.д.

Осмотр – ищите мицелий, плодовые тела, ядовитые грибы, трутовые грибы, сделайте поперечные и продольные срезы и т.д.

Осмотр под микроскопом – подготовьте препараты на предметных стеклах и исследуйте их на наличие грибных структур, изменение цвета сосудов или сердцевины, посмотрите, наблюдается ли движение бактерий.

Анализы – выделите из лидирующего края, проведите инкубацию, инокуляцию, используйте флотационный метод.

Просмотрите информационный листок по образцу – повреждение позвоночными вредителями (например, белками, оленями и т.д.), повреждения беспозвоночными вредителями (например, насекомыми – древоточцами), наблюдались ли какие-либо грибы или трутовики, физическое повреждение (например, повреждение от удара молнии).

4.3.4 Листья, цветы и плоды

Симптомы – осмотрите верхнюю и нижнюю поверхности и, в случае с крупными образцами, сделайте поперечные и продольные срезы для определения

масштаба поражения. Проверьте, имеет ли место какое-либо изменение цвета или пятна и установите их распространение (например, старое или новое образование, между жилками или в жилках, по краям, апикальные или дистальные, единичные, многочисленные, сросшиеся), деформация и изменение формы (нетипичные форма и цвет, обильное формирование волосков, искривленность и т.д.). Запротоколируйте, если пятна являются некротическими, хлорозными или пропитаны водой. Проверьте наличие физических повреждений и ран, пораженных участков, язв, галлов, повреждений беспозвоночными вредителями (например, червоточины, паутина, экскременты насекомых).

Осмотр – ищите мицелий, плодовые тела, мучнистую росу, ржавчинные грибы, слизевиков и т.д., посмотрите, наблюдается ли движение бактерий.

Осмотр под микроскопом – подготовьте препараты на предметных стеклах и исследуйте их на наличие грибных структур.

Анализы – выделите из лидирующего края, проведите инкубацию, инокуляцию, используйте флотационный метод.

Просмотрите информационный листок по образцу – применение пестицидов, повреждения, вызванные погодными условиями (например, град, заморозки, солнечный или ветровой ожог, принесенная ветром почва или песок).

5. Диагностика

Введение

В этом разделе приводится обзор ключевых методов, используемых для выявления и идентификации вредителей и болезней растений. Существует целый ряд методов, доступных для специалиста по диагностике – от визуального исследования под микроскопом до секвенирования ДНК. Дается общее руководство по процессу исследования и отбора образцов, а также по этапам проведения диагностики. Подробно описываются широко используемые методы, и приводятся несколько примеров по разным группам вредных организмов.

5.1 Методы диагностики

В этом разделе дается краткий обзор методов диагностики, которые можно использовать для идентификации вредных организмов, а также приводятся несколько примеров. Как правило, для любого конкретного вредного организма существует целый ряд диагностических методов, поэтому приводится руководство по определению наиболее подходящего метода с учетом инфраструктуры и потенциала кадровых ресурсов. Решающую роль в данном случае играет понимание вопроса, на который нужно дать ответ, уровень достоверности требуемой идентификации, сроки, в рамках которых вы работаете, стоимость и другие требования методики, а также количество образцов, анализ (диагностику) которых необходимо провести. Выбор метода – это зачастую компромисс между разными факторами, включая стоимость, специфичность, чувствительность и количество образцов.

5.1.1 Традиционный биотест

Как правило, эти анализы занимают больше времени и являются более трудоемкими, чем другие лабораторные

анализы, описанные ниже. Тем не менее, они все еще очень важны в диагностике; например, зачастую все еще требуется проведение анализа вирусов и вирионов на растениях-индикаторах, являющихся их хозяевами, для подтверждения результата лабораторного анализа. Биотесты обычно проводятся в разделенных на отсеки теплицах, защищенных от проникновения насекомых, а в некоторых климатических условиях потребуются парники из сетки для выращивания и содержания растений. Могут потребоваться климатические камеры, способные обеспечить контроль температуры, продолжительность освещения и дня для круглогодичной работы. Выбор растений-индикаторов для использования в повседневной диагностике зависит от типа растений и вредных организмов, анализ которых проводится. Рекомендуется постоянно поддерживать коллекции референтных материалов.

5.1.2 Морфологическая идентификация

Определение морфологии вредного организма – это фундаментальная часть всей фитосанитарной диагностики. Способность точно и быстро охарактеризовать вредные организмы – важна для понимания значимости выявленного вредного организма. Морфология – это сравнение идентифицируемого вредного организма с известными референтными материалами, которое позволяет интерпретировать наблюдаемые симптомы или свойства для осуществления идентификации. Часто после такой идентификации проводятся подтверждающие анализы, которые подтверждают идентификацию или дают дополнительные сведения, такие как сведения о конкретном виде. Степень использования морфологических методов зависит от направления диагностики. Морфология

5. Диагностика

может варьироваться от осмотра половых репродуктивных органов насекомых до изучения грибных структур под микроскопом и до изучения размера и цвета колоний бактерий.

5.1.3 Анализ метаболитов (в основном, при идентификации бактерий)

Большинство бактериальных возбудителей болезней могут быть выделены и выращены на средах, а затем подвергнуты анализу на состав метаболитов и свойства, обеспечивающие таксономической информацией. Традиционно эти методы включали в себя последовательность анализов, в основном, анализы на использование субстрата, которые опирались на дихотомический ключ, в результате чего на идентификацию уходило не дни, а недели. Эти методы также требовали высокого уровня технической компетенции для того, чтобы можно было получить воспроизводимые данные. Впоследствии были разработаны альтернативные форматы анализов на использование субстратов, такие как система «Biolog» (<http://www.biolog.com>), которая позволяет проводить более быструю и надежную идентификацию.

Еще одной коммерчески доступной системой является система «MIDI» (<http://www.midi-inc.com>), которая основана на идентификации и количественном анализе жирных кислот клеточных стенок. Как и в случае с системой «Biolog», идентификация может быть осуществлена через 48 часов после получения чистой культуры. Как система «Biolog», так и система «MIDI» – это коммерческие продукты, и к ним прилагаются обширные базы данных по видам бактерий. Уровень таксономической идентификации, получаемой при использовании этих систем, – одинаковый. Как правило, как система «Biolog», так и система «MIDI» позволяют проводить надежную идентификацию бактериальных возбудителей болезней растений до уровня вида. Более до-

стоверная и уточненная (т.е. до уровня патовара) идентификация может быть осуществлена для некоторых видов посредством добавления специфических профилей метаболитов образцов во внутренние базы данных этих систем.

5.1.4 Серологические методы

Серологические методы основаны на свойствах иммунных систем млекопитающих и птиц. Когда инородный материал (называемый «антиген»), такой как микроорганизм, белок или сложный углевод вводится в организм животного, иммунная система животного реагирует, образуя антитела в сыворотке крови. Эти антитела связываются исключительно с антигеном, вызвавшим их образование.

Многие патогены растений можно выявить, используя серологические или иммунологические методы. Эта технология особенно важна для диагностики и идентификации вирусов растений; простота молекулярной структуры вирусов позволяет получить высокоспецифичную реакцию. Однако такие методы также были разработаны для бактерий и таких более сложных организмов, как грибы.

Антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Поликлональные антитела называются так, потому что они состоят из множества антител с разной специфичностью, которые присоединяются к нескольким разным эпитопам (участкам связывания) антигена. Моноклональные антитела содержат многочисленные идентичные копии только одного антитела, которое присоединяется к одному специфическому эпитопу. Из-за этих свойств общее мнение о моно- и поликлональных антителах такое, что моноклональные тела обеспечивают большую специфичность, чем поликлональные антитела. Польза такого различия, к тому же, зависит от предполагаемого использования и вредного организма-мишени, а также от того,

существует ли потребность в высокой специфичности. Иммунологические анализы могут визуализировать связь «антитело-антиген» напрямую либо опосредованно.

Выявление количества антител или антигенов можно проводить разнообразными методами. Одним из наиболее общепринятых является метод маркировки антигена либо антитела. Маркировка может состоять из фермента, коллоидного золота (иммунохроматографические анализы), радиоизотопа, магнитного мечения или флуоресценции. К другим способам относятся: агглютинация, нефелометрия, турбидиметрия и вестерн-блоттинг.

Что касается иммунологических анализов, проводимых в лабораториях, большинство этих методов заменил метод ELISA (фермент-связанное иммуносорбентное исследование). В анализе ELISA неизвестное количество антигена закрепляется на поверхности, такой как 96-луночный микропланшет. Затем следует этап блокировки, чтобы предотвратить связывание с неспецифическим антителом. Затем специфическое антитело прикрепляется к поверхности для связывания с антигеном. Антитело связано с ферментом и на последнем этапе добавляется субстрат, который фермент может преобразовать в какой-нибудь обнаруживаемый сигнал. Например, при проведении флуоресцентного анализа ELISA, когда образец подвергается воздействию света соответствующей длины волны, любой комплекс «антиген – антитело» будет флуоресцировать. Интенсивность флуоресценции можно использовать для определения количества антигена, присутствующего в образце. ELISA остается одним из методов, наиболее широко используемых для выявления вирусов растений в повседневной практике, хотя методы амплификации нуклеиновых кислот в настоящее время

в повседневной практике используются чаще. Анализы ELISA – высокочувствительны, легко воспроизводимы, с их помощью можно установить количество патогена, и их проведение может быть автоматизировано. ELISA – это устойчивый анализ, который можно проводить почти в любой лаборатории, и для этого требуется минимальное обучение.

Несмотря на то, что у метода ELISA много преимуществ, к его недостаткам относится тот факт, что при помощи этого анализа можно выявить не все штаммы патогена, и что для многих организмов диагностические наборы ELISA еще не разработаны. Производство антител также может быть ресурсоемким, например, требующим использования живых животных, в отличие от методов ПЦР, для которых доступно огромное количество данных по последовательностям, и проведение анализов можно организовывать, используя персональный компьютер с доступом в интернет. Метод ELISA также менее чувствителен, чем ПЦР.

5.1.5 Методы выявления, основанные на выделении нуклеиновых кислот

Наука о выявлении вредных для растений организмов на основании нуклеиновых кислот получила стремительное развитие за последние 20–30 лет, и в литературе описывается много разных методов.

Говоря простыми словами, подавляющее большинство этих методов основано на знании о последовательности нуклеиновых кислот организма и заключении о таксономической специфичности (например, семейство, род, вид, штамм). На выбор метода большое влияние оказывает требуемый результат, особенно уровень требуемой специфичности и объем материала для анализа.

Последовательность нуклеиновых кислот любого организма состоит из участков, ставших стабильными

5. Диагностика

на разных этапах эволюции: высоко-, умеренно- и низко-консервативных последовательностей. Как правило, гены, кодирующие важнейшие процессы (такие как гены рРНК), – высоко консервативны, тогда как менее важные гены могут быть умеренно-консервативными и низко-консервативными с некодирующими участками. Эти различия в последовательностях не только обеспечили подтверждающими доказательствами существующую таксономическую классификацию организмов, но и привели к ее пересмотру. Эти же последовательности также формируют базу знаний для разработки коротких последовательностей нуклеиновых кислот, специфичных для таксонов (рода, вида и т.д.), которые можно использовать в качестве зондов в гибридизации или в качестве праймеров в методах, основанных на ПЦР (как описано ниже). Сегодня мы находимся на пороге революции в сфере полногеномного секвенирования, и объем данных по последовательностям, содержащимся в базах данных, таких как «GenBank», постоянно увеличивается, позволяя разрабатывать высокоинтеллектуальные методы диагностики.

Введение в некоторые основные и новейшие методы, основанные на нуклеиновых кислотах, применительно к фитосанитарной диагностике, приводится далее.

5.1.5.1 Выявление, основанное на гибридизации

Гибридизация основана на принципе соединения последовательностей нуклеиновых кислот организма-мишени (неизвестного) и тест-организма (известного) для того, чтобы произошел отжиг (гибридизация) гомологичных последовательностей, если они присутствуют, и возник обнаруживаемый сигнал. Обычно для этой процедуры требуется, чтобы нуклеиновая кислота мишени или тест-организма были прикреплены к физиче-

ской матрице, такой как нитроцеллюлозная мембрана. Детектирующим сигналом может служить излучение или, применяемая в последнее время, некоторая форма химической реакции, основанной на окрашивании. Последние разработки характеризуются значительными изменениями основных свойств физической матрицы и уменьшением размеров детектирующего устройства. Микроматричный анализ служит примером современного формата платформ для гибридизации, которые могут содержать десятки тысяч единиц гибридизации на «отпечатке» тест-системы «Eppendorf». В этих микроматричных системах последовательность каждой единицы детекции может быть смоделирована, и, таким образом, микроматричные анализы можно настроить под требуемую детекцию. Примером такого типа технологии для вирусов растений является проект «BioChip» Министерства окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Соединенного Королевства Великобритании и Северной Ирландии (<http://biochip.rvc.ac.uk/>), а на коммерческой основе – система «ClonDiag» (<http://www.clondiag.com>). Микроматричные анализы обеих этих систем, приведенных для примера, проводятся для идентификации одного образца.

Во многих случаях, чтобы дать ответ на вопрос, необходимо исследовать много образцов на выявление конкретного вредного организма карантинного значения. В этих обстоятельствах микроматричный анализ не подходит. Более приемлемым методом для анализа большого количества проб с высокой пропускной способностью является спот-гибридизация нуклеиновых кислот (NASH-гибридизация (nucleic acid spot hybridization)). При помощи этого метода много проб (часто импринт стебля) помещается на матрицу (нитроцеллюлозную мембрану), а затем наносится тест-зонд, специфичный для вредного организма-

мишени, в условиях, подходящих для гибридизации и формирования сигнала. Этот метод и его применение очень похожи на анализ ELISA и микропланшеты. Требуется опыт с NASH-гибридизацией для интерпретации сигнала и определения различия между очень слабым положительным сигналом и отпечатком, возникшим из-за изменения цвета, вызванного пробой.

5.1.5.2 Методы выявления, основанные на традиционной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени

Применение традиционной ПЦР и ПЦР в реальном времени для диагностики и определения характеристик вредных организмов играет важную роль в фитопатологии.

В полимеразной цепной реакции ведется экспоненциальное копирование матричной последовательности нуклеиновых кислот при помощи таких термостойких ферментов как Taq ДНК-полимераза в ходе циклов нагревания и охлаждения, во время которых имеет место денатурация и отжиг ДНК, соответственно. Направляемая природа ПЦР, в основном, определяется последовательностью нуклеиновых кислот, состоящей из коротких олигонуклеотидов, называемых праймерами, которые работают парами для «запуска» ПЦР-реакции, а также температурой отжига. Последовательность праймера определяет участок матричной ДНК, который будет амплифицирован. Когда информация о последовательности известна, праймеры могут быть сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать участки-мишени; в других случаях они могут конструироваться для амплификации в произвольном порядке. ПЦР РНК-мишеней, таких как вирусы, требует проведения этапа обратной транскрипции для получения кДНК из матричной РНК

перед амплификацией ДНК. Общее описание полимеразной цепной реакции (ПЦР) предоставлено НЦБИ. Документ доступен по ссылке: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Ключевым результатом ПЦР является образование большого количества копий ДНК с последовательностью, идентичной матрице. В зависимости от строения праймеров в результате ПЦР можно получить один или много продуктов амплификации разных размеров. Затем амплифицированную ДНК можно использовать в дальнейшей работе (рестрикционном анализе, секвенировании, мечении) или визуализировать. Традиционно продукты ПЦР визуализируются на агарозном геле. Однако ПЦР в реальном времени, эволюционировавшая из традиционной ПЦР, позволяет проводить анализ продуктов в реальном времени посредством контроля химической реакции, протекающей одновременно с амплификацией. В ПЦР в реальном времени зонд, помеченный информативным красителем, прикрепляется между праймерами. При амплификации краситель активируется, приводя к формированию информативного сигнала. Для измерения этого сигнала нет необходимости открывать ПЦР-пробирку, что значительно уменьшает какую-либо возможность перекрестной контаминации.

В большинстве примеров диагностика, основанная на ПЦР, опирается на получение одного продукта амплификации, визуализируемого на агарозном геле или посредством флуоресцентного считывания и фиксируемого как положительный или отрицательный результат. К тому же, при проведении более обдуманной ПЦР-диагностики будет использоваться внутренний контроль для проверки того, что реакция протекает так, как предусмотрено, наряду со стандартными контролями, которые используются для детекции лож-

5. Диагностика

но положительных и ложно отрицательных результатов. В традиционной ПЦР внутренний контроль должен продуцировать фрагмент, по размеру отличающийся от фрагмента ДНК вредного организма, а в ПЦР в реальном времени – должен использовать иную химию красителей. Некоторые методы ПЦР также включают в себя определение количества патогена на основании интенсивности сигнала по сравнению с внутренним стандартом.

Другие методы диагностики, основанные на ПЦР, используют отпечаток фрагментов амплификации, который характеризуется и известен как специфический для организма. Дальнейшая и основная сфера применения ПЦР и диагностики – это секвенирование амплифицированного фрагмента и затем сравнение этой последовательности с известными последовательностями, имеющимися в «GenBank» или собственной библиотеке последовательностей ДНК, используя такой инструмент как компьютерная программа «BLAST».

Проведено много исследований, целью которых было сравнить методы ПЦР и ELISA. Опыт большинства лабораторий свидетельствует о том, что метод ПЦР в реальном времени в десять раз более чувствителен, чем традиционный метод ПЦР, и в сто раз чувствительнее ELISA. Однако для обоих анализов – как ПЦР, так и ПЦР в реальном времени требуется специальное оборудование и расходные материалы; и хотя их стоимость и снижается, она все равно превышает расходы на ELISA, что может быть ограничивающим фактором в части, касающейся начальных капитальных и текущих расходов.

5.1.5.3 Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)

Как было упомянуто выше, один из недостатков ПЦР – это стоимость специализированного оборудования, необхо-

димого для проведения четко контролируемого термоциклирования, а в случае с ПЦР в реальном времени, одновременного контроля флуоресценции. Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) – это метод детекции специфических последовательностей нуклеиновых кислот, который потенциально может преодолеть многие ограничения методов, основанных на ПЦР. Благодаря способности LAMP амплифицировать целевую последовательность нуклеиновых кислот в изотермических условиях отпадает потребность в оборудовании для термоциклирования, что позволяет проводить анализы с использованием минимального количества оборудования (водяного термостата или термоблока). Кроме того, упрощенные методы детекции продуктов амплификации способствуют использованию методов, основанных на LAMP, в полевых условиях или в условиях меньшей обеспеченности ресурсами.

LAMP – это метод амплификации, использующий две пары праймеров (внутренние и внешние праймеры) и ДНК-полимеразу, осуществляющую замену цепочки с целью производства продуктов амплификации, содержащих петлеобразные участки, с которыми затем праймеры могут связаться, что позволяет амплификации продолжиться без термоциклирования. Амплификация ускоряется при помощи использования дополнительного набора праймеров (петлевые праймеры), связывающихся с этими петлями, которые ориентированы неправильно, что не позволяет внутренним праймерам соединиться с ними. Причиной высокого уровня специфичности является требование, чтобы праймеры присоединили до 8 участков последовательности-мишени. Метод LAMP используется для выявления ряда фитопатогенов.

Реакции LAMP синтезируют большое количество продукта амплификации, де-

текцию которого можно провести при помощи традиционного электрофореза в агарозном геле, используя спектрофотометрическое оборудование для измерения плотности раствора, в реальном времени используя интеркалирующие флуоресцентные красители или визуально оценивая изменения плотности и цвета. Тогда как преимущество методов детекции, основанных на визуальном осмотре, заключается в том, что для них не требуется никакого оборудования, оценка цвета или плотности раствора невооруженным глазом является потенциально субъективной. Методы, не требующие наличия оборудования, используемые для однозначной детекции продуктов реакции LAMP, позволили бы расширить практическое применение LAMP для выявления фитопатогенов за пределами лаборатории. Одним из таких методов является использование компактных мобильных наборов LFD (анг. lateral flow devices / иммунохроматографические устройства) для детекции меток, встроенных в продукты амплификации.

Как и ПЦР метод LAMP можно использовать для детекции РНК-мишеней посредством включения этапа обратной транскрипции для синтеза кДНК из матрицы РНК до начала амплификации; обратная транскрипция и LAMP могут проводиться в одной пробирке при одной температуре. Поэтому к значительным преимуществам LAMP относятся следующие: (i) возможность проводить реакции амплификации в изотермических условиях, при этом исключается потребность в термоциклическом оборудовании; (ii) высокая специфичность является неотъемлемой частью механизма, который требует узнавания шести участков (или восьми участков, если используются петлевые праймеры) последовательности-мишени для того, чтобы произошла амплификация; и (iii) эффективность амплификации, которая синтезирует очень большое количество

продукта менее чем за 1 час, позволяя использовать новые стратегии детекции.

5.1.5.4 Пиросеквенирование и секвенирование следующего поколения

Подходы, использующие ПЦР и LAMP, руководствуются знаниями о последовательностях, необходимых для создания праймеров, а также на базовом понимании того, каковым является возбудитель заболевания. Одним из ограничивающих факторов опоры на знания о последовательностях является ситуация, когда делается попытка идентифицировать новый вредный организм или подтвердить, что в материале вредные организмы отсутствуют. В этих случаях необходимо использовать один или более наборов праймеров с широкой таксономической специфичностью с надеждой, что они выявят вредный организм, если таковой присутствует. Однако при использовании этого подхода получение отрицательного результата не снимает неопределенности, поскольку неизвестный вредный организм генетически может очень отличаться, а участкам-мишеням праймеров может не хватать достаточной гомологии, чтобы могла начаться ПЦР. Новый подход к диагностике, особая ценность которого заключается в идентификации неизвестных вредных организмов и подтверждении того, что материал не заражен вредными организмами, – это секвенирование следующего поколения, использующее универсальные праймеры и праймеры, направленные на произвольно выбранные мишени, для широкомасштабной амплификации всех нуклеиновых кислот в пробе. Короткие продукты амплификации затем секвенируются, и для анализа этих небольших последовательностей и их соединения в последовательности, длина которых имеет потенциальное таксономическое значение, используется высокотехнологичное компьютерное про-

5. Диагностика

граммное обеспечение. Идентичность построенных последовательностей затем можно проверить, осуществив поиск в известных базах данных по последовательностям. Эта технология – узкоспециализирована, ее применение будет иметь место только в нескольких лабораториях и будет обосновано только в исключительных случаях.

5.1.6 Выбор подходящего метода диагностики

Как только возникает необходимость в проведении идентификации патогена, необходимо уделить внимание выбору подходящего метода диагностики. Также следует уделить внимание оценке ресурсов для проведения анализов, которыми лаборатория располагает в настоящее время или которыми могла бы располагать. Наличие отдельных единиц оборудования, например, прибора для ПЦР в реальном времени, может быть одним из первых вопросов для рассмотрения, но дополнительно следует подумать и о других факторах, относящихся к более широкому спектру ресурсов, включая наличие сотрудников и их соответствующие компетенции, площадь лаборатории и постоянное техническое обслуживание капитального оборудования. Затем следует учесть специальные требования к анализу, такие как чувствительность, специфичность и устойчивость, относительно выхода данных по анализу (данные по последовательностям, данные по жизнеспособности, качественные и количественные результаты). И наконец, также следует учесть такие практические вопросы, как время, необходимое для получения результата, и стоимость отдельных анализов. Затем, принимая во внимание все эти факторы, можно начать изучать литературу для поиска различных существующих методов диагностики. Полезно начать с поиска в интернете, а затем в библиографической базе данных, обычно с учетом типа требуемого метода и целевого патогена.

5.2 Верификация новых методов

Как только будет выбран подходящий метод диагностики, лаборатории потребуется произвести верификацию того, что она сможет компетентно провести анализ. В соответствии с ИСО 17025:2005 «лаборатория должна подтвердить, что она может правильно использовать стандартные методы, прежде чем приступить к испытаниям или калибровке». Этот процесс отличается от валидации, которая является «подтверждением посредством исследования и предоставления объективного доказательства того, что выполняются определенные требования к специфическому предполагаемому использованию» (Вайгерс / Weigers 2003, стр. 303). Верификация подразумевает проведение ряда экспериментов с использованием материала положительных и отрицательных контролей с целью обеспечения того, что лаборатория может достичь приемлемых предела обнаружения и повторяемости анализа.

5.3 Обучение персонала лаборатории

Для успешной и надежной диагностики вредных для растений организмов, важно, чтобы персонал имел (i) надлежащую подготовку, (ii) возможность нарабатывать опыт и (iii) мог продемонстрировать компетентность. Может потребоваться ряд обучающих занятий прежде, чем наставник и стажер согласятся, что стажер – компетентен выполнять задачи без контроля за ним; все учебные занятия должны быть задокументированы. Как правило, предполагается, что специалисты по диагностике должны проработать в диагностической лаборатории не менее двух лет прежде, чем они попытаются осуществить полную диагностику (из-за огромного количества растений, вредных организмов, симптомов; опыт – это ключ к выполнению качественной диагностики).

Все этапы обучения должны фиксироваться документально и должны охватывать:

- Этап 1. Чтение соответствующих инструкций (например, СОП);
- Этап 2. Наблюдение за выполнением задачи, осуществляемым обученным штатным сотрудником;
- Этап 3. Выполнение задачи под контролем;
- Этап 4. Оценка компетентности выполнять задачу без контроля.

Во всех возможных случаях подтверждающие данные или опыт, используемые как часть процесса оценки компетенции, должны быть документально зафиксированы. Компетенция оценивается посредством использования, по мере возможности, хотя бы одного из следующих способов:

- эксперименты по диагностике намеренно зараженного образца;
- повторный анализ образцов, диагностика которых была уже ранее проведена;
- анализ референтных материалов или материалов для квалификационного тестирования;
- сравнение результатов наставника и стажера.

Критерии приемлемости документируются и, как правило, устанавливаются на уровне допустимых пределов контроля качества. Дата разрешения на выполнение задач без контроля указывается на оценочном формуляре наряду с подтверждением руководителя подразделения. Руководители подразделений должны гарантировать, что представленные и задокументированные доказательства являются верными и надлежащими.

Лаборатории будут часто стараться участвовать в схемах квалификационного тестирования. Квалификационное тестирование определяет качество выполнения отдельными лабораториями конкретных анализов или измерений и используется для осуществления контроля качества работы, постоянно про-

водимой лабораториями. Также оно непрерывно предоставляет подтверждающие данные о компетенции отдельного специалиста.

5.4 Методики проведения диагностики

Цель этого раздела – ознакомить с методиками, необходимыми для выделения и идентификации предполагаемого вредного для растений организма. Никим образом в нем не приводится исчерпывающее руководство по идентификации вредных для растений организмов.

5.4.1 Бактериология

Представление о фитопатогенных бактериях можно получить, ознакомившись с работой Видавера А.К. и Ламбрехта П.А. «Бактерии как возбудители болезней растений». Журнал «Справочник по здоровью растений». 2004 г. / Vidaver, A.K. & Lambrecht, P.A. 2004. Bacteria as plant pathogens. The Plant Health Instructor. (Идентификатор цифрового объекта (DOI): 10.1094/PHI-I-2004-0809-01). Статья доступна по ссылке: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/bacteria.aspx> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Работа должна проводиться в лаборатории, располагающей приемлемыми условиями изоляции для работы с карантинными вредными организмами.

Требуется следующее оборудование:

- препаровальные лотки;
- скальпели, ножи и секаторы;
- 70%-ный этиловый спирт;
- рулон протирочной бумаги / протирочные салфетки;
- небольшой источник огня;
- стерильные одноразовые 90-миллиметровые чашки Петри;
- 0,1%-ный стерильный пептон или 0,85%-ный раствор NaCl;
- стерильные одноразовые инокуляционные петли объемом 1 μ л и 10 μ л;
- стерильная дистиллированная вода;

5. Диагностика

- питательная среда;
- инкубаторы (28°C и $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, а также $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- пакеты для автоклавирования.

5.4.1.1 Диагностика

Диагностика бактерий, возбудителей болезней растений, включает в себя осмотр, выделение, идентификацию и подтверждение. Идентификация может проводиться на уровне рода, вида или подвида.

Бактериальные инфекции, поражающие растения, часто бывают сезонными. Также на них влияют климатические условия и агротехнические практики. Хорошие фоновые знания этих факторов необходимо приобретать в течение нескольких вегетационных периодов.

Описания симптомов и методов выделения и подтверждения наиболее распространенных бактериальных болезней растений можно найти в книге «Методы диагностики бактериальных болезней растений» / *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants* (Леллиот и Стэд / Lelliot and Stead, 1991 г.), которая представляет собой важный справочный материал. Другие полезные и важные справочные материалы приводятся в разделе 5.5.1.3.

Со всеми известными образцами, имеющими симптомы, следует обращаться как с карантинным материалом, и утилизация отходов должна соответствовать местным процедурам.

Специалист по диагностике должен подробно описать симптомы в лабораторной ведомости, включая диаграммы, в соответствующих случаях. Можно сделать фотографии перед проведением работ, разрушающих образцы.

Выделение

- Со ссылкой на литературу принимается клиническое решение касатель-

но того, какие роды бактерий, как известно, вызывают проявление симптомов у этого хозяина.

- Отрежьте небольшое количество ткани от лидирующего края с симптомами (где здоровая ткань растения соприкасается с тканью с симптомами), используя стерильные скальпели. Если лидирующего края нет, то выделение можно попробовать провести из другой части растения, где, вероятнее всего, будет много бактерий.
- Замочите иссеченный материал в нескольких каплях стерильного (1%-ного) пептона или соляного раствора (0,85%-ного раствора NaCl), используя стерильную чашку Петри в качестве чистой поверхности, оставьте на несколько минут перед тем, как сделать посев «штрихом» на среду.
- Первичное выделение лучше всего проводить на низко-питательной среде, чтобы подавить быстрый рост сапрофитов. Большинство бактерий можно успешно выделить на питательном агаре, однако, более селективная, более богатая питательная среда может быть рекомендована в случаях, когда предполагается присутствие конкретных родов.
- Укажите диагностический справочный номер и дату на основании чашки с агаром (не на крышке).
- Осуществите посев «штрихом» иссеченного материала на питательную среду. Инкубируйте чашки с инокулятом. Большинство родов фитопатогенных бактерий инкубируют при температуре $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. Однако, если осуществляется выявление определенных бактерий, могут потребоваться другие температуры (например, $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ или $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Для других медленно растущих бактерий также могут потребоваться более длительные сроки инкубации.

Идентификация

- Осмотрите чашки с питательной средой после соответствующего периода инкубации (48–72 часа) для выявления типичных бактериальных колоний предполагаемых фитопатогенов.
- В качестве руководства следует отметить, что большинство колоний потенциально искомым патогенов, скорее всего, будет наиболее многочисленным, но необязательно это будут первые видимые колонии, которые появятся через 24 часа.
- Если никакие предполагаемые бактериальные возбудители болезней не выделены, проведите повторную оценку описания симптомов и примите клиническое решение касательно того, вызван ли симптом заражением организмами, не являющимися бактериями, или он имеет физиологическую причину.
- Когда бактериальная инфекция не установлена, записывается заключение: «Первичные фитопатогенные бактерии из представленного образца не выделены».
- Отделите предполагаемые патогены от смешанных популяций посредством пересева на соответствующую свежую среду и повторно инкубируйте при подходящей температуре.
- Если колонии все еще смешаны, используя инокуляционную петлю объемом 1 $\mu\text{л}$, возьмите небольшое количество смешанной колонии и перерастворите ее в 5 мл дистиллированной воды, затем, используя петлю объемом 10 $\mu\text{л}$, сделайте посев «штрихом» на свежую среду.
- В случае с чистой культурой посейте ее на более богатую среду, такую как среда Кинга Б, поскольку она обеспечит более обильный рост и может лучше поддержать жизнеспособность культуры.
- В целом, при краткосрочном хранении (1–3 недели) выращенные куль-

туры хранятся при 5°C или при комнатной температуре на агаре. Для длительного хранения необходимо подготовить глицериновые стоки с бактериальной культурой на керамических шариках при температуре –20°C или –80°C.

- Если удалось хорошо провести выделение колоний предполагаемых патогенов, следует переходить к этапу идентификации.
- Перед тем, как перейти к проведению специализированных анализов (таких как анализ профиля жирных кислот или ПЦР), может быть полезно провести анализ по методу Грама (например, анализ с гидроксидом калия (KOH)), оценку морфологии и пигментации колонии, анализ анаэробного роста, оценку споруляции и оксидазный анализ, которые могут помочь различить некоторые распространенные роды.

Подтверждение (постулаты Коха)

- Полное подтверждение – это проявление патогенности бактерии на требуемом хозяине с симптомами, соответствующими первоначально описанным, и последующее успешное повторное выделение бактерии из этого хозяина и ее повторная идентификация.
- Для подтверждения введите инокулят очищенной свежей идентифицированной бактериальной культуры в здоровые растения на корню, принадлежащие соответствующему виду растений-хозяев, и выращивайте их одновременно с незараженными контрольными растениями.
- Выращивайте инокулированные растения и наблюдайте за развитием симптомов.
- Проведите повторное выделение из тканей с развившейся симптоматикой.
- Подтверждение завершено, когда бактерия выделена из хозяина и идентифицирована.

5. Диагностика

- Необходимо провести полную идентификацию предположительно карантинного организма или нового, или необычного обнаруженного организма, статья о котором заслуживает публикации в рецензируемом научном издании.

5.4.2 Микология

Представление о фитопатогенных грибах можно получить, ознакомившись с документом «Руководство по диагностике болезней растений во Вьетнаме», раздел 7 «Таксономия грибов фитопатогенов» / Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. Section 7. Fungal taxonomy and plant pathogens, который доступен по ссылке: http://aciar.gov.au/files/node/8613/MN129_part4.pdf (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Работа должна проводиться в лаборатории, располагающей приемлемыми условиями изоляции для работы с карантинными вредными организмами.

Требуется следующее оборудование:

- препаративные лотки;
- скальпели и бритвы с односторонними лезвиями;
- препаративные иглы или одноразовые гиподермальные иглы;
- пинцеты;
- стеклянные предметные стекла для микроскопа;
- стеклянные покровные стекла №2 (18x18, 22x22 и 18x50 мм или другие, в зависимости от конкретного случая);
- прозрачная самоклеящаяся лента (скотч);
- заливочная среда: лакто-глицерин;
- окрашивающие вещества: трипановый / хлопковый синий в лакто-глицерине;
- чашки Петри, содержащие картофельный агар с декстрозой (КАД) или другая соответствующая среда;
- термостойкие пробирки;

- небольшой источник огня;
- химические вещества для кипячения корней: гидроксид натрия или гидроксид калия (КОН);
- гранулы-«кипелки», при наличии таковых.

5.4.2.1 Диагностика

Важно точно описать симптомы до проведения исследования (которое зачастую является инвазивным и разрушающим), а затем приготовить материал для исследования под биологическим микроскопом с целью идентификации любых грибных структур. Также можно подготовить чистые культуры для содействия идентификации.

Первичный осмотр

Посмотрите в информационном листке, заполненном клиентом, подробные сведения о хозяине, стране происхождения, уровне зараженности в процентном выражении и комментарии.

Осмотрите образец невооруженным глазом и отметьте все его повреждения, такие как:

- явно сухие и отмершие ткани;
- изменение цвета листьев:
 - пожелтение (хлороз);
 - побурение (некроз);
 - окрашенный налет;
- пятна или дырки в листьях:
 - симметричные;
 - неправильной формы;
 - с хлоротическим или обесцвеченным ореолом;
- деформация или задержка роста листьев или побегов;
- побурение стебля или образование язв;
- отставшая в росте, искривленная, почерневшая или подгнившая корневая система;
- твердость клубней, луковиц или плодов;
- липкий экссудат, гуммоз.

ЗадOCUMENTИРУЙТЕ степень и местоположение всех таких повреждений, указанных выше, и затем поместите образец под препаровальную лупу и установите наименьшее увеличение. Медленно осмотрите здоровую ткань, чтобы можно было распознать наличие незараженной ткани (особенно листьев). Затем осмотрите зараженный материал на выявление любых грибных структур, документально фиксируя их расположение, встречаемость, форму и отношение к пораженным участкам. Решите, существует ли закономерная связь грибных структур с симптомами.

Обнаружив грибную структуру, установите большее увеличение (до порядка 50-кратного), чтобы определить ее морфологию (мицелий, конидиофор, спородохий, пикнида, спорогонный мицелий, апотеций, клейстотеций, перитеций и т.д.), пигментацию (гиалиновая – бесцветная, ярко окрашенная или дематриодная – темно окрашенная) и местоположение структуры на растении (на поверхности, прорастающая, частично прорастающая, выпуклая, утопленная, прорастающая из устьица, поры и т.д.). После осмотра поверхности хозяина может возникнуть необходимость разрезать образец (особенно это касается клубней, луковиц, корней, стеблей и плодов) для того, чтобы определить глубину проникновения или степень повреждения.

Если установлено, какой участок следует исследовать, переходите к изучению материала с использованием светового биологического микроскопа.

Плодовое тело присутствует

Поместите небольшую каплю лакто-глицерина (с красителем или без него) на поверхность чистого стеклянного предметного стекла для микроскопа. Поместив материал образца под препаровальную лупу, осторожно возьмите пробу из нескольких предполагаемых грибных

плодовых тел кончиком тонкого лезвия скальпеля или препаровальной иглы, продезинфицированных в пламени спиртовки, или новой стерильной гиподермической иглы. Изучите предметное стекло под препаровальной лупой, чтобы удостовериться, что структуры были успешно перемещены и правильно размещены для осмотра (излишки материала хозяина на этом этапе также могут быть удалены при помощи препаровальной иглы). Осторожно опустите стеклянное покровное стекло соответствующего размера на предметное стекло и слегка прижмите его, чтобы удалить все пузырьки воздуха. Если необходимо, придерживая предметное стекло за край, осторожно нагрейте его над пламенем спиртовки до тех пор, пока все воздушные полости не начнут расширяться, уберите предметное стекло от огня и положите на рабочую поверхность стола для охлаждения. Это удалит все воздушные полости, которые могут появиться в дальнейшем, также поможет очищению тканей заливочной средой. Перенесите предметное стекло под световой биологический микроскоп.

Воздушный мицелий, химический налет или неизвестные структуры

Отрежьте небольшой кусочек прозрачной клейкой ленты, такой как скотч (длиной до 30 мм), и клейкой стороной приложите к материалу образца, затем мягко прижмите ленту. Образец патогена должен был приклеиться к ленте. Поднимите ленту и затем поместите желаемую часть (клейкой стороной вниз) на маленькую каплю лакто-глицерина на стеклянном предметном стекле для микроскопа. Мягко прижмите, чтобы удалить пузырьки воздуха, а затем нагрейте очень осторожно, чтобы не допустить кипения, которое может растворить клейкий материал. Дайте предметному стеклу остыть и перенесите его под биологический микроскоп.

5. Диагностика

Наличие каких-либо структур не наблюдается, но предполагается присутствие грибов

Сделайте тонкий поперечный или продольный срез ткани хозяина (с листьев, стеблей, корней, клубней и луковиц) при помощи скальпеля или бритвы с односторонним лезвием, поместите его в каплю красителя трипанового / хлопкового синего в лакто-глицерине на предметном стекле для микроскопа. (Краситель трипановый / хлопковый синий используется, потому что он помогает отличить материал хозяина от грибного материала; последний обычно окрашивается в более темный синий цвет). Осторожно опустите покровное стекло и нагрейте предметное стекло, как описано выше. Перенесите предметное стекло под биологический микроскоп.

Тонкие молодые корни можно исследовать целиком; однако любые старые, более жесткие корни придется кипятить, чтобы позволить красящему веществу проникнуть в ткань и окрасить любые грибные споры, содержащиеся в ней. Подготовьте такие корни путем кипячения, как описано ниже.

Кипячение корней для проведения осмотра

- Выберите предположительно зараженный участок корней, избегая, если это возможно, чрезмерно загнивших или распадающихся корневых нитей. Отрежьте кусочки корня длиной 3-6 см в количестве, соответствующем размеру образца.
- Поместите корни в большую термостойкую пробирку, заполните ее водой в количестве, не превышающем 2,54 см от дна пробирки, и добавьте 4-6 гранул «кипелок» (если таковые имеются). Эти гранулы не очень важны, но они помогают минимизировать риск выплескивания горячего содержимого из пробирки.

- Добавьте 2-3 гранулы гидроксида натрия или КОН. (Не берите эти гранулы голыми пальцами.)
- Используйте держатель для пробирок, чтобы держать кипящую пробирку над горелкой Бунзена или газовой горелкой на среднем огне (спиртовая горелка не достаточно горячая, поэтому не используйте ее) и кипятите корни в течение нескольких минут для их размягчения и очищения, а затем снимите с огня.
- Поместите термостойкую пробирку в пробирочный штатив до тех пор, пока она не охладится в достаточной степени, чтобы можно было вынуть образец для осмотра.
- Как только образец остынет, поместите его в пустую чашку Петри, чтобы облегчить выбор корня.
- Используя пинцет, поместите пробу небольшого количества прокипяченного корня на предметное стекло и добавьте 1-2 капли красителя трипанового / хлопкового синего в лакто-глицерине.
- Поместите большое прямоугольное (22x64 мм) покровное стекло на корни.
- Мягко похлопайте по покровному стеклу, чтобы примять корни для осмотра.

Изучение препарата под биологическим микроскопом

- Если необходимо, настройте биологический микроскоп для оптимального разрешения и четкости изображения.
- Выберите малое разрешение объектива (например, 10-кратное) и поместите образец.
- Осмотрите образец при малом разрешении и убедитесь, что структуры являются грибными.
- Убедитесь в том, присутствуют ли споры, и определите, как они образуются, например, из мицелия, внутри плодового тела.

- Если расположение плодового тела установлено, запишите его внешнюю морфологию и параметры, а затем попытайтесь вытолкнуть его содержимое, мягко надавливая на покровное стекло тупой препаровальной иглой. Это можно очень осторожно сделать на предметном столике микроскопа, продолжая наблюдение при 10-кратном увеличении, либо снять предметное стекло с микроскопа, поместить его на рабочую поверхность стола и очень мягко постучать по покровному стеклу карандашом.
- Повторно проведите осмотр при большом увеличении и опишите морфологию спор и спорообразующих структур.
- Может возникнуть необходимость сделать тонкий срез плодового тела, если нечетко видно прикрепление спор. Это можно сделать с помощью острой бритвы с односторонним лезвием или скальпеля.
- Сравните морфологию и первичный предположительный результат диагностики образца со справочной информацией.
- Окончательная диагностика возможна на этом этапе; также воспользуйтесь предлагаемыми выбранными справочными источниками для действия диагностике.
- Если грибной образец нельзя достоверно идентифицировать (по какой-бы то ни было причине), в таком случае перейдите к выращиванию культуры предполагаемого гриба на питательной среде для того, чтобы упростить идентификацию.

Выделение грибов из растительного материала

Первичное выделение может проводиться на агаре с проточной водой. Кроме того, подавляющее большинство широко распространенных фитопатогенов и грибов, приводящих к порче, будут

очень хорошо расти на КАД. Его можно приготовить из коммерческого препарата. Для первого выделения в среду можно добавить антибиотики, такие как пенициллин и стрептомицин, для нейтрализации любых бактерий. Температуру инкубирования можно выбрать на основе того, что известно о грибе; наиболее распространенные фитопатогены достаточно хорошо растут при 17-22°C.

- Прозеинфицируйте скальпель на огне или используйте новую бритву с односторонним лезвием, чтобы отрезать небольшой кусочек (максимум 2–3 мм) ткани от лидирующего края пораженного участка стебля, внутреннего некроза или пятна на листе.
- Если вы не устанавливаете присутствие *Phytophthora*, поместите часть образца в 10%-ный раствор гипохлорита натрия на 2–5 минут. Или же замочите материал в 50%-ном этиловом спирте на 10 секунд. (Этот метод может использоваться даже в случае, если предполагается присутствие *Phytophthora*). Ополосните стерильной дистиллированной водой и просушите между бумажными полотенцами.
- Укажите справочный номер образца и дату на основании чашки с агаром. Если берется ткань с более чем одного типа поражения, сделайте соответствующие пометки на чашке. Поместите ткань на агар в каждую чашку, позаботившись о том, чтобы кусочки были равномерно распределены.
- Инкубируйте в течение 5–7 дней, проводя осмотр каждые два дня для отслеживания роста культуры, и для того, чтобы посмотреть, является ли культура чистой. На ранней стадии инкубирования ее можно пересадить на свежую среду, если вместе с ней растет нежелательный организм.
- Если необходимо, посмотрите предлагаемые справочные источники для того, чтобы получить информацию о

5. Диагностика

любых дополнительных специальных методах выращивания культур на питательной среде, которые могут понадобиться для последующей идентификации.

Выделение грибных спор или плодовых тел

Возьмите образец инокулята подходящего размера. Целесообразно оставить небольшое количество оригинального грибного материала на образце на случай, если выделение первой культуры будет неудачным. Поместите инокулят гриба в центр чашки Петри со средой КАД. Инкубируйте и проверяйте рост гриба каждые два дня до тех пор, пока колония не произведет споры. Для предотвращения высыхания агара чашки Петри можно запечатать парафильмом или хранить в неплотно закрытом пакете.

5.4.3 Вирусология

Представление о фитопатогенных вирусах можно получить, ознакомившись с работой Гергерича Р.С. и Долья В.В. 2006 г. «Введение в вирусы растений, невидимый враг». Журнал «Справочник по здоровью растений» / Gergerich, R.C. & Dolja, V.V. 2006. Introduction to plant viruses, the invisible foe «The plant health instructor» (Идентификатор цифрового объекта (DOI): 10.1094/PHI-I-2006-0414-01). Документ доступен по ссылке: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/pages/PlantViruses.aspx> (последний доступ осуществлен 21 сентября 2015 г.).

Работа должна проводиться в лаборатории, располагающей приемлемыми условиями изоляции для работы с карантинными вредными организмами.

5.4.3.1 Диагностика

Осмотрите материал образца невооруженным глазом и отметьте все симптомы, такие как:

- атипичный цвет;
- карликовость или задержка роста;
- изменение цвета листьев, например, хлороз, мозаика, пятнистость, кольцевая пятнистость, пожелтение или некроз жилок;
- деформация листьев, например, искривление, сужение или эпинастия;
- пигментация на стеблях, плодах и корнях;
- другие симптомы, такие как увядание или потеря листьев.

Симптомы и фоновая информация, такая как виды хозяев, наряду с опытом специалиста по диагностике, дадут представление о потенциальном возбудителе. Однако потребуются провести дальнейшие диагностические анализы, чтобы подтвердить присутствие определенного вируса. Ввиду своей природы вирусы, как правило, диагностируются посредством инокуляции растений-индикаторов, серологических анализов и анализов, основанных на нуклеиновых кислотах. Также можно использовать электронный микроскоп, но это требует доступа к дорогому специализированному оборудованию и наличия обученного персонала.

Инокуляция хозяина-индикатора

Вирусы могут распространяться только через повреждения. В случае с растениями механическая инокуляция – это метод, используемый для их выявления и диагностики. Однако важно отметить, что не все вирусы переносятся с соком растений.

Инокулят предполагаемого образца вводится в здоровые травянистые растения-индикаторы, и все симптомы, которые могут развиваться на этих индикаторах, записываются спустя некоторый период времени, который может растянуться на дни или недели. В зависимости от реакций на разных растениях-индикаторах специалист по диагностике может поставить конкретный диагноз. Суще-

стует целый ряд вариаций метода механической инокуляции в зависимости от определенного вируса, присутствие которого предполагается, или хозяина, на котором он появляется. В результате, используется многообразие разных растений-индикаторов и экстракционных буферов.

Требуемое оборудование:

- чистые пестик и ступка;
- буферы для измельчения, например, фосфатный буфер pH 7,0⁴;
- этикетки для горшков;
- карандаш;
- поднос;
- здоровые виды-индикаторы;
- материал образца;
- целит (диатомовая земля);
- микрошпатель;
- промывалка с проточной водой;
- ведро, наполненное раствором гипохлорита натрия;
- протокол лабораторных испытаний;
- ватная палочка;
- пипетка переменного объема 1–5 мл;
- микродозаторы;
- пакеты для измельчения.

К растениям-индикаторам, как правило, будут относиться *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana occidentalis* P1, *Nicotiana benthamiana* и *Nicotiana clevelandii*. Другие растения также можно добавить в зависимости от хозяина, анализ которого проводится, и предполагаемого вируса. Выбирайте растения, имеющие не менее шести настоящих листьев (кроме огурца, у которого должен быть один настоящий лист, и фасоли обыкновенной, у которой должны быть только семядоли). Поместите растения-индикаторы в темное место на 12–24 ч. до инокуляции, чтобы увеличить их восприимчивость. Выберите на растении-индикаторе от двух до четырех листьев хорошего размера.

Пометьте листья, в которые будет вводиться инокулят, проделав дырочку на кончике каждого из выбранных листьев, используя чистый микродозатор.

Инокулят готовится посредством измельчения растительного материала в буфере (и таком абразивном порошке, как целит). Инокулят затем мягко втирается в помеченные листья растений-индикаторов и смывается водой спустя 3–5 минут. Отрицательный (только буфер для инокуляции) и положительный (вирус, который является умеренно трансмиссивным и производит четкие симптомы на растениях-индикаторах) контроли должны быть включены в каждую партию инокуляций. Обратите внимание, что после каждой инокуляции рабочую поверхность стола и оборудование необходимо продезинфицировать раствором гипохлорита натрия. Инокулированные растения должны быть помещены в теплицу с температурой 15–18°C и инкубироваться в течение 4–28 дней. Растения должны осматриваться два раза в неделю на выявление симптомов и ведения записи результатов.

Симптомы должны оцениваться с использованием следующих критериев:

- хозяин;
- используемые растения-индикаторы;
- реакции этих растений-индикаторов; как локальные, так и системные поражения;
- время, ушедшее на появление реакции.

Анализ на вирусы с использованием ELISA

ELISA – это иммунологический метод диагностики определенных вирусов растений, разработанный Кларком и Адамсом / Clark and Adams (1977 г.). Он стал одним из главных методов диагностики вирусов растений, поскольку он позволяет одновременно провести диагно-

⁴ Примечание: такие добавки в буфер, как поливинилпирролидон (PVP) и сульфит натрия важны для устранения ингибиторов в растительном материале, который будет использоваться в качестве инокулята.

5. Диагностика

стику большого количества образцов, является очень специфичным и количественным.

В сэндвич-варианте ELISA (DAS, англ. double-antibody sandwich – двойной сэндвич из антител) частицы вируса захватываются и зажимаются между фракцией иммуноглобулина G (IgG) специфической антисыворотки и IgG, который был помечен (соединен с) ферментом при помощи щелочной фосфатазы. Присутствие вируса подтверждается добавлением субстрата в щелочную фосфатазу и окрашиванием в желтый цвет из-за продуктов распада субстрата. Поглощение цвета измеряется на колориметре при 405 нм.

Требуемое оборудование:

- планшет для ELISA;
- пипетки переменного объема для охвата следующих параметров:
 - 1–5 μ л
 - 5–50 μ л
 - 50–200 μ л
 - 200–1 000 μ л
 - 1–5 мл
- восьмиканальная мультипипетка с переменным объемом: 50–250 μ л;
- одноразовые микродозаторы соответствующих размеров;
- экстрактор сока растений или аппарат для измельчения;
- планшетный ридер для колориметрических измерений, например, планшетный ридер «Thermo Scientific Multiskan FC»;
- альбумин бычьей сыворотки;
- порошок сухого обезжиренного молока;
- 4-нитрофенил фосфат динатриевая соль гексагидрат;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСБРТ);
- Твин-20;
- антитела и конъюгаты;
- буферы;
- планы планшетов;

- водостойкий фломастер;
- пищевая пленка;
- бумажное полотенце;
- промывалка;
- пакеты для измельчения.

Необходимо подготовить план планшета, чтобы составить схему размещения образцов и контролей на 96-луночном планшете. Она должна быть основана на следующих аналитических критериях:

- Анализ каждого образца должен проводиться в двух повторностях. Поэтому колонки планшета всегда должны попарно выделяться на каждый вирус (например, колонки 1+2 – ArMV, колонки 3+4+5+6 – CMV, колонки 7+8 – TBRV).
- Для каждого анализируемого вируса должен быть, как минимум, один здоровый и один зараженный контроль (также закладываемый попарно).

В бумажном варианте плана планшета размещайте образцы и контроли в колонках планшета вертикально. Наверху напишите, какая колонка (какие колонки) будут использоваться для анализа какого вируса. Используйте стандартный план планшета, если возможно (в котором уже определено местоположение здоровых контролей).

Примечание: Для непрямых анализов TAS-ELISA (TAS, англ. *triple-antibody sandwich* – тройной сэндвич с антителами) должен быть отдельный план планшета, поскольку требуется больше этапов процесса инкубирования (за исключением случаев, когда готовится «коктейль», в котором соединяют моноклональное антитело и антивидовой конъюгат и вносят их на планшет одновременно).

Процедура сэндвич-варианта ELISA (DAS, двойной сэндвич с антителами)

- Покрытие планшета:
 - Приклейте к планшету ELISA наклейку с номером планшета ELISA

- и запишите его в бумажном варианте плана планшета. Напишите на самом планшете, анализ какого вируса проводится в какой колонке в соответствии с планом планшета.
- Смешайте антитела класса IgG, специфичные для вируса, анализ которого проводится, с покрывающим буфером в пластмассовом блюдце весов. Добавьте 100 μл в каждую лунку. Покройте полимерной пленкой. Подпишите подтверждающий документ и поставьте дату, укажите компанию – поставщика антисыворотки.
 - Инкубируйте при 37°C в течение 2-4 часов или всю ночь.
 - Подготовка образца:
 - Поместите образцы в пакеты для измельчения и разотрите. Добавьте 5 мл экстракционного буфера (2% веса/объема PVP в ФСБРТ) до растирания или сразу после него. Этот объем можно откорректировать от 2 до 10 мл для семян от маленького до большого размера. Примечание: Для здоровых контролей используйте такого же хозяина, как и образец, анализ которого проводится, если возможно.
 - Промойте планшеты ELISA при помощи ФСБРТ три раза вручную или используя машину для мытья планшетов. Высушите, промокивая бумажным полотенцем, сложенным в несколько слоев.
 - В соответствии с планом планшета заполните планшеты образцами, здоровыми контролями и зараженными контролями. Добавьте 100 μл экстракта в каждую лунку. Покройте липкой пластиковой пленкой.
 - Инкубируйте в течение ночи в холодильнике при температуре 4°C.
 - Добавление ферментного конъюгата:
 - Промойте планшеты ELISA при помощи ФСБРТ один раз вручную, чтобы удалить материал растений или семян. Затем используйте машину для мытья планшетов или помойте еще три раза вручную, используя ФСБРТ. Позаботьтесь о том, чтобы не осталось никакого цветного остатка. Если необходимо, помойте еще раз. Высушите, промокивая.
 - Смешайте антитело, конъюгированное со щелочной фосфатазой, специфичное для вируса, анализ которого проводится, с конъюгатным буфером (0,2% веса/объема БСА в ФСБРТ) в пластмассовом блюдце для весов. Добавьте 100 μл в каждую лунку. Покройте липкой пластиковой пленкой. Примите необходимые меры, чтобы использовать конъюгированное антитело, произведенное той же компанией, которая указана в разделе «Покрывание планшета» подтверждающего документа. Подпишите раздел «Конъюгат» подтверждающего документа, как только он будет добавлен.
 - Инкубируйте в течение 2–4 часов при 37°C.
 - Добавление субстрата:
 - Помойте планшеты ELISA в ФСБРТ и высушите, промокивая, как и раньше.
 - Приготовьте раствор: 0,1% в/о 4-нитрофенил фосфат динатриевой соли гексагидрат (субстратный порошок) в субстратном буфере, в пластмассовой чашке для весов. Приготовьте 1 мл на каждую колонку планшета (примечание: 10 мл достаточно для всего планшета). Добавьте 100 μл в каждую лунку. Храните раствор в темном месте, когда он не используется, поскольку он светочувствитель-

5. Диагностика

ный. Подпишите подтверждающий документ и укажите точное время, когда был добавлен субстратный раствор.

- Поставьте планшеты в темное место при комнатной температуре и периодически проверяйте, как происходит окрашивание. Как правило, это займет максимум 1 час или, вероятно, меньше в более теплом климате (например, в лабораториях без кондиционеров в тропических странах). Важно наблюдать за пустым контролем, поскольку он должен оставаться неокрашенным, но со временем он обесцветится. Для некоторых реакций ELISA достигается оптимальная инкубация, которая дифференцирует положительные анализы.
- Анализ результатов: Существует целый ряд сканеров для планшетов с соответствующим аналитическим программным обеспечением. Ниже представлен пример одной из таких систем.
 - Прочтите показания абсорбции в соответствии с инструкциями к сканеру для планшетов.
 - Проверьте, чтобы зараженные контроли превышали положительный порог и чтобы, в идеале, показатель абсорбции был выше 0,5; если показания прибора – слишком низкие, тогда оставьте на большее время, чтобы они проявились. Возьмите печатную копию и приложите ее к плану планшета. Если вы распечатываете документ, то выделите на печатной копии показания, которые превышают положительный порог.

Выявление вирусов с использованием ПЦР

ПЦР описывается в разделе 5.1.5.2. До того, как ПЦР можно будет использовать для выявления вредного для растения организма, необходимо выделить нуклеиновую кислоту из исследуемого материала. Существует несколько методов

для выделения нуклеиновых кислот для анализа. Выбор методов в любой лаборатории зависит от основного источника образца и от природы анализа, который вы проводите. Вне зависимости от метода процесс выделения будет включать в себя три основных этапа: лизис, удаление ингибиторов и отделение нуклеиновой кислоты.

Грубый лизис может включать в себя такие физические методы как измельчение, заморозка-оттаивание или химические методы с использованием детергентов, ферментов, хаотропных агентов или простого кипячения клеток в буфере. Методы экстракции нуклеиновых кислот могут быть основаны на разной способности растворения нуклеиновых кислот и белков в феноле и воде, как в методах экстракции с использованием фенола/хлороформа, или способности нуклеиновых кислот связываться с диоксидом кремния, как в методах экстракции с использованием диоксида кремния/гуанидин изотиоцианата. Концентрирование (отделение) выделенных нуклеиновых кислот можно провести путем спиртового осаждения или используя шарики диоксида кремния.

Доступны коммерческие тест-системы, содержащие все необходимые химические реактивы, основанные на использовании центрифужных колонок или магнитных шариков. При отсутствии тест-системы можно использовать следующий протокол, зачастую называемый СТАВ из-за использования бромистого цетилтриметиламмония (англ. *Cetyltrimethylammonium bromide* – СТАВ), адаптированного из работы Чанга С., Пуриэра Дж. и Кэрни Дж. 1993 г. «Простой и эффективный методы выделения РНК из сосен». Журнал «Вестник молекулярной биологии растений», 11: стр. 113–116 / Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J., 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant

Molecular Biology Reporter, 11: 113–116. Его можно использовать для выделения РНК из большинства типов растительного материала.

Протокол выделения РНК – лист растения

Для каждого образца проведите выделение из растения или растений, анализ которых будет проводиться, а также из известного здорового растения (если возможно, того же вида) в качестве отрицательного контроля. Все этапы центрифугирования проводятся при 13000 g в микроцентрифуге, если не указано иное.

Требуемое оборудование:

- инструмент и пакеты для измельчения;
- пробирки для микроцентрифуги объемом 2 мл (4 на каждый образец);
- пипетки (P1000 и P200);
- микродозаторы;
- водяной термостат или другой инкубатор, предварительно разогретый до 65°C;
- центрифуга (с соответствующим ротором для раскручивания пробирок для микроцентрифуги до 13000 g);
- холодильник;
- вытяжной шкаф;
- реактивы:
 - СТАВ-буфер для измельчения (не менее 1 мл на образец);
 - хлороформ: изоамиловый спирт (IAA) 24:1;
 - 4 М хлористого лития (LiCl);
 - изопропиловый спирт;
 - 70%-ный раствор этилового спирта в объемном отношении;
 - Буфер Tris-EDTA, содержащий 1% SDS;
 - Стерильная вода без нуклеаз.

Процедура:

- Поместите ткань, 100–200 мг, в пакет для измельчения размером 10x15 см

(или аналогичный) и заморозьте в жидком азоте перед тем, как измельчить ее в мелкий порошок, используя маленький ручной валик. *Примечание:* Убедитесь, что вы не продырявили пакет для измельчения, если это произошло, заклейте его клейкой лентой.

- Измельчайте до тех пор, пока ткань не начнет таять и не образуется «однородная масса». Добавьте 1-2 мл (т.е. 10 объемов) буфера для измельчения и тщательно перемешайте, используя валик.
- Сцедите 0,7 мл сока растертого материала в пробирку для микроцентрифуги объемом 1,5 мл и инкубируйте сок при 65°C в течение 10-15 мин.
- После инкубации добавьте 700 μ л хлороформа: IAA (24:1) и перемешивайте, опрокидывая пробирку вверх дном, до образования эмульсии.
- Центрифугируйте на максимальной скорости в микроцентрифуге в течение 10 минут при комнатной температуре.
- Необязательный этап – для использования в случае с «трудной тканью»: Осторожно снимите верхний (водянистый слой) и перенесите его в новую пробирку. Добавьте равный объем хлороформа: IAA, перемешайте и прокручивайте, как и раньше.
- Снимите водянистый слой с предельной осторожностью, стараясь не затронуть интерфазу. Добавьте равный объем 4M LiCl, хорошо перемешайте и инкубируйте при 4°C в течение ночи или 1 час при комнатной температуре.
- Перемешайте в центрифуге в течение 20–30 минут на максимальной скорости при 4°C, чтобы осадить РНК.
- Ресуспенсируйте осадок в 200 μ л буфера TE, содержащего 1% SDS. Добавьте 100 μ л 5M NaCl и 300 μ л ледяного изопропилового спирта. Хорошо перемешайте и инкубируйте

5. Диагностика

те при температуре -20°C в течение 20-30 минут.

- Центрифугируйте в течение 10 мин на максимальной скорости при 4°C для осаждения нуклеиновой кислоты. Слейте надосадочную жидкость, содержащую соль и этиловый спирт.
- Промойте осадок, добавив 500 $\mu\text{л}$ 70%-ного этилового спирта и прокрутив в центрифуге в течение 3-4 минут при 4°C .
- Слейте этиловый спирт и высушите осадок для удаления остаточного этилового спирта. Примечание: Полностью не высушивайте, поскольку осадок будет сложно ресуспендировать.
- Ресуспендируйте осадок в 50 $\mu\text{л}$ стерильной воды без нуклеаз.

Процесс проведения ПЦР и контроли

В идеале, разные зоны лаборатории (или разные лаборатории) будут предназначены для проведения разных этапов процесса ПЦР с целью предотвращения контаминации. Этапы, которые необходимо разделить: (i) экстракция, (ii) постановка ПЦР, (iii) введение ДНК и (iv) работа после ПЦР.

Контроли контаминации должны быть включены на каждом этапе процесса. Таким образом, в каждую серию экстракций должен быть включен здоровый контроль (в идеале, того же или близкородственного вида; пустой буферный контроль также можно использовать). Анализ этого контроля будет проводиться вместе с диагностическими образцами, и этот контроль определит любую контаминацию в процессе выделения ДНК.

Контроли нескольких видов с водой должны быть включены в процесс, как описано ниже.

- Пробирки закрываются после добавления мастер-микса (предварительно закрыты) – это указывает на то, насколько чисты используемые реактивы.

- Пробирки оставляются открытыми в процессе введения ДНК, но закрываются после (закрыты впоследствии) – это указывает на любую перекрестную контаминацию в процессе постановки ПЦР (особенно при использовании планшетов).
- И наконец, пробирки, в которые добавляется вода в конце процесса, для указания перекрестной контаминации от образца к образцу или связанной с пипеткой, использованной в процессе постановки ПЦР.

Протокол традиционной ОТ-ПЦР

Реакции ПЦР должны ставиться на льду или с исходными реактивами, размещенными на льду. Типичные условия реакции – 25 или 50 $\mu\text{л}$; для использования в диагностике 25 $\mu\text{л}$ более чем достаточно, чтобы провести повторный гелевый электрофорез, в то время как для опытно-исследовательской работы и секвенирования более подходящим может быть объем 50 $\mu\text{л}$. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) может проводиться в одно-пробирочном (с одной реакцией) или двух-пробирочном (отдельный этап ОТ) формате. В двух-пробирочном формате из реакции обратной транскрипции в реакцию ПЦР добавляется кДНК, тогда как в одно-пробирочном формате этап ОТ проводится непосредственно перед циклами ПЦР. Последний способ предпочтителен для использования в диагностике, поскольку он проще и появление контаминации менее вероятно, поскольку пробирка открывается только после проведения ПЦР, оптимизация одноэтапной ОТ-ПЦР обычно заключается в уменьшении количества обратной транскриптазы M-MLV, включенной в реакционную смесь.

Постановка ПЦР-реакций

Требуемое оборудование:

- пипетки (P10 и P200);
- микродозаторы;
- 96-луночные ПЦР-планшеты;

- пленки или крышки для планшетов;
- бокс для постановки ПЦР;
- реактивы:
 - мастер-микс;
 - образцы.

Спланируйте, сколько реакций вам понадобится, и какие лунки вы будете использовать для каждого образца, используя план планшета. Рассчитайте объемы, которые вам нужно будет добавить, чтобы приготовить свой мастер-микс для ОТ-ПЦР (см. табл. 1). Не забудьте, что, в идеале, вам необходимо проводить два параллельных анализа ваших образцов.

Отделите по 24 μ л мастер-микса для каждой лунки и затем добавьте 1 μ л образца или контроля в каждую из соответствующих лунок. Поместите планшет в прибор для ПЦР и прогоните планшет по программе ОТ-ПЦР.

5.4.4 Нематология

5.4.4.1 Введение в фитонематологию

Существует множество справочных работ, в которых подробно описывается биология и патогенность как нематод – паразитов растений, так и свободноживущих нематод. Введение в эту тему, предложенное в работах Декрэмера и Ханта / Decraemer and Hunt (2006 г.) и Хоккланда и др. / Hockland et al. (2006 г.), частично обобщено ниже.

Нематоды – первичнополостные, несегментированные, червеподобные животные, обычно описываемые как волосовидные или нитевидные. Нематоды – наиболее многочисленные многоклеточные животные на земле. Они являются свободноживущими или паразитами растений и животных. Хотя они встречаются практически в каждой среде обитания (Кобб / Cobb, 1915 г.), главным образом, это водные животные. Нематодам для передвижения и активной жизни требуется влага. Поэтому почвенная влага, относительная влажность и другие

факторы окружающей среды напрямую влияют на выживание нематод. Однако многие нематоды могут выживать в ан-гидробиотическом состоянии.

Было подсчитано, что один акр (0,405 га) почвы пахотной земли может содержать без малого 3 000 000 000 нематод. Чтобы уменьшить воздействие этого ограничивающего фактора, крайне важно точно идентифицировать нематод, вредных для растений, и понимать их биологию. Многие фитопаразитические нематоды наносят экономический ущерб целому ряду сельскохозяйственных культур. Однако их присутствие не всегда является очевидным для производителей, а симптомы часто приписывают нарушению обмена веществ или другим причинам. В прошлом сложность, связанная с выявлением нематод, и недостаток информации об их биологии и наносимом ими ущербе способствовали увеличению риска того, что их незамеченными неумышленно перемещали в процессе торговли с их хозяевами или в остатках почвы.

Многие нематоды, которые могут иметь фитосанитарную значимость, являются фитосанитарными инспекторами в пунктах ввоза в процессе международной торговли. Часто это неизвестные виды, которые могут потенциально стать значимыми вредными организмами, если позволить им проникнуть и акклиматизироваться. Нематоды – вредные организмы растений, которые ранее были неизвестны или не очень хорошо известны, могут стать объектом экстренных карантинных действий с целью недопущения их возможной интродукции и распространения до того, как риски станут более понятными. Меры должны модифицироваться с надлежащим учетом опыта и получения новой информации. Кэннон и другие / Cannon et al. (1999 г.) описывают, как Соединенное Королевство утвердило протокол для определения надлежащих мер, и приводят примеры выявления

5. Диагностика

Таблица 1. Пример расчета мастер-микса для одноэтапной ОТ-ПЦР

Реактив	Объем для одной реакции	Требуемый объем
Общее количество реакций		11
Стерильная вода без нуклеаз	34,75 μ л	382,25
10x реакционный буфер	5 μ л	55
25 мМ MgCl ₂	3 μ л	33
праймер 1 10 μ М	2 μ л	22
праймер 2 10 μ М	2 μ л	22
смесь dNTP (по 10 мМ)	1 μ л	11
MMLV (раствор 1/50 в СДВ)	1 μ л	11
Taq-полимераза (5 ед/ μ л)	0,25 μ л	2,75
РНК	1 μ л	

нематод – вредных для растений организмов в Соединенном Королевстве на китайском пенджинге (карликовых деревьях); другие примеры включают в себя определенные виды галловых нематод (*Meloidogyne* spp.), выявленных странами – членами Европейского союза на импортных черенках с корнями.

Нематоды проявляют целый ряд особенностей питания или трофизм. Некоторые виды нематод являются микрофагами или микробиотрофами, питающимися мелкими микроорганизмами, тогда как другие – сапрофаги, питающиеся мертвым или разлагающимся органическим веществом. Многие виды нематод – фитофаги, получающие питание напрямую из растений, тогда как другие – всеядные или хищники. Паразитирование на беспозвоночных или позвоночных также распространено. Существует три основных типа паразитирования на растениях: эктопаразитизм, эндопаразитизм и полужендопаразитизм.

Эктопаразитизм: Нематода остается в почве и не проникает в ткани растений. Она питается, используя свой стилет для прокалывания клеток растения – чем длиннее стилет, тем более глубокой частью ткани растения она может питаться. Большинство видов эктопаразитических нематод остаются подвижными, тогда как другие, например, *Sasoraaurus*, навсегда прикрепляются к корню с помощью глубоко погруженного стилета.

Эндопаразитизм: При этом типе паразитизма вся нематода проникает в ткань корня. Мигрирующие эндопаразиты, такие как *Pratylenchus* и *Radopholus*, сохраняют свою способность к передвижению и не питаются в одном фиксированном месте внутри ткани растения, при этом более развитые малоподвижные эндопаразиты питаются в одном фиксированном месте и индуцируют работу сложной трофической системы клеток-«нянь» или синцитиев. Установление специализированного участка питания

увеличивает поток питательных веществ от хозяина, тем самым позволяя самкам становиться малоподвижными и тучными по форме и высоко плодовитыми. Малоподвижные эндопаразиты до установления участка питания также имеют стадию развития, во время которой они мигрируют. У галловых и цистообразующих нематод только вторая ювенильная стадия и взрослые самцы подвижны, но у *Nacobbus*, например, все ювенильные стадии, самцы и незрелые червеобразные самки – подвижны, и только взрослая самка – малоподвижна.

Полу-эндопаразитизм: Только передняя часть нематоды проникает в корень, а задняя часть остается в почве.

5.4.4.2 Требования к лаборатории

Лабораторные помещения, предназначенные для диагностики нематод – вредных организмов растений требуют наличия приемлемых условий изоляции для работы с карантинными организмами. Подробное описание оборудования для выделения можно найти в Стандарте ЕОКЗР (Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений) по выделению нематод (ЕОКЗР, 2013а).

5.4.4.3 Диагностика

Идентификация нематод лежит в основе всех аспектов исследований, консультативной работы, применения карантинного законодательства и выбора стратегий борьбы. Классическая таксономия в настоящее время дополняется молекулярной диагностикой.

Стандартные протоколы по выделению видов регулируемых нематод предоставлены МККЗР и каждой региональной организацией по карантину и защите растений (РОКЗР). Протоколы по диагно-

стике всех видов нематод, карантинных и регулируемых в Европейском регионе, предоставлены ЕОКЗР (<http://archives.epppo.int/EPPOStandards/diagnostics.htm>). В этих документах приводятся типичные симптомы питания и паразитирования нематод, проявляющиеся на хозяине.

Выделение из субстрата

Существует много методов выделения нематод из субстрата, включая пассивные методы, методы препарирования и флотационные методы. Червеобразных нематод можно выделять из тканей растений, семян, почвы и среды выращивания, используя такие методы, как вороночный метод Бермана (рис. 16), модифицированный метод Бермана с использованием ванночки (Хупер и Эванс / Hooper and Evans, 1993 г.; рис. 17), адаптированный сахарно-флотационный метод (Кулен и Д'Эрде / Coolen and D'Herde, 1972 г.) или метод с использованием орошения (Хупер и др. / Hooper et al., 2005 г.). Также описаны разнообразные методы для выделения цистообразующих нематод из субстрата, например, с использованием прибора Фенвика (Фенвик / Fenwick, 1940 г.) или аппарата для отмучивания почвы (Винфильд и др. / Winfield et al., 1987 г.). Подробное описание процедур выделения можно найти в Стандарте ЕОКЗР по выделению нематод (ЕОКЗР, 2013а).

Растительный материал, который, как предполагается, заражен фитопаразитическими нематодами, должен обследоваться в кратчайшие сроки во избежание его дальнейшей порчи и заражения вторичными патогенами. Почва и среда выращивания до работы с ними должны храниться при температуре приблизительно 5°C в месте, куда не попадают прямые солнечные лучи. Для обеспечения хорошего качества выделения рекомендуется осторожно обращаться с почвой во избежание повреждения нематод.



Рисунок 16. Модифицированная воронка Бермана для выделения нематод из растительного материала или почвы

Вороночный метод Бермана – это простой метод выделения активных нематод из почвы, семян и растительного материала.

Он состоит из воронки с кусочком резиновой трубки, прикрепленной к ножке воронки и перекрытой пружинным кольцом или винтовым зажимом (рекомендуемый уклон воронки – около 30°). Воронка помещается в держатель и почти полностью заполняется проточной водой. Пластмассовое сито или проволочная корзинка с ячейками достаточно большого размера, чтобы нематоды могли свободно проходить сквозь них, помещается внутрь воронки. Почва или растительный материал нарезается на мелкие кусочки и помещается прямо на сетку либо на однослойную ткань, размещенную на сетке; уровень воды затем корректируется таким образом, чтобы вода едва покрывала субстрат. Активные нематоды проходят сквозь сетку и погружаются на дно ножки воронки. Кроме того, можно использовать воронки,

сделанные из пластмассы или нержавеющей стали, или силиконовые трубки. Однако, что касается последних, диффузия кислорода в воду меньше, чем при использовании полиэтиленовых трубок (Столлер / Stoller, 1957 г.), что может медленно привести к асфиксии у нематод. В зависимости от субстрата большинство (50-80%) присутствующих подвижных нематод будут выделены в течение 24-х часов; однако образцы можно оставлять в воронке до 72 часов, чтобы улучшить показатели выделения. При длительном периоде выделения регулярное постукивание и добавление свежей воды увеличивает подвижность нематод и, вследствие этого, показатель выделения. Эффективность выделения также можно улучшить, добавив 1-3%-ный H_2O_2 для снабжения кислородом (Тарджан / Tarjan, 1967 г., 1972 г.). После периода выделения небольшое количество воды, содержащей нематоды, сливается и изучается под микроскопом (Флегг и Хупер / Flegg and Hooper, 1970 г.).

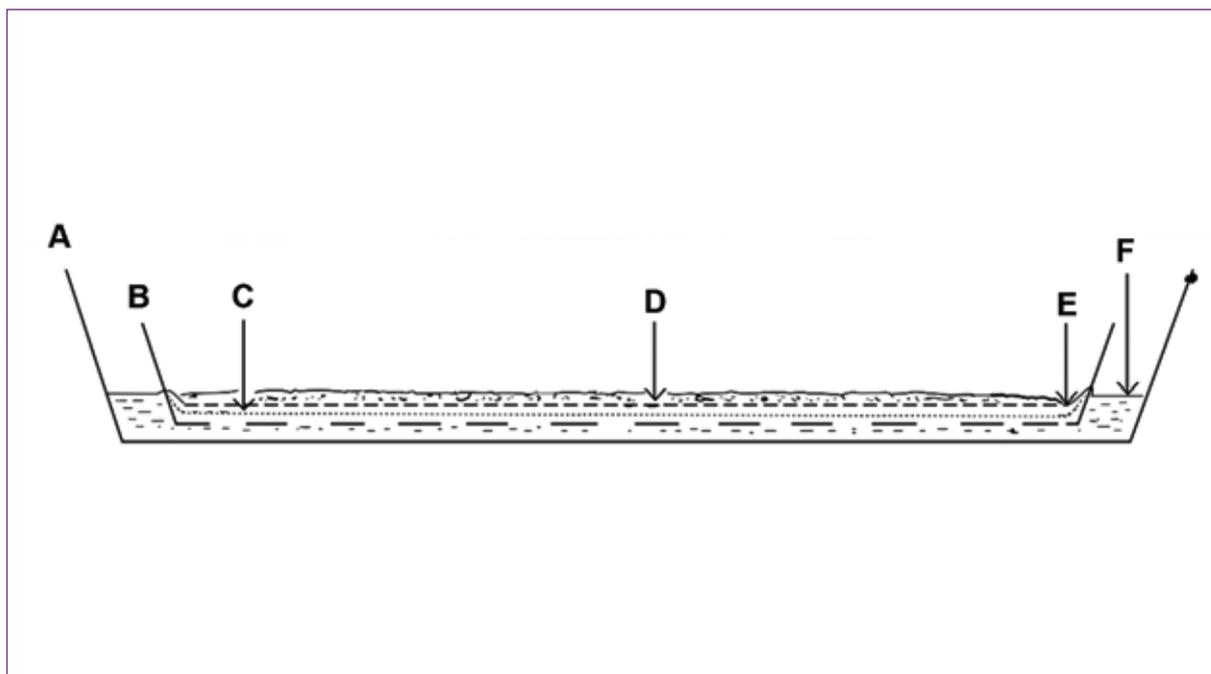


Рисунок 17. Модифицированный метод с использованием ванночки для выделения нематод

A – ванночка для проявки фотографий; **B** – проволочная корзина с пластмассовым покрытием; **C** – сетка с крупными отверстиями на пластмассовой подставке; **D** – фильтр (однослойная ткань, молочный фильтр или хлопковая/нейлоновая ткань); **E** – тонкий слой почвы; **F** – достаточное количество воды, чтобы намочить, но не затопить подвыборку.

Метод опрыскивания Сейнхорста отличается от вороночного метода Бермана тем, что сок растения и токсичные продукты распада смываются. В этом методе воронку Бермана или чашку Остенбринка помещают в условия мелкокапельного орошения или тумана во избежание кислородного обеднения воды. Мелкокапельное орошение осуществляется при помощи распылителей, опрыскивающих растительный материал под определенным давлением, или при помощи распылителей, распыливающих воду вверх таким образом, чтобы капли мягко падали на растительный материал. Активные нематоды покидают растительную ткань и смываются в воронку или чашку, где они оседают. Нематод собирают каждые 24–48 часов в стеклянный лабораторный стакан посредством открытия винтового зажима на ножке воронки или сбора нематод на сито с размером пор 20–25 мкм. Выделение может длиться до четырех недель. Этот метод описан Хупером / Hooper (1986 г.).

Подвижные и неподвижные нематоды могут выделяться из растительного материала методом Кулена и Д'Эрде / Coolen and D'Herde (1972 г.). Растительный материал моется, нарезается на кусочки размером около 0,5 см, и порции по 5 г измельчаются в бытовом блендере с добавлением 50 мл водопроводной воды при минимальной скорости перемешивания в течение 2 минут. Суспензия нематод и фрагментов ткани промывается через сито с размером ячеек 750 мкм, которое помещено над ситом с размером пор 45 мкм. Остаток на сите с размером ячеек 45 мкм собирается и заливается в две центрифужные пробирки объемом по 50 мл. Около 1 мл каолина добавляется в каждую пробирку, смесь тщательно взбалтывается и затем центрифугируется со скоростью 3000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочная жидкость сливается, и в пробирки добавляется раствор сахарозы (1,13 г/см³). Смесь тщательно перемешивается и центрифугируется со скоростью 1750 об/мин в течение 4 минут. Надосадочная жидкость смывается

5. Диагностика

через сито с размером ячеек 45 мкм, осадок собирается, и нематоды изучаются под стереомикроскопом. Вместо сахара можно использовать $ZnSO_4$, $MgSO_4$ или коллоидную двуокись кремния.

Предварительная идентификация

Определения терминов, используемых в следующих разделах, можно найти в публикациях ЕОКЗР (2013b).

Для различения фитопаразитических нематод от других трофических групп требуется, чтобы специалист прошел полное обучение. Для обследования морфологических характеристик и подготовки препаратов нематод с целью их изучения требуется стереомикроскоп с увеличением не менее 40-кратного. Три основных типа ротового аппарата и пищевода, а также соответствующих участков глотки, выделяемых у фитопаразитических нематод, показаны на рис. 18 и 19, соответственно.

Приготовление препаратов нематод

Исследование морфологических признаков должно проводиться у максимально возможного количества взрослых особей нематод. Существует множество опубликованных методов фиксации и приготовления препаратов нематод для исследования, которые были совсем недавно обобщены в работе Манзанийя-Лопеса и Марбан-Мендозы / Manzanilla-López and Marbán-Mendoza (2012 г.). Рекомендуется проводить осмотр нематод, обработанных до состояния обезвоживания и зафиксированных в глицерине, поскольку важные таксономические характеристики могут быть нечеткими, если образцы не достаточно очищены.

Временные препараты на предметных стеклах можно быстро приготовить для незамедлительного осмотра, но такие препараты могут использоваться только в течение нескольких недель.

Если возможно, следует готовить постоянные препараты для использования в будущем в качестве референтных материалов и хранения в референтных коллекциях нематод. Методы приготовления постоянных препаратов нематод были подробно описаны другими авторами (Сейнхорст / Seinhorst, 1962 г.; Хупер / Hooper, 1986 г.). Ниже описан метод медленного выпаривания, описанный Хупером / Hooper (1986 г.).

Временные препараты

Маленькая капля воды помещается на стеклянное предметное стекло с лункой в количестве, достаточном, чтобы заполнить лунку. Нематоды переносятся в воду и нагреваются до 65°C. Важно, чтобы нагрев был достаточным только для того, чтобы нематоды погибли, поскольку длительный нагрев приведет к повреждению и разрушению образцов. На практике 10-15 секунд над горячей плиткой будет достаточным периодом времени для большинства видов, но рекомендуется проверять предметное стекло через определенные промежутки времени, чтобы следить за процессом и прекратить нагрев, только когда прекратится движение всех нематод.

Берется предметное стекло, свободное от пыли, и кладется на край столика микроскопа. Маленькая капля фиксатора ТАФ одинарной концентрации (7 мл формалина (40%-ный формальдегид), 2 мл триэтаноламина, 91 мл дистиллированной воды) или другого подходящего фиксатора наносится в центр предметного стекла, вокруг капли помещается надлежащее количество стружки парафинового воска (воск поможет поддерживать покровное стекло и зафиксировать его на предметном стекле).

Нематод переносят с предметного стекла с лункой в фиксатор ТАФ, так чтобы они были размещены под выпуклой областью в центре капли и не пере-

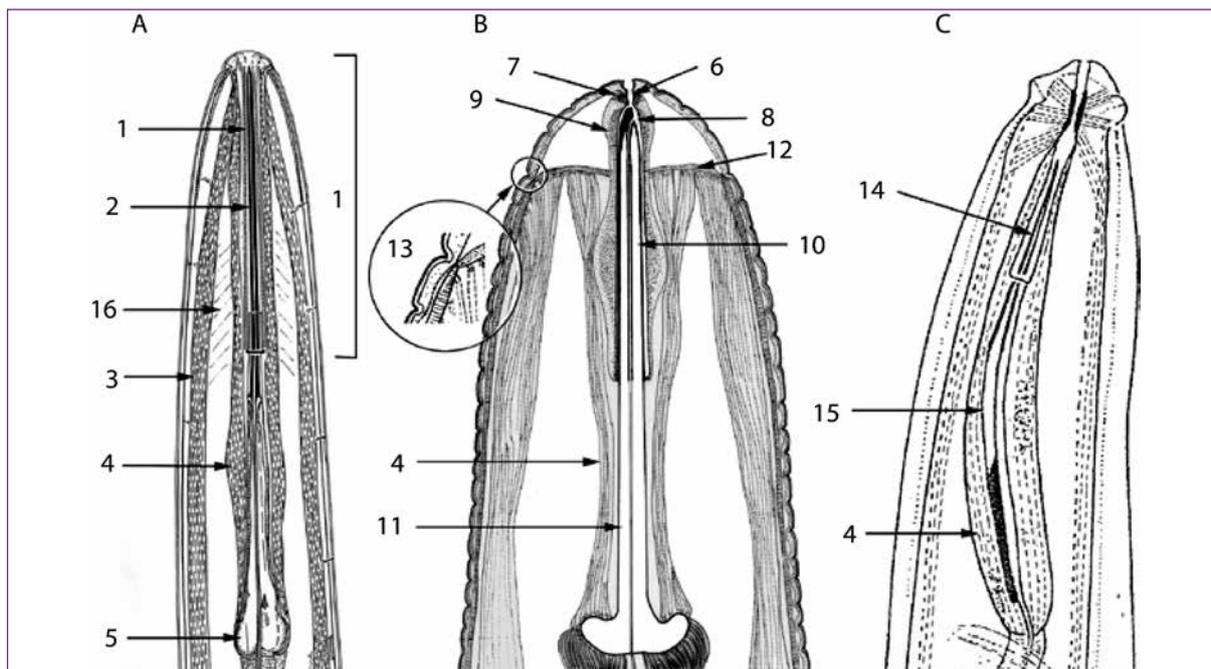


Рисунок 18. Область ротовой полости и типы ротового аппарата у фитопаразитических нематод

А – Одонтостилетные (со стилетом в стенке пищевода, заканчивающимся дорсально скошенным отверстием) и одонтофорные (с мускулистым валиком в ротовой полости, который поддерживает радулу) (*Longidoridae*). **В** – Стоматостилетные - со стилетом в ротовой полости с кутикулярным придатком (сместенным внутрь) у основания головы (*Tylenchomorpha*). **С** – Онхиостилетные (с копьем) (*Trichodoridae*). **1.** передний отдел стомы; **2.** стилет в стенке пищевода; **3.** соматические мышцы; **4.** мышцы, вытягивающие стилет; **5.** мускулистый валик с гребнями; **6.** перстома; **7.** утолщение кутикулы вокруг перстома; **8.** отверстие стилета; **9.** стома; **10.** конус стилета; **11.** копье и выступы стилета; **12.** основание головы; **13.** детальное изображение кутикулы, демонстрирующее исчезновение срединной и бороздчатой зоны в районе головы; **14** и **15.** копье с твердым «зубом» (**14**) и расширение «зуба» (**15**); **16.** ротовые мышцы. Рисунок взят из работы Декрэмера и Ханта / Decraemer and Hunt (2006 г.) с разрешения авторов.

крывали друг друга. Количество экземпляров, которые могут поместиться на предметном стекле, зависит от размера нематод.

Покровное стекло соответствующего размера осторожно протирается тканью для чистки оптики. Его осторожно опускают на восковые стружки, так чтобы оно соприкоснулось с ТАФ. Предметное стекло помещают на плитку и наблюдают за ним до тех пор, пока воск не растает, воздух, который мог остаться под покровным стеклом, удаляют, мягко постукивая по предметному стеклу. Затем предметное стекло снимают с плитки и изучают.

В центре должен быть прозрачный участок с фиксатором ТАФ, содержащим нематоды, и сплошное кольцо из воска для того, чтобы запечатать предметное стекло.

Если восковая прокладка нарушится или нематоды погрузятся в воск, предметное стекло опять разогревают, покровное стекло осторожно снимают, нематод достают и фиксируют на новом предметном стекле. Если воск растекся из-под покровного стекла, его убирают тонким лезвием.

Покровное стекло запечатывается при помощи лака для ногтей, полоска которого наносится по окружности. Когда лак высохнет, образцы готовы для изучения.

Постоянные препараты

Маленькую каплю воды помещают на предметное стекло с лункой в количестве, достаточном для заполнения лунки. Нематод переносят в воду и нагревают до 65°C. Крайне важно, чтобы нагрев был достаточным для того, что-

5. Диагностика

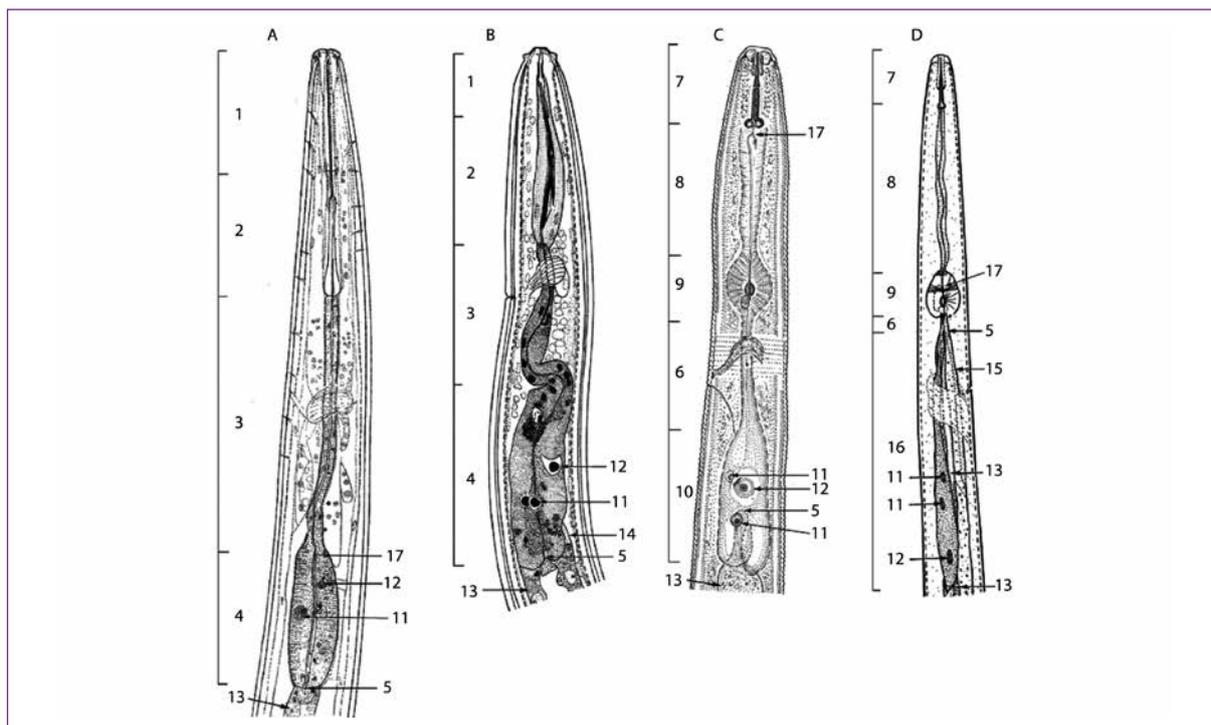


Рисунок 19. Пищеварительная система таксонов фитопаразитических нематод

A – род *Paraxiphidorus* (Longidoridae). **B** – род *Paratrichodoros* (Trichodoridae). **C** – род *Pratylenchoides* (Pratylenchidae). **D** – род *Aphelenchoides* (Aphelenchoididae). 1. передний отдел стомы; 2. фарингостома; 3. узкая передняя область глотки; 4. глоточная выпуклость; 5. соединение глотки и кишки; 6. перешеек (истмус); 7. стилет в ротовой полости; 8. прокорпус; 9. метакорпус; 10. пост-корпус; 11. ядра вентросублатеральных глоточных желез; 12. дорсальное ядро глоточной железы; 13. кишка; 14. кишка, дорсально перекрывающая глотку; 15. клетка клапана соединения глотки и кишки; 16. доля глоточной железы; 17. дорсальное отверстие глоточной железы. Рисунок взят из работы Декрэмера и Ханта / Decraemer and Hunt (2006 г.) с разрешения авторов.

бы нематоды погибли, поскольку длительный нагрев приведет к деформации и разрушению образцов. На практике 10-15 секунд над горячей плиткой будет достаточным периодом времени для большинства видов, но рекомендуется проверять предметное стекло через определенные промежутки времени, чтобы следить за процессом и прекратить нагрев, только когда прекратится движение всех нематод.

Нематод переносят в чашку для культивирования эмбрионов или на подходящее часовое стекло, наполовину заполненное фиксатором ТАФ одинарной концентрации (7 мл формалина (40%-ный формальдегид), 2 мл триэтаноламина, 91 мл дистиллированной воды). Она закрывается и оставляется, как минимум, на одну неделю.

Образцы переносятся на часовое стекло с раствором 3%-ного глицерина

с остаточным содержанием ТАФ. Нематоды должны быть погружены в раствор. На часовое стекло следует положить покровное стекло и оставить его на ночь.

Покровное стекло слегка смещается, чтобы появилась небольшая щель для обеспечения испарения, и предметное стекло оставляют в инкубаторе (при температуре приблизительно 40°C) до тех пор, пока не испарится вся вода (это может занять не менее недели). Одновременно небольшой лабораторный стакан с глицерином помещают в инкубатор для того, чтобы из него испарилась вся вода.

С использованием шприца или пипетки небольшую каплю глицерина помещают в центр предметного стекла, куда переносят и нематод, размещая их в центре.

Тщательно подбирается три опоры для покровного стекла, такие как стеклянные шарики одинакового с нема-

тодами диаметра, которые помещают вдоль края капли глицерина на расстоянии друг от друга таким образом, чтобы они образовали равномерную опору.

Небольшое количество стружки парафинового воска помещают через равномерные отрезки по контуру вокруг капли глицерина.

Покровное стекло нагревают на нагревательном блоке в течение нескольких секунд. Покровное стекло протирается тканью для чистки оптики и осторожно опускается на воск, чтобы соприкоснулись только покровное стекло и глицерин.

Предметное стекло помещают на нагревательный блок и, как только воск растает, и все пузырьки воздуха будут вытиснуты помещенным сверху покровным стеклом, предметное стекло снимают с нагревательного блока и дают воску перераспределиться.

Когда воск полностью затвердеет, весь его избыток удаляют скальпелем по периметру покровного стекла.

Покровное стекло запечатывают при помощи герметизирующей пасты, такой как «Glyceel», или прозрачным лаком для ногтей, полоска которых наносится по окружности. Предметное стекло маркируется при помощи нестираемого маркера или этикетки для предметных стекол, которая приклеивается к нему. Указывается классификация, дата приготовления препарата, хозяин, местность, номер образца (если применимо) и использованный метод сохранения.

Идентификация до видового уровня

Классификацию популяции нематод проводить сложно, для этого требуется понимание морфологии, филогении и таксономии нематод. Если предполагается, что выявлен организм, внесенный в перечень карантинных, или новый орга-

низм, подтверждение его видовой принадлежности должно осуществляться специалистом.

Для идентификации с использованием светового микроскопа рекомендуется увеличение от 400- до 1000-кратного (масляно-иммерсионная линза) и дифференциально-фазовый контраст (ДИК).

Стандартные протоколы по морфологической идентификации и молекулярному подтверждению предоставлены МККЗР и каждой из РОКЗР.

5.4.5 Энтомология

Введение в идентификацию насекомых дается Королевским энтомологическим обществом: http://www.royensoc.co.uk/insect_info/introduction.htm

Работа должна проводиться в безопасной лаборатории, располагающей условиями изоляции, обеспечивающими невозможность попадания вредных организмов в окружающую среду. Требуется следующее основное оборудование:

Основное оборудование:

- препаровальный бинокляр (до 160-кратного увеличения) для общего осмотра образцов при малом увеличении и для скрининга образцов;
- источник холодного света с оптоволоконными световодами;
- биологический микроскоп (до 1000-кратного увеличения, со встроенным источником света) для изучения образцов, зафиксированных на предметных стеклах;
- нагревательный блок или кипяtilьная плитка (нагрев до 120°C)
- печка для подготовки предметных стекол;
- лабораторный инкубатор для разведения образцов;
- бытовой холодильник для хранения образцов;
- бытовая морозильная камера для утилизации образцов.

5. Диагностика

Вспомогательное оборудование:

- белые эмалированные лотки для образцов;
- одноразовые пластмассовые чашки Петри разных размеров;
- чашки для культивирования эмбрионов и часовые стекла;
- предметные стекла для микроскопа (стандартные и с лунками);
- покровные стекла (13 мм и 18 мм);
- стальная линейка (20 см, деления по 1/10 мм);
- энтомологические булавки;
- оборудование для препарирования, включая: «поисковые иглы», скальпели и лезвия, пинцеты (разные, включая энтомологические пинцеты), тонкие кисти, мелкие булавки или что-то подобное и пастеровские пипетки;
- спиртовая горелка.

Основные реактивы:

- деминерализованная вода;
- этиловый спирт (разведенный с очищенной водой до 60- и 70%-ных растворов);
- метиловый спирт;
- 10%-ный раствор гидроксида калия (KOH);
- растворитель уайт-спирит (растворитель для лаков);
- безводная уксусная кислота;
- гвоздичное масло;
- среда Хайнца для фиксации на предметных стеклах;
- канадский бальзам и растворитель;
- краситель ткани с фуксинсернистой кислотой.

Прочее оборудование:

- сменные лампочки и предохранители для микроскопа;
- иммерсионное масло для микроскопа;
- ткань для чистки оптики;
- аэрозольный баллон со сжатым воздухом;

- механизм для смены лезвий скальпеля;
- контейнер для утилизации острых предметов;
- бутылки и стеллажи для реактивов;
- бутылка для отработанных реактивов;
- термостойкие пробирки из стекла пирекс, держатель и штатив для пробирок;
- пробковая плитка;
- лабораторная бумага (рулон);
- одноразовые перчатки;
- нестираемые фломастеры (толстые и тонкие);
- прозрачные пластиковые мерные пробирки с завинчивающимися крышками;
- пробирки типа Эппендорф (0,5 мл и 1,0 мл);
- коробки для разведения насекомых;
- прозрачные полиэтиленовые пакеты;
- пакеты для автоклава.

5.4.5.1 Диагностика

Традиционная идентификация насекомых, в основном, основана на исследовании под микроскопом морфологических свойств, что может потребовать особой подготовки образцов для исследования, применения ключей (обычно дихотомных) и сравнения с одним или, желательнее, целым рядом подтвержденных образцов. Этот подход остается наиболее малозатратным и доступным средством проведения диагностики насекомых. Большинство ключей, но не все, основаны на характеристиках взрослой стадии развития, но в фитосанитарной диагностике чаще всего встречаются особи именно на незрелых стадиях развития, перемещаемые в процессе торговли (т.е. яйца, личинки или куколки); в таких случаях зачастую необходимо их вырастить до идентифицируемой стадии. Кроме того, другие сведения также могут помочь идентификации или ускорить ее, например, связь с хозяином, географическое происхождение и данные о распространении вредного организма.

На сегодняшний день описано около миллиона видов насекомых, что составляет 80-90% от всех известных форм жизни животных, но все еще существует гораздо больше видов, которые должны быть официально описаны, и, по оценкам, в конечном итоге это может составить от 6 до 10 млн. видов. Известные существующие виды насекомых на сегодняшний день систематики разделили на порядка 23 разных отрядов. При таком огромном количестве таксонов в рамках способностей или опыта одного человека невозможно оказать всеобъемлющие диагностические услуги. Большинство видов вредителей растений на самом деле, однако, принадлежат только пяти из этих отрядов, а именно: *Coleoptera* (жуки), *Diptera* (мухи), *Hemiptera* (полужесткокрылые), *Lepidoptera* (мотыльки и бабочки) и *Thysanoptera* (трипсы). Хороший фитосанитарный энтомолог общей практики должен уметь свободно распознавать эти отряды и ключевые виды вредителей, принадлежащие к ним, но сверх того для диагностики могут потребоваться навыки специалиста по идентификации.

Один опробованный и испытанный метод оказания услуг по энтомологической диагностике функционирует на основе системы «сортировки», при которой энтомологи общей практики определяют приоритетность вновь прибывших образцов, проводя идентификацию большинства повседневных образцов. Это включает в себя просмотр образцов, таких как растительный материал или клейкие ловушки на выявление беспозвоночных, представляющих интерес, и при необходимости подготовку беспозвоночных для самостоятельного изучения или изучения старшими специалистами по диагностике (например, очистка образцов и последующая их фиксация на предметных стеклах для микроскопа). Когда они в процессе диагностики дошли до того этапа, до которого смогли, в случае необхо-

димости приглашается более старший или узкий специалист по диагностике. Как только диагностика завершена, документ с ее результатами должен подписать только назначенный энтомолог. Например, в соответствии с ИСО 17025 только те энтомологи, которые прошли официальное обучение и тестирование по идентификации (что четко указано в их документах о прохождении обучения), могут ставить свою подпись под результатами идентификации.

Как для энтомологов общей практики, так и для специалистов знания и опыт – чрезвычайно важны, чтобы они могли оказывать услугу по диагностике эффективно и точно. Виды могут значительно отличаться, и подтверждение диагностики может быть достоверно осуществлено только опытным специалистом по диагностике. Такие навыки могут развиваться только со временем посредством обучения, работы с наставником и сотрудничества и коллективной работы с другими экспертами и специалистами.

5.5 Дополнительная информация

Интернет обеспечивает доступ к огромному количеству информации для использования в качестве основы проведения диагностики и развития знаний и экспертного опыта. В этом разделе приводится информация о ключевых справочных материалах по вредным для растений организмам, а также указываются центры передового опыта и экспертные базы данных.

5.5.1 Руководства и сайты

К ключевым источникам информации относятся: Американское фитопатологическое общество (АФО), база данных Международного центра сельскохозяйственных исследований «СAB abstracts», ЕОКЗР, а также более общие поисковые интернет-системы (например, Google). Особенно полезны

5. Диагностика

последние публикации или книги, описывающие вредные организмы определенных сельскохозяйственных культур, и их относительно легко можно найти, используя интернет-поиск по ключевым словам (например, вирусы, маниока).

Полезно начать со Справочника Международного центра сельскохозяйственных исследований (CABI) по защите сельскохозяйственных культур и Справочника CABI по лесоводству. При поиске информации в этих справочниках по названию хозяина вы получите общий список вредных организмов, связанных с этим хозяином, который затем можно доработать, осуществив поиск в системе ЕОКЗР «PQR» (база данных по карантинным вредным организмам). Полезно включить все известные симптомы, вызываемые вредным организмом, даже если они не использовались в течение некоторого периода времени.

В некоторых случаях может возникнуть необходимость в рассмотрении всех организмов, связанных с определенным хозяином, и поэтому следует принять во внимание, является ли этот вредный организм – истинным вредным организмом, вторичным патогеном или просто случайным обнаружением.

Названия организмов меняются по мере появления большего количества таксономической информации, и поэтому важно проверять названия организмов, утвержденные в последнее время, а также все симптомы и устаревшие названия.

Одним из полезных общих ресурсов является сайт Каталога жизни (<http://catalogueoflife.org>) и (<http://www.species2000.org/>), где представлены недавно принятые названия целого ряда организмов. Утвержденные названия

грибов и их синонимы доступны на сайте «Index fungorum» (<http://www.indexfungorum.org>), тогда как утвержденные названия бактерий и фитоплазм доступны на сайте МОФП (<http://www.isppweb.org>) и в работе Фиррао и др. / Firrao et al. (2004 г.): <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1007020>, соответственно.

Ниже приведены ключевые ресурсы по каждой группе вредных организмов.

5.5.1.1 Патогены – общая информация

Заметки в журнале «Болезни растений» / Plant Disease» <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/Pages/default.aspx>

Банк знаний «Plantwise»: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/home.aspx>

Международное общество инфекционных болезней, Программа мониторинга новых болезней (ProMED), О ProMED-корреспонденции. Доступно по ссылке: <http://www.promedmail.org> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

БОПР, Сообщения о новых болезнях: <http://www.ndrs.org.uk/>

Справочник CABI по защите сельскохозяйственных культур. Доступен по ссылке: <http://www.cabi.org/crc/> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Молекулярная фитопатология:

<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291364-3703>

ЕОКЗР (Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений), Деятельность ЕОКЗР в сфере карантина растений. Доступно по ссылке: <http://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

5.5.1.2 Вирусы и вириоды

Национальный центр биотехнологической информации (НЦБИ), универсальная база данных по вирусам «ICTVdB»: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes-Group.cgi?taxid=10239&opt=Virus>

Описания вирусов растений (база данных «DPV»): <http://www.dpvweb.net/>

Вириоды: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Genomes-Group.cgi?taxid=12884&opt=Viroid>

5.5.1.3 Бактерии

Леллиот Р.А. и Стед Д.Е. «Методы диагностики бактериальных болезней растений». Оксфорд, Издательство «Wiley». С. 224 / **Lelliot, R.A. & Stead, D.E.** 1991. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford, Wiley. 224 pp.

САВИ и ЕОКЗР. 1997 г. «Карантинные для Европы вредные организмы», 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований и Париж, Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений. С. 1425 / **CABI & EPPO.** 1997. Quarantine pests for Europe, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.

Веллер С.А., Аспин А. и Стед Д.Е. 2008 г. «Классификация и идентификация бактерий, связанных с растениями, посредством анализа профиля жирных кислот». Бюллетень ЕОКЗР, 06/2008; 30(3–4): с. 375–380 / **Weller, S.A., Aspin, A. & Stead, D.E.** 2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. EPPO Bulletin, 06/2008; 30(3–4): 375–380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.

Сноудон А.Л. 2010а. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей

после сбора урожая». Том1 «Общее введение и фрукты». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 320 / **Snowdon, A.L.** 2010a. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1 General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Сноудон А.Л. 2010b. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том2 «Овощи». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С.416 / **Snowdon, A.L.** 2010b. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 2 Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Янсе Дж.Д. 2010 г. «Фитобактериология: принципы и практика». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С.368 / **Janse, J.D.** 2010. Phytobacteriology: principles and practice. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.

Брэдбери Дж.Ф. 1985 г. «Руководство по фитопатогенным бактериям». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С.332 / **Bradbury, J.F.** 1985. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.

Международное общество фитопатологии (МОФП): <http://www.isppweb.org/>

Шаад Н.В., Джоунс Дж.Б. и Чун В., под ред. 1988 г. «Руководство для лабораторий по идентификации фитопатогенных бактерий», 2-е издание. Сен-Пол, Миннесота, США. Издательство «APS Press». Американское фитопатологическое общество. С.164 / **Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W.,** eds. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd edn. St Paul, MN, USA, APS Press, American Phytopathological Society. 164 pp.

5. Диагностика

5.5.1.4 Фитоплазмы

Старые названия, а также названия по новой пересмотренной номенклатуре: Фиррао и др. / Firrao et al. (2004 г.): <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=1007020>

5.5.1.5 Грибы

База данных «Index fungorum»: <http://www.indexfungorum.org/>

Кирк П.М., Кэннон С.П.Ф., Минтер Д.В. и Столперс Дж.А., под ред. 2008 г. «Словарь грибов», 10-е издание. Клейтон, Виктория, Австралия. Издательство «CSIRO Publishing». С. 640 / **Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W. & Stalpers, J.A.**, eds. 2008. Dictionary of the fungi, 10th edn. Clayton, Victoria, Australia, CSIRO Publishing. 640 pp.

Барнет Х.Л. и Хантер Б.Б. 1972 г. «Иллюстрированный журнал родов несовершенных грибов», 3-е издание, Миннеаполис, Миннесота. Издательство «Burgess» / **Barnet, H.L. & Hunter, B.B.** 1972. Illustrated genera of imperfect fungi, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess. Международный микологический институт «Описание грибов и бактерий». Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / IMI descriptions of fungi and bacteria. Wallingford, UK, CAB International: <http://www.cabi.org/dfb/> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Эллис М.Б. и Эллис Дж.П. 1997 г. «Микрогрибы на наземных растениях: справочник по идентификации». Слау, СК. Издательство «Richmond Publishing». С. 868 / **Ellis, M.B. & Ellis, J.P.** 1997 г. Microfungi on land plants: an identification handbook. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.

Сноудон А.Л. 2010а. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 1 «Общее

введение и фрукты». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 320 / **Snowdon, A.L.** 2010a. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1 General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Сноудон А.Л. 2010b. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 2 «Овощи». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 416 / **Snowdon, A.L.** 2010b. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 2 Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Лесли Дж.Ф. и Саммерелл Б.А. 2006 г. «Руководство для лабораторий по Fusarium». Оксфорд. Издательство «Blackwell». С. 388 / **Leslie, J.F. & Summerell, B.A.** 2006. The Fusarium laboratory manual. Oxford, Blackwell. 388 pp.

Эрвин Д.К. и Рибейро О.К. 1996 г. «Болезни, вызываемые Phytophthora, по всему миру». Сен-Пол, Миннесота. Издательство «APS Press», Американское фитопатологическое общество. С. 592 / **Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K.** 1996. Phytophthora diseases worldwide. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.

Лейн К.Р., Билз П. и Хьюз К.Дж.Д., под ред. 2012 г. «Грибные фитопатогены». Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Lane, C.R., Beales, P. & Hughes, K.J.D.**, eds. 2012. Fungal plant pathogens. Wallingford, UK, CAB International. 328 pp.

5.5.1.6 Членистоногие

Индекс названий членистоногих CABI (1996 г.) на CD-ROM. Дает информацию о синонимах и ссылки на старые номера журнала «Обзор прикладной энтомологии» / «Review of Applied Entomology» (включая выпуски до 1973 г.).

Хилл Д.С. 1987 г. «Сельскохозяйственные вредители умеренных широт». Кембридж, СК. Издательство «Cambridge University Press». С. 672 / **Hill, D.S.** 1987. *Agricultural insect pests of temperate regions*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 672 pp.

Хилл Д.С. и Уоллер Дж.М. 1982 г. «Паразиты и болезни тропических вредителей: принципы и методы борьбы». Лондон. Издательство «Longman». С. 175 / **Hill, D.S. & Waller, J.M.** 1982. *Pests and diseases of tropical pests: principles and methods of control*. London, Longman. 175 pp.

5.5.1.7 Насекомые

Кэрролл Л.Е., Уайт И.М., Фрейдберг А., Норрбом А.Л., Даллвиц М.Дж. и Томсон Ф.С. «Фруктовые мухи мира» / **Carroll, L.E., White, I.M., Freidberg, A., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C.** *Pest fruit flies of the world*. Доступно по ссылке: http://delta-intkey.com/ffl/www/_wintro.htm (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Кэрролл Л.Е., Норрбом А.Л., Даллвиц М.Дж. и Томсон Ф.С. «Фруктовые мухи мира – личинки» / **Carroll, L.E., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C.** *Pest fruit flies of the world – larvae*. Доступно по ссылке: http://delta-intkey.com/ffl/www/_wintro.htm (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Музей естественной истории. Глобальный индекс названий чешуекрылых «Lepindex»: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/lepindex/>

База данных «ScaleNet»: <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/query.htm>

5.5.1.8 Нематоды

Люк М., Сикора Р.А. и Бридж Дж. под ред. 2005 г. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве субтро-

пиков и тропиков». 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 896 / **Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J.**, eds. 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.

Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. 2013 г. «Фитонематология». 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 568 / **Perry, R.N. & Moens, M.**, eds. 2013. *Plant nematology*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 568 pp.

Сиддики М.Р. 2000 г. «Паразиты растений и насекомых, принадлежащие к отряду Tylenchida». 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 864 / **Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.

5.5.2 Базы данных по аккредитованным лабораториям и экспертам

http://www.eppo.int/DATABASES/diagnostics/diag_quest.htm

5.6 Библиография

Барнет Х.Л. и Хантер Б.Б. 1972 г. «Иллюстрированный журнал родов несовершенных грибов», 3-е издание, Миннеаполис, Миннесота. Издательство «Burgess» / **Barnet, H.L. & Hunter, B.B.** 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess.

Бунхэм Н., Глоувер Р., Томлинсон Дж. и Мамфод Р. 2008 г. «Использование стандартных платформенных технологий для выявления и идентификации патогенов растений». «Европейский журнал фитопатологии», 121: 355-363 / **Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2008. *Exploiting generic platform technologies for the detection*

5. Диагностика

and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 355–363. DOI: 10.1007/978-1-4020-8780-6_15.

Бунхэм Н., Томлинсон Дж. и Мамфорд Р. 2007 г. «Микрокомплексы для быстрой идентификации вирусов растений» Журнал «Ежегодный обзор фитопатологии», 45: 307–328 / **Boonham, N., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 307–328. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.

Брэдбери Дж.Ф. 1985 г. «Руководство по фитопатогенным бактериям». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 332 / **Bradbury, J.F.** 1985. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.

САВИ и ЕОКЗР. 1997 г. «Карантинные для Европы вредные организмы», 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований и Париж, Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений. С. 1425 / **CABI & EPPO.** 1997. Quarantine pests for Europe, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.

Кэннон Р.Дж.К., Пембертон А.В. и Барлет П.В. 1999 г. «Надлежащие меры по ликвидации вредных организмов, не входящих в перечень». Бюллетень ЕОКЗР, 29: 29–36 / **Cannon, R.J. C., Pemberton, A.W. & Bartlett, P.W.** 1999. Appropriate measures for the eradication of unlisted pests. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, 29: 29–36.

Кулен В.А. и Д'Эрде К.Дж. 1972 г. «Метод количественного выделения нематод из ткани растений». Гент, Бельгия, Министерство сельского хозяйства, Государственный сельскохозяйственный

исследовательский центр. С. 77 / **Coolen, W.A. & D'Herde, C.J.** 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.

Декрэмер В. и Хант Д.Дж. 2006 г. «Структура и классификация» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. 2013 г. «Фитонематология». 1-е издание. с. 3–32. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. / **Decraemer, W. & Hunt, D.J.** 2006. Structure & classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 3–32. Wallingford, UK, CAB International.

Эллис М.Б. и Эллис Дж.П. 1997 г. «Микрогрибы на наземных растениях: справочник по идентификации». Слай, СК. Издательство «Richmond Publishing». С. 868 / **Ellis, M.B. & Ellis, J.P.** 1997 г. *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.

ЕОКЗР. 2013а. Диагностика: РМ 7/119 (1) «Выделение нематод» / *Diagnostic: РМ 7/119 (1) Nematode extraction*. Бюллетень ЕОКЗР, 43: 471–495.

ЕОКЗР. 2013б. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов: иллюстрированный глоссарий морфологических терминов в нематологии / *Diagnostic protocols for regulated pests: pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Технический документ ЕОКЗР No. 1056 (rev. 4). Париж, Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений. Доступно по ссылке: http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Эрвин Д.К. и Рибейро О.К. 1996 г. «Болезни, вызываемые *Phytophthora*, по всему миру». Сен-Пол, Миннесота. Издательство «APS Press», Американское фитопатологическое общество.

C.592 / **Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K.** 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.

Фенвик Д.В. 1940 г. «Методы извлечения из почвы и подсчета цист *Heterodera schachtii*». «Журнал по гельминтологии», 18: 155-172 / Fenwick, D.W. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, 18: 155–172.

Флегг Дж.Дж.М. и Хупер Д.Дж. 1970 г. «Выделение свободноживущих стадий из почвы» в Саузи Дж.Ф., под ред. «Лабораторные методы работы с растительными и почвенными нематодами». с. 5-22. Технический бюллетень 2. Лондон, Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия / **Flegg, J.J.M & Hooper, D.J.** 1970. Extraction of free-living stages from soil. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, pp. 5–22. *Technical Bulletin 2*. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Хокланд С., Инсерра Р.Н., Миллар Л. и Леман П.С. 2006 г. «Международное здоровье растений – применение законодательства на практике» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. 2013 г. «Фитонематология». 1-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. с. 327-345 / **Hockland, S., Inserra, R.N., Millar, L. & Lehman, P.S.** 2006. *International plant health – putting legislation into practice*. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 327–345. Wallingford, UK, CAB International.

Хупер Д.Дж. 1986 г. «Выделение нематод из ткани растений» в Саузи Дж.Ф., под ред. «Лабораторные методы работы с растительными и почвенными нематодами». Справочник 402, 6-е издание, с. 51-58. Лондон, Министерство сель-

ского хозяйства, рыболовства и продовольствия / **Hooper, D.J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Хупер Д.Дж. и Эванс К. 1993 г. «Выделение, идентификация и борьба с фитопаразитическими нематодами» в Эванс К., Траджилл Д.М. и Вебстер Дж.М., под ред. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве умеренных широт», с. 1-60. Валлингфорд, Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Hooper, D.J. & Evans, K.** 1993. Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. In K. Evans, D.M. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 1–60. Wallingford, UK, CAB International.

Хупер Д.Дж., Халлманн Дж. и Субботин С.А. 2005 г. «Методы выделения, обработки и выявления растительных и почвенных нематод» в Люк М., Сикора Р.А. и Бридж Дж, под ред. 2005 г. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве субтропиков и тропиков». 2-е издание, с. 53-86. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CAB International.

Международный микологический институт «Описание грибов и бактерий». Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / IMI descriptions of fungi and bacteria. Wallingford, UK, CAB International: <http://www.cabi.org/dfb/> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

5. Диагностика

Янсе Дж.Д. 2010 г. «Фитобактериология: принципы и практика». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 368 / **Janse, J.D.** 2010. *Phytobacteriology: principles and practice*. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.

Леллиот Р.А. и Стед Д.Е. «Методы диагностики бактериальных болезней растений». Оксфорд, Издательство «Wiley». С. 224 / **Lelliot, R.A. & Stead, D.E.** 1991. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, Wiley. 224 pp.

Лесли Дж.Ф. и Саммерелл Б.А. 2006 г. «Руководство для лабораторий по *Fusarium*». Оксфорд, Издательство «Blackwell». С. 388 / **Leslie, J.F. & Summerell, B.A.** 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Oxford, Blackwell. 388 pp.

Люк М., Сикора Р.А. и Бридж Дж. под ред. 2005 г. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве субтропиков и тропиков». 2-е издание. Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 896 / **Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J.**, eds. 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.

Манзаниа-Лопес Р.Х. и Марбан-Мандоза Н., под ред. 2012 г. «Практическая фитонематология». Мехико, Главная сельскохозяйственная библиотека, издательство «Grupo Mundi-Prensa». С. 883 / **Manzanilla-López, R.H. & Marbán-Mendoza, N.**, eds. 2012. *Practical plant nematology*. Mexico City, Biblioteca Básica de Agricultura, Grupo Mundi-Prensa. 883 pp.

Монгер В.А., Аликай Т., Ндунгуру Дж., Кинюа З.М., Поттс М., Ридер Р.Х., Миано Д.В., Адамс И.П., Бунхэм Н., Глоувер Р.Х. и Смит Дж. 2010 г. «Полная последовательность генома танзанийского штамма вируса коричневой полосатости

маниоки и сравнение с последовательностью угандийского штамма». Журнал «Архивы вирусологии», 155: 429-433 / **Monger, W.A., Alicai, T., Ndunguru, J., Kinyua, Z .M., Potts, M., Reeder, R.H., Miano, D.W., Adams, I.P., Boonham, N., Glover, R.H. & Smith, J.** 2010. The complete genome sequence of the Tanzanian strain of Cassava brown streak virus and comparison with the Ugandan strain sequence. *Archives of Virology*, 155: 429–433. DOI:10.1007/s00705-009-0581-8.

Сейнхорст Дж. В. 1962 г. «Об умерщвлении, фиксации и переносе нематод в глицерин». Журнал «Нематология», 8: 29–32 / **Seinhorst, J.W.** 1962. On the killing, fixing and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*, 8: 29–32.

Сиддики М.Р. 2000 г. «Паразиты растений и насекомых, принадлежащие к отряду Tylenchida». 2-е издание. Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 864 / **Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.

Смит Дж.Дж., Вааге Дж., Вудхолл Дж.В., Бишоп С.Дж. и Спенс Н.Дж. 2008 г. «Трудности предоставления фитосанитарных диагностических услуг в Африке». «Европейский журнал фитопатологии», 121: 365-375 / **Smith, J.J., Waage, J., Woodhall, J.W., Bishop, S.J. & Spence, N.J.** 2008. The challenge of providing plant pest diagnostic services for Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 365–375.

Сноудон А.Л. 2010а. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 1 «Общее введение и фрукты». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 320 / **Snowdon, A.L.** 2010а. *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1 General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Сноудон А.Л. 2010b. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 2 «Овощи». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 416 / **Snowdon, A.L.** 2010b. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 2 Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Тарджан А.К. 1967 г. «Влияние температуры и перекиси водорода на выделение роющих нематод из корней цитрусовых». Журнал «Вестник болезней растений», 51: 1024–1028 / **Tarjan, A.C.** 1967. Influence of temperature and hydrogen peroxide on the extraction of burrowing nematodes from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 51: 1024–1028.

Тарджан А.К. 1972 г. «Исследования по выделению цитрусовой нематоды *Tylenchulus semipenetrans* из корней цитрусовых». Журнал «Вестник болезней растений», 56: 186–188 / **Tarjan, A.C.** 1972. Observations on extracting citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 56: 186–188.

Томлинсон Дж. и Бунхэм Н. 2008 г. «Потенциал использования LAMP для выявления фитопатогенов». Журнал «Обзоры Международного центра сельскохозяйственных исследований: Перспективы в сельском хозяйстве, ветеринарии, диетологии и природных ресурсах», 3: 1–7 / **Tomlinson, J. & Boonham, N.** 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1–7.

Веллер С.А., Аспин А. и Стед Д.Е. 2008 г. «Классификация и идентификация бактерий, связанных с растениями, посредством анализа профиля жирных кислот». Бюллетень ЕОКЗР, 06/2008; 30(3–4): с. 375–380 / **Weller, S.A., Aspin, A. & Stead, D.E.** 2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *EPPO Bulletin*, 06/2008; 30(3–4): 375–380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.

Вейгерс А.Л. 2003 г. «Достоверные методы: обеспечение качества разработки аналитических методов, валидация, утверждение и передача ветеринарным испытательным лабораториям». Журнал «Исследования по ветеринарной диагностике», 15(4): 303–310 / **Weigers, A.L.** 2003. Valid methods: the quality assurance of test method development, validation, approval, and transfer for veterinary testing laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15(4): 303–310.

Винфильд А.Л., Энфильд М.А. и Фореманн Дж.Х. 1987 г. «Использование аппарата для отмучивания для извлечения цистообразующих нематод и других мелких беспозвоночных из почвенных образцов». Журнал «Анналы прикладной биологии», 111: 223–231 / **Winfield, A.L., Enfield, M.A. & Foremann, J.H.** 1987. A column elutriator for extracting cyst nematodes and other small invertebrates from soil samples. *Annals of Applied Biology*, 111: 223–231. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1987.tb01449.x.

6. Создание изображений образцов

Введение

Создание изображений для научных целей или научное фотографирование – это метод, широко используемый в надзорной деятельности с целью идентификации и документирования. Он заключается в создании фотографий или рисунков образцов, насколько это возможно, в наиболее точной и объективной форме. В этой главе представлено введение в некоторые причины создания изображений образцов, а также описываются некоторые связанные с этим процессы и методы. Для получения более подробной информации по этому вопросу, читателю дается ссылка на сайт <http://www.phytosanitary.info/> с фитосанитарными ресурсами.

6.1 Зачем создавать изображения для диагностики?

6.1.1 Документирование

Одна из самых обычных причин фотографирования образцов – это их документирование с целью использования в будущем в качестве референтного материала либо с целью резервного дублирования физической коллекции. Точное, объективное изображение образца может быть очень полезной гарантией защиты от обесцвечивания, повреждения, порчи или потери.

6.1.2 Референтный материал

Электронными изображениями можно обмениваться в режиме онлайн в библиотеке изображений или через электронную почту, и они могут использоваться в качестве референтного материала таким же образом, как и оригинальный образец. Изображения образцов, которые были положительно идентифицированы, могут использоваться для целей сравнения при идентификации будущих

образцов. Обмен изображениями в режиме онлайн позволяет более широкой аудитории, чем это было возможно раньше, получить доступ к образцам. Это также подвергает информацию тщательному изучению большим количеством щепетильных «обозревателей», зачастую приводя к повышению точности.

6.1.3 Идентификация

В случаях, когда идентификация образца не была проведена с положительным результатом, изображения соответствующих диагностических характеристик могут быть направлены для идентификации эксперту вместо оригинального образца. Скорость и легкость, с которыми изображения могут отправляться экспертам, а также уменьшение риска потери или повреждения образца в процессе перевозки, делает создание изображений образцов мощным оружием в арсенале лаборатории, применяемом при проведении надзорных мероприятий.

6.2 Что такое научное изображение?

Основной целью создания научных фотографий и иллюстраций является точное изображение образца в максимально возможных подробностях. В отношении диагностической фотографии целью является следующее:

- взять в объектив весь объект (используя методы совмещения фокуса);
- обеспечить высокий уровень детализации объекта (изображения в высоком разрешении);
- обеспечить высокий уровень точности цвета (используя серую карточку, цветные карточки);
- обеспечить высокий уровень точности измерений (включив масштабную полосу);
- показать стандартизированный вид (сверху, снизу, сбоку);

6. Создание изображений образцов

- использовать единообразное освещение;
- выставлять правильную экспозицию;
- использовать сплошной монотонный фон, предпочтительно бесцветный.

6.3 Рабочий процесс

Создание изображений образцов может быть сложным и длительным процессом. Если вы намереваетесь создавать изображения большого количества

образцов, организуйте рабочий процесс так, чтобы он был функциональным и эффективным. Пример рабочего процесса, который может быть полезно внедрить в практику, показан на рис. 20. Как отмечено выше, более подробная информация о формировании оптических изображений образцов, наколотых на энтомологическую булавку, помещенных в жидкость или фиксированных на предметном стекле, особенно образцов членистоногих, доступна в интернете.



Рисунок 20. Пример рабочего процесса создания изображений

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

Введение

По мере увеличения объемов всемирной торговли и интенсивности международного перемещения людей страны сталкиваются с большими рисками проникновения вредных организмов, которые могут снизить качество и объем сельскохозяйственного производства и привести к ограничениям доступа на рынок. В то же самое время наблюдается снижение уровня экспертных знаний в сфере таксономии и концентрация специалистов в городских центрах вдалеке от тех мест, где обнаруживают вредные организмы и где услуги экспертов-систематиков больше всего востребованы. Поскольку эти факторы в своей совокупности неявно влияют на потенциальное увеличение риска проникновения вредных организмов, нам необходимо искать более быстрые, дешевые и лучшие способы обеспечения идентификации вредных организмов. Мобильные технологии и интернет дают новые решения проблемам, одинаковым для всего мира, и в полной мере могут применяться также и к этим фитосанитарным проблемам, но для этого понадобится их адаптация, переход к новым процессам и новому способу проведения диагностики.

7.1 Что такое дистанционная диагностика, и зачем она нам нужна?

Уже в течение нескольких лет врачи применяют коммуникационные технологии для создания концепции телемедицины (рис. 21), когда консультирование пациентов осуществляется на расстоянии. Телемедицина особенно удобна для людей, живущих в изолированных поселениях или удаленных

районах, где доступ к специалистам или возможность получить заключение специалиста ограничены.

Ограничения, связанные с расстоянием и экспертным мнением, относятся и к фитосанитарной диагностике, в которой наблюдается общемировая тенденция к снижению как профессиональных знаний в области таксономии, так и, в целом, количества специалистов по фитосанитарной диагностике. Более того, наши специалисты, как правило, сконцентрированы в крупных городских центрах, тогда как большинство видов вредных организмов выявляется в сельскохозяйственных и удаленных районах или на некотором расстоянии от ближайшего специалиста. В то же самое время глобализация привела к росту объемов международной торговли и увеличению международного перемещения людей. С таким ростом перемещения товаров и людей приходит и увеличение вероятности перемещения вредных организмов. Потребность в диагностических услугах растет по мере снижения кадровых ресурсов в специальных областях знаний, и поэтому мы вынуждены искать пути решения этой проблемы, которые являются быстрыми, недорогими и эффективными.

Дистанционная диагностика вредных для растений организмов схожа с телемедициной тем, что она использует интернет и другие коммуникационные технологии для обмена изображениями вредного организма или симптомов, вызванных вредными организмами, со специалистами, находящимися в разных местах. Можно использовать целый ряд цифровых коммуникационных инструментов и устройств для обмена

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

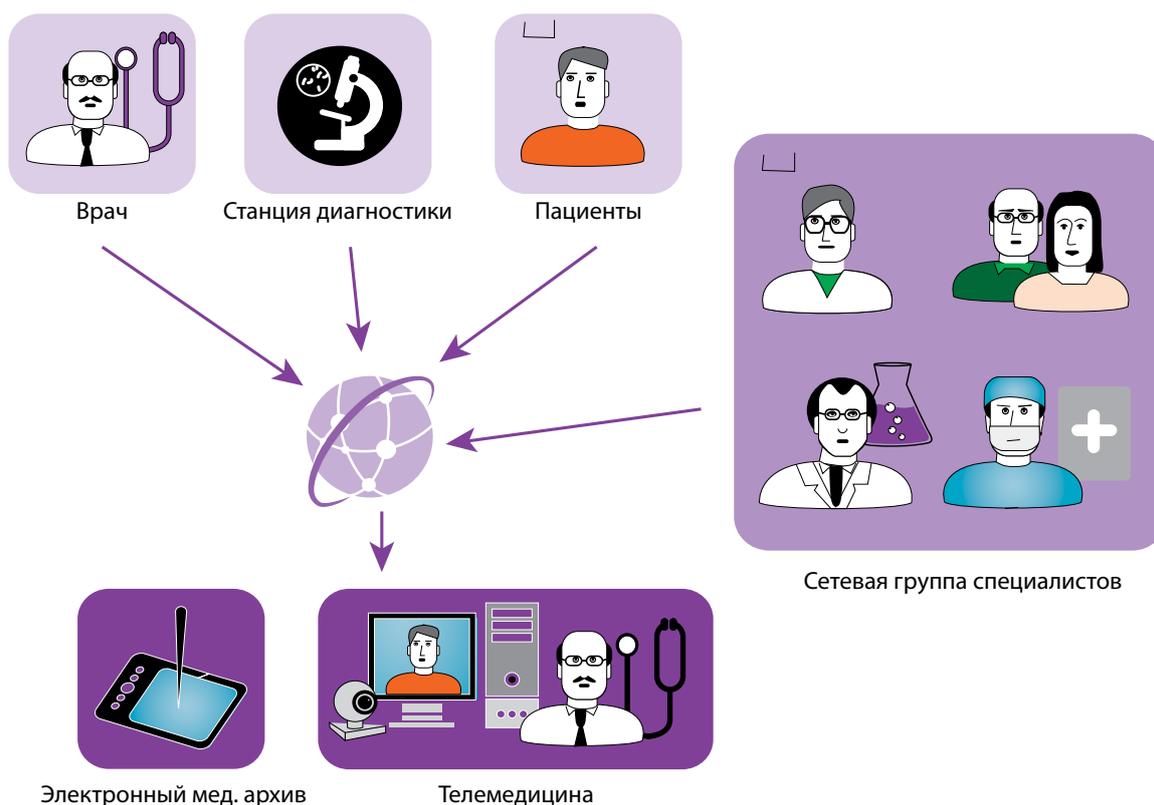


Рисунок 21. Телемедицина использует интернет для обмена информацией, касающейся пациента, в режиме реального времени

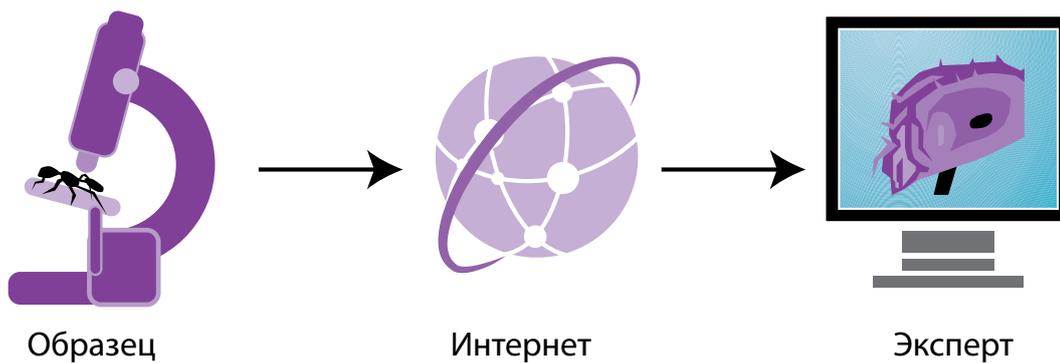
изображениями вредных организмов и информацией. Этот процесс может происходить в реальном времени или нет, и может использоваться программное обеспечение для фиксации и хранения информации, обмен которой осуществляется в течение процесса, с созданием постоянной цифровой записи о вредном организме и его идентификации. В следующих разделах описываются некоторые системы, используемые для проведения дистанционной идентификации вредных организмов.

7.1.1 Основные принципы

Типичное оснащение лаборатории для проведения дистанционной диагностики будет включать в себя микроскоп (препаровальный или биологический), видеокамеру, прикрепленную к микроскопу, а также компьютер или интернет-сервер с графическим интер-

фейсом. Изображениями, получаемыми с видеокамеры, можно обмениваться посредством подсоединения компьютера или сервера к интернету и назначения этому месту статического IP-адреса. Прямое подсоединение камеры к интернету позволяет людям, находящимся в других местах, просматривать изображения с камеры на своих компьютерах в режиме реального времени, используя веб-браузер для подключения к IP-адресу камеры, присоединенной к микроскопу (рис. 22). Лицо, которое делится изображением (место расположения камеры), может общаться с лицом, просматривающим изображение (специалистом), используя любой из многообразных инструментов коммуникации.

Была установлена эффективность дистанционной микроскопии в условиях реального мира. Испытания проводились Австралийской карантинной и инспекци-



ПРЯМАЯ ПЕРЕДАЧА!

Рисунок 22. Специалист может получить доступ к изображению вредного организма через интернет с устройства «Nikon DS-L2», подсоединенного к камере микроскопа

онной службой (АКИС) и Министерством биобезопасности сельского и лесного хозяйства Новой Зеландии, которые проверили эффективность дистанционной микроскопии в условиях карантина растений. Опыты показали, что в 77 процентах случаев в Австралии диагностика приводила к принятию реальных решений по вопросам биобезопасности (Томсон и др. /Thompson et al., 2011 г.).

Существует несколько разных типов систем, которые могут облегчить обмен изображениями через интернет в режиме реального времени. Чтобы передать изображения с микроскопа на компьютер требуется специальное программное обеспечение для фиксации и передачи изображений через интернет. Это программное обеспечение обычно включает в себя редактирование и архивирование изображений, и для него требуется, чтобы компьютеру был присвоен статический IP-адрес. Примерами этой системы могут служить программное обеспечение «Olympus NetCam» и модуль «Leica Network LAS».

Кроме того, компания «Nikon» предлагает блок управления камерой серии DS-L с графическим интерфейсом, который фиксирует изображение с микроскопа и напрямую направляет его через

интернет без какого-либо компьютерного устройства или дополнительного программного обеспечения. У устройства «DS-L» своя собственная уникальная операционная система, посредством которой пользователь может выбрать свои собственные IP-параметры. Оно также располагает собственным комплектом для редактирования изображений и инструментами для снабжения изображений комментариями и их выделения при прямой передаче, а современные модели оснащены сенсорным экраном для легкости эксплуатации.

В обоих типах систем обмен изображениями может ограничиваться пределами локальной сети (LAN) или может быть доступен в сети широкого доступа (WAN), такой как интернет. Для каждого типа сети потребуются определенные протоколы безопасности, которые будут определяться организацией, и обмен данными в рамках этих сетей и между ними потребует соблюдения соответствующих протоколов безопасности. Например, организации часто создают слои защитных сетевых экранов для ограничения потока данных по своей сети в качестве меры предосторожности против распространения вредоносного программного обеспечения («вирусов»), которые могут заразить

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

сеть. Они также создают защитные сетевые экраны, предназначенные для защиты сети от внешней атаки и поэтому ограничивающие поток определенных видов подключений и данных, попадающих в их сеть. Сети могут иногда ограничивать передачу данных за пределы локальной сети LAN.

Чтобы поделиться изображениями с микроскопа, расположенного в сети LAN, изображения должны быть созданы на устройстве, имеющем IP-адрес, доступ к которому может быть получен через интернет. Чтобы напрямую связаться с IP-адресом устройства, люди, находящиеся за пределами сети LAN должны пройти через защитный сетевой экран организации. Отсутствие протокола безопасности позволило бы внешним пользователям иметь прямой доступ к внутренней сети. Организациям, которые хотят принимать участие во внешней сетевой группе дистанционной микроскопии, потребуется установить определенные протоколы безопасности с защитными сетевыми экранами для защиты своих систем (рис. 23). Тип требуемой безопасности будет зависеть от типа системы аппаратного обеспечения, используемого для фиксации изображений с камеры микроскопа. Такие системы как «Olympus Netcam» и «Leica Network LAS», основанные на при-

менении компьютеров для фиксации изображений, более подвержены неавторизованным проникновениям, поскольку у компьютеров общие операционные системы (Windows, Linux, Apple/Mac OS), и информация на них хранится на жестких дисках, которые часто подключены к сети LAN. Система «Nikon» – менее уязвима, поскольку она не может хранить данные и использует операционную систему «Nikon» очень ограниченного применения; в результате этого, она неуязвима для атак и не может хранить вирусы.

7.1.2 Аппаратура цифрового отображения «Nikon»

Цифровая система создания изображений «Nikon» состоит из цифровой камеры для микроскопа, которая присоединена к отдельному блоку управления камерой, специально предназначенному для этих целей (рис. 24).

У блока управления камерой свой собственный экран и операционная система, поэтому не требуется никакого дополнительного компьютера. Он располагает всеми сетевыми возможностями и может быть подключен к сети LAN или интернету. Веб-браузер поддерживает просмотр изображений, передаваемых напрямую, и подключение через стандартные протоколы интернет-связи

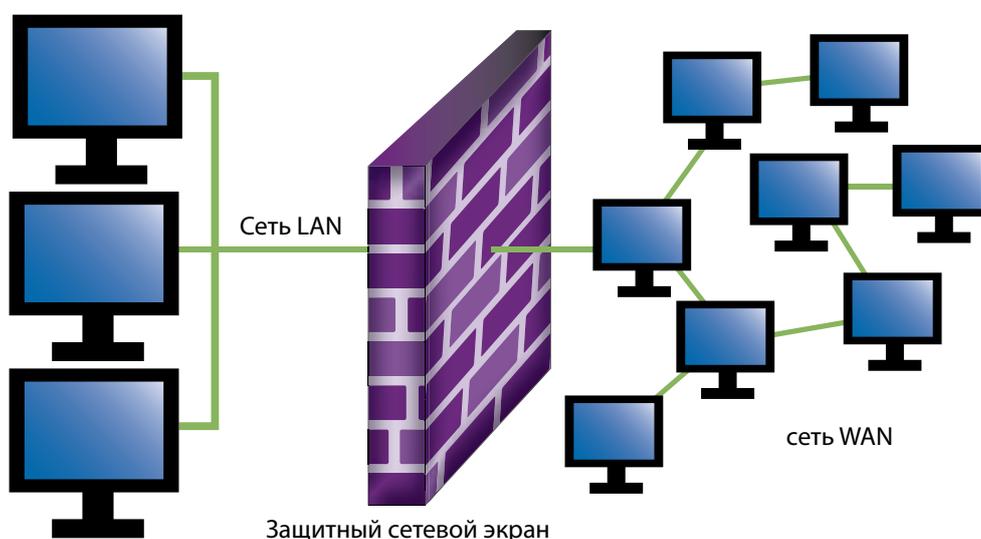


Рисунок 23. Защитные экраны для сетей LAN

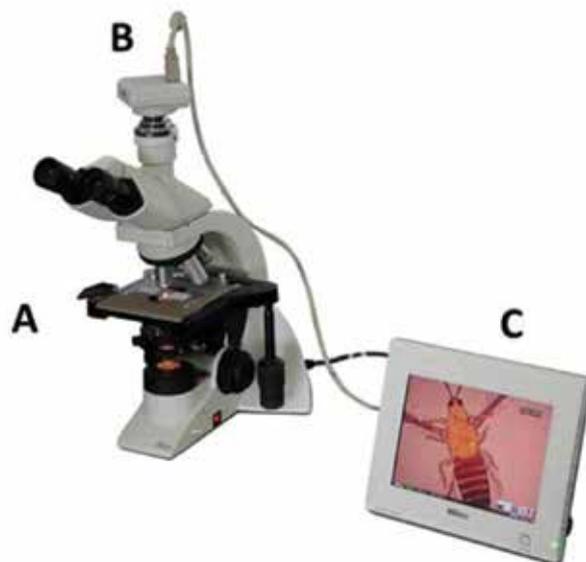


Рисунок 24. Камера Fi-1 и панель DS-L2, подключенные к **A** – микроскопу; **B** – Цифровая камера «Nikon» (Fi-1); **C** – блок управления камерой «Nikon» (DS-L2), который подключается к интернету

и передачи файлов (HTTP, telnet, FTP), кроме того он совместим с протоколом DHCP (протокол динамического выбора конфигурации хост-машины) по назначению IP-адресов. Этот блок также может быть подключен к компьютеру или к большому внешнему монитору, также он может записывать изображения на карту памяти USB. Для создания изображений, измерения объектов и создания приме-

чаний имеется исчерпывающий набор меню. Пример блока, который установлен в Таиланде, показан на рис. 25.

7.1.2.1 Доступ в интернет и конфигурация с устройством «Nikon DS-L»

Панели «Nikon» серии DS-L содержат веб-сервер, который поддерживает сайт,

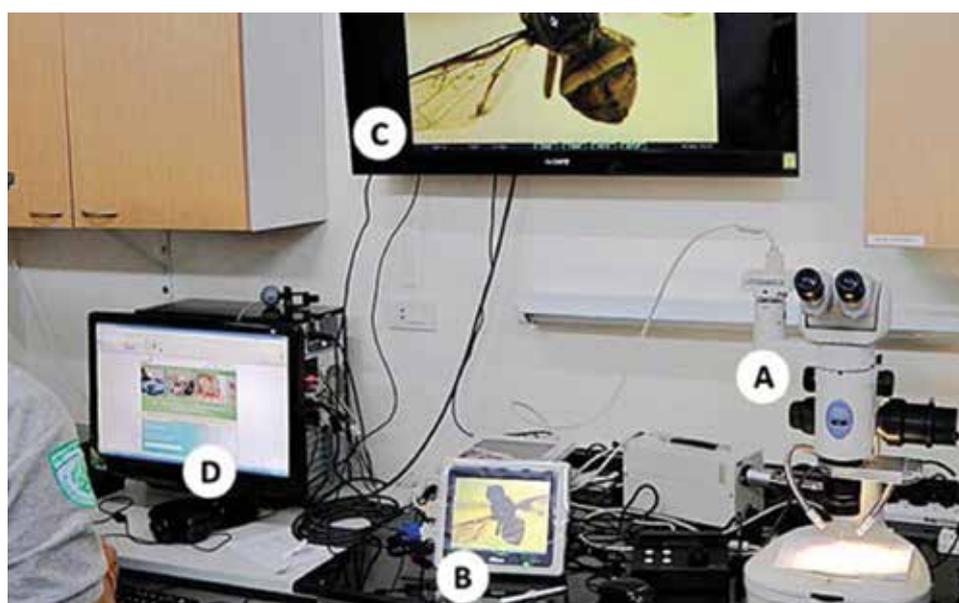


Рисунок 25. Аппаратура «Nikon» для дистанционной микроскопии, установленная в лабораториях карантина растений в г. Бангкоке, Таиланд **A** – Цифровая камера «Nikon»; **B** – Блок управления камерой «DS-L2»; **C** – Большой монитор для блока управления камерой и **D** – ПК, используемый для получения доступа к таксономической информации в интернете, обмена информацией с удаленными пользователями и получения доступа к коллективно используемому изображению с камеры через интернет или сеть LAN.

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

обеспечивающий доступ к камере. Для подключения камеры к интернету требуется фиксированный IP-адрес. Сервер DS-L обычно расположен за защитным экраном сети, поэтому все желающие получить доступ к изображениям с камеры должны пройти через защитные сетевые экраны организации для получения доступа к серверу.

По идее, это может показаться риском нарушения системы безопасности, поскольку требует открытия порта в защитном сетевом экране, чтобы разрешить доступ к панели DS-L, но, как упомянуто выше, для внешних пользователей возможность доступа в сеть LAN через эту панель ограничена. Если бы кто-то получил несанкционированный доступ к панели DS-L, он смог бы увидеть только изображение с камеры микроскопа. Поскольку это оборудование подключено только тогда, когда существует необходимость проведения дистанционной идентификации вредного организма, возможность взломать систему – ограничена.

Несмотря на то, что панель не вызывает большого риска нарушения системы безопасности сети LAN, можно внедрить дополнительные меры по изоляции панели от сети организации. К некоторым стратегиям, которые можно использовать для полного исключения угрозы, относится использование обратного прокси-сервера или использование в сети сегмента DMZ для изоляции панели «DS-L» от сети (рис. 26).

7.2 Методы обмена информацией при проведении дистанционной микроскопии в режиме реального времени

7.2.1 Стандартный голосовой телефон

При обмене изображением образца со специалистом вовлеченные в процесс стороны должны общаться друг с другом с целью обсуждения образца и переда-

чи инструкций. Например, специалисту может понадобиться увидеть ключевые характеристики образца для того, чтобы провести идентификацию, и поэтому ему нужно проинструктировать неспециалиста, каким образом следует разместить образец под микроскопом в ходе этого процесса. Поскольку специалист может видеть образец в режиме реального времени, общение должно протекать относительно плавно.

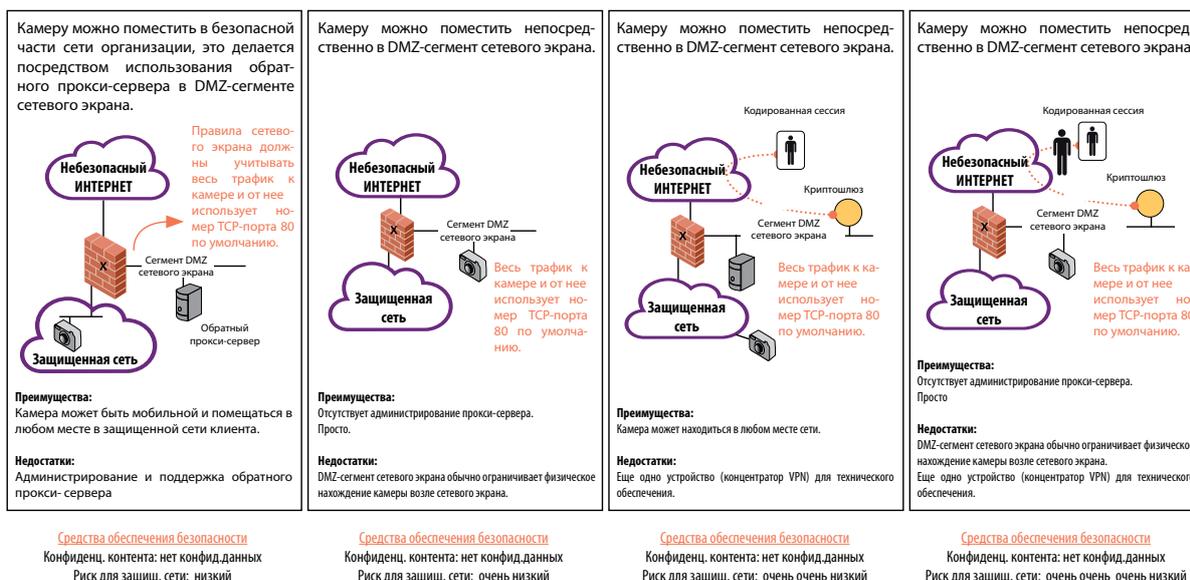
Простого телефонного звонка часто бывает достаточно для проведения дистанционной идентификации в большинстве случаев, и, будь это стационарный или мобильный аппарат, телефон является, пожалуй, наиболее распространенным инструментом коммуникации, имеющимся в наличии. В любом случае инструменты коммуникации могут быть ограничены во многих местах, и других способов может не быть.

7.2.2 Система видеоконференц-связи

Видеоконференц-связь может способствовать взаимодействию между теми, кому нужна идентификация, и теми, кто может ее обеспечить. Например, в условиях конференц-связи многочисленные специалисты, находящиеся в разных местах, могут одновременно принимать участие в дистанционной идентификации. Такие интернет-службы как Skype, Google Hangouts, Apple FaceTime и другие являются обще- и легкодоступными для мировой аудитории (рис. 27 и 28). Такие приложения имеют средства записи и проведения интерактивной конференции, а также могут записывать обсуждение, которое сопровождает каждый случай дистанционной идентификации.

7.2.3 Программное обеспечение для «лекционной доски» на основе веб-приложений

«Электронные доски» могут использоваться для увеличения обмена информацией и обучения. Они позво-



БОЛЬШЕ АДМИНИСТРИРОВАНИЯ

Рисунок 26. Варианты ИТ-безопасности при установке камеры микроскопа в сети LAN для обеспечения внешнего доступа из интернета

люют делать комментарии по изображению в режиме реального времени, при этом все стороны могут внести вклад в обсуждение, вне зависимости от их местоположения. В любой момент обсуждения изображение и комментарии можно сохранить для использования в справочных целях в будущем. Системы



Рисунок 27. Неспециалист в Таиланде использует видео-звонок через Skype для обсуждения образца со специалистами во Вьетнаме. Изображение образца предоставляется специалистам во Вьетнаме через интернет при помощи системы «Nikon DS-L2»

электронных досок варьируются по своим свойствам от простых до усложненных. Программа для электронной доски «Microsoft Messenger», которая бесплатно прилагается к Windows, – проста, ее можно быстро изучить, и она удовлетворяет основные потребности.



Рисунок 28. Изображением образцов, размещенных под USB-микроскопом, можно поделиться с экспертом через ПО для работы с видео. В этом случае разговор между лабораторией и экспертом осуществляется по телефону. В качестве варианта можно использовать Skype для видео- и голосовой связи

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

7.2.4 Другие методы фиксации изображений и обмена ими при прямой передаче

Системы создания изображений на основе веб-приложений, такие как системы, описанные выше, – относительно дорогостоящие, и несмотря на то, что они создают изображения наилучшего качества и предоставляют пакет дополнительных возможностей для работы с ними, существуют более простые и дешевые способы обмена изображениями при прямой передаче. При условии, что изображения прямой передачи (поток видеоданных) можно зафиксировать на ПК, любая программа, позволяющая осуществлять совместный доступ к рабочему столу, может использоваться для обмена изображениями через интернет с другими ПК, расположенными в разных местах. К этим программам относятся *Windows Remote Desktop*, *Skype*, *Ustream*, *Google Hangouts*, *Web-conferencing* и другие программы, которые доступны бесплатно. Один из недостатков этого метода заключается в том, что качество изображений может быть снижено до такой степени, что ключевые для идентификации детали теряются. Это происходит по той причине, что такие типы программ применяют свои собственные условия обработки изображений, которые могут значительно снизить качество. И наоборот, системы, позволяющие осуществлять прямой доступ к изображению образца, теряют незначительно или почти не теряют качества.

Во многих случаях потеря качества может и не стать слишком большой помехой для идентификации. Все это зависит от природы образца и уровня необходимой детализации. При ограниченных ресурсах этот подход может считаться одним из вариантов. Недорогое оборудование для фиксации изображения, такое как USB-микроскопы, может, без сомнения, использоваться в этой ситуации (рис. 29).

Однако заметьте, что организации могут ввести ограничения, связанные с обеспечением безопасности, на использование механизмов коллективного пользования на основе веб-приложений, аналогичных описанным выше.

7.3 Процессы дистанционной диагностики для образования и обучения

Возможность делиться изображениями с микроскопа при прямой передаче данных с интернет-пользователями, находящимися во множестве разных мест, представляет собой идеальную возможность для дистанционного обучения людей. Обмениваясь изображениями с микроскопа через интернет, специалисты по диагностике и систематике могут продемонстрировать, как идентифицировать виды вредных организмов или различать симптомы или свойства, характерные для определенного вредного организма. Дополнительные устройства связи могут использоваться для создания среды видео-конференции, в которой могут проходить обсуждения, использоваться электронные доски, проходить общение, документирование, а также создание фото-, видеоизображений и аудиозаписей. Это создает долговременную запись процесса обучения, которой участник может воспользоваться в будущем в справочных целях. Результат – это интерактивное обучение, являющееся недорогим и эффективным, в ходе которого участники совершенствуют свои навыки, получая доступ к общению со специалистом, не выходя за пределы своего комфортного офиса.

7.3.1 Дистанционная диагностика в полевых условиях

Во многих случаях вредные организмы или проблемы, вызываемые ими, можно идентифицировать по изображениям. Создание карманных компью-



Рисунок 29. Слева: В пункте досмотра на границе с USB-микроскопа на ПК передаются изображения, которые могут просматривать удаленные специалисты посредством инструментов взаимодействия через интернет, таких как Skype. Центр: USB-микроскоп с 20–200-кратным увеличением. Справа: Пограничный инспектор изучает вредные организмы и создает изображения, используя USB-микроскоп

теров, USB-микроскопов, телефонов с камерами, беспроводного интернета и широкомасштабных мобильных сетей в настоящее время делает возможным создавать изображения с большим увеличением, высоким разрешением практически в любом месте и делиться ими через интернет или телефонные сети. Эти технологии позволяют упростить процесс фитосанитарной диагностики таким образом, чтобы изображениями вредного организма или симптомов можно было обмениваться со специалистами прямо с поля, используя мобильные устройства. Идентификация до уровня вида не всегда требуется для того, чтобы принять решение по контролю вредных организмов. Наоборот, своевременное принятие стратегий борьбы с вредными организмами может быть более важным, чем промедление из-за идентификации оригинального образца. Не все виды диагностики можно проводить таким способом, но значительная часть фитосанитарных проблем могла бы решаться быстро и эффективно, если бы сотрудники, работающие в поле, могли бы обмениваться

информацией и общаться со специалистами, используя мобильные устройства.

7.3.1.1 Оборудование для мобильных устройств

В настоящее время существует ряд макросъемочных линз и беспроводных микроскопов для мобильных устройств, обеспечивающих увеличение от 4-х до 200-кратного для использования в полевых условиях (смотрите, например, <http://www.photojojo.com> и <http://www.chinavasion.com>). Эти устройства – недорогие и могут применяться широкой группой пользователей в полевых условиях, при этом можно получать высококачественные изображения вредных организмов и делиться ими с сообществами людей, которые могут давать коллективные комментарии или предлагать идентификацию. Эти устройства наряду с привлечением через интернет больших групп людей и социальными сетями могут значительно расширить возможности отдельных лиц и групп по идентификации вредных организмов способом,

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов



Рисунок 30. В центре: Разнообразные простые аксессуары позволяют мобильным телефонам создавать изображения вредных организмов с большим увеличением. Эти изображения могут быть представлены сообществам через облачные сети для обсуждения. Эти сообщества могут включать в себя местные или региональные НОКЗР. Изображения, размещенные по краям, были получены при помощи беспроводного микроскопа компании «Hot Electronics» и мобильного телефона. **Слева** расположены фотографии бурой пятнистости папайи. **Справа** показан целый ряд снимков с разным увеличением, полученных при помощи беспроводного микроскопа

являющимся быстрым и эффективным (рис. 30). На уровне полевого исследования это означает, что решения по защите растений от вредных организмов могут быть приняты быстрее, а в случаях, когда в процессе участвуют большие сетевые коллективы, широко распространяется информация о вредных организмах. Кроме того, этот коллективный подход к решению проблем означает, что более опытные члены сетевой группы делятся своими знаниями с менее опытными членами, тем самым повышая уровень навыков у всех участников группы.

7.3.2 Виртуальные сети для дистанционной диагностики

Привлечение через интернет больших групп людей стало мощным явлением обмена знаниями и их формирования в цифровом пространстве. Многочисленные сайты, предназначенные для объединения людей разными способами, могут предоставить пользователям широкий выбор возможностей участия в групповой деятельности. Социальные сети и

совместное пользование сайтами может обеспечить людей средствам глобального обмена информацией со знакомыми и незнакомыми людьми или возможностью связываться с определенными людьми или частными группами.

Sermo – это онлайн сообщество врачей с более чем 200 тыс. членов, которые могут обмениваться клинической информацией для оказания содействия в постановке диагнозов и формирования комплекса медицинских знаний. Подобные социальные сети могли бы использоваться для обмена информацией о вредных организмах с целью идентификации вредных организмов и предоставления рекомендаций по стратегиям борьбы с ними (рис. 31). Существующие сайты и программные продукты могут обеспечить основу для таких сетей, в которых фермеры, консультанты, агрономы, работающие дистанционно, и специалисты могут обмениваться диагностической информацией и принимать коллективные решения по борьбе с вредными организмами. Виртуальные

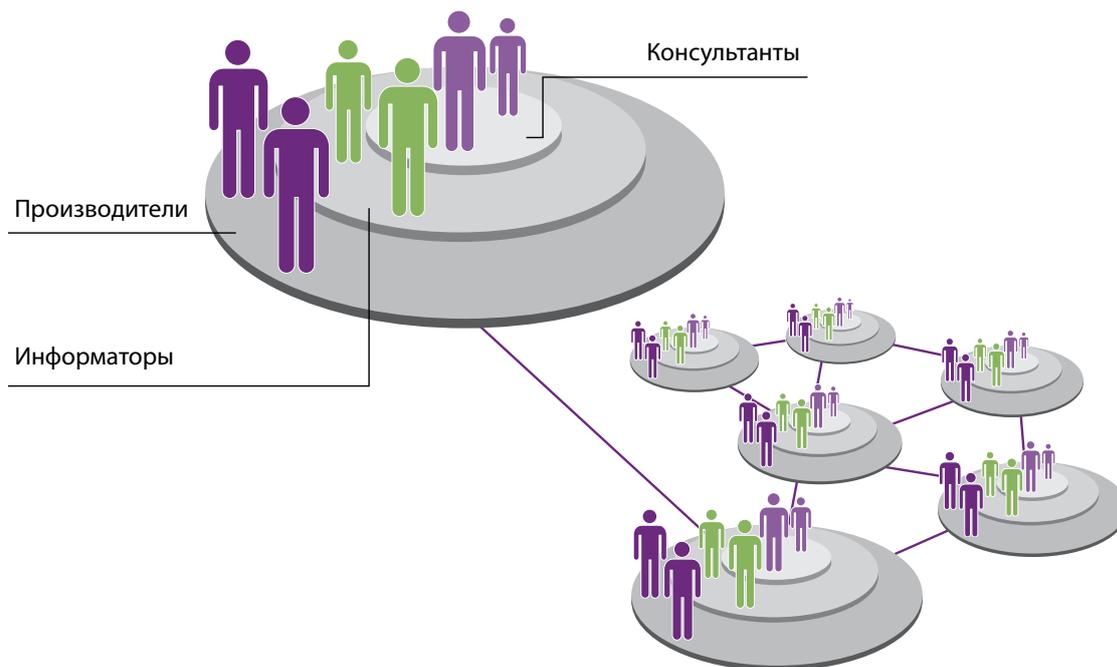


Рисунок 31. Предлагаемая сеть производителей, консультантов, информаторов из службы распространения сельскохозяйственных знаний и специалистов

сети могут быть локальными, начиная с существующих профессиональных связей и расширяясь до районных, национальных и даже международных сетей и опираясь на увеличивающийся общий фонд знаний и навыков.

7.3.2.1 Программное обеспечение для мобильных устройств

Стремительный рост количества мобильных телефонов, которыми владеют граждане, и более широкий сервисный охват проложили дорогу к массовой коммуникации и обмену информацией. Эффективность мобильных телефонов, используемых при дистанционной диагностике, может быть улучшена посредством использования программного приложения, которое не только упрощает процесс коммуникации, но и запоминает и хранит данные. Электронная почта используется для обмена информацией о вредных организмах, однако простой обмен изображениями через службы электронной почты ограничивает взаимодействие рамками выбранной

группы и не позволяет запоминать, хранить и делиться информацией с более широкой группой. Более того, поскольку взаимодействие через электронную почту рассредоточено и лишено прямого контакта, с трудом можно обобщить данные для дальнейшего использования в справочных целях. Поэтому желательно использовать сайты или программное обеспечение, которые обеспечивают обмен информацией о вредных организмах и ее хранение в сетевой среде (рис. 32). Информация о случаях обнаружения вредных организмов, которая хранится и обобщается, может предоставить ценные сведения о пространственных и временных аспектах обнаружений, а также о распространении вредных организмов. Затем эту информацию можно использовать при принятии решений о борьбе с вредными организмами, для сигнализации о вредных организмах, заявлений о свободе зоны, формирования стратегий по научным исследованиям и разработкам (НИР), а также для составления перечней вредных организмов.

7. Дистанционная диагностика вредных для растений организмов

Несмотря на наличие многочисленных мобильных приложений для обеспечения участия в социальных сетях, существует мало таких сайтов, созданных специально для биологов, и способных сохранять и систематизировать данные. Программное обеспечение, как правило, ориентировано на социальные сети или на управление информацией, а не на то и другое одновременно. Следовательно, необходимо было бы использовать несколько приложений, чтобы обеспечить групповой обмен и хранение данных. Однако программное обеспечение «Pestpoint» (<http://www.Pestpoint.org.au>) позволяет пользователям создавать частные виртуальные сети для обмена информацией, а также оно сохраняет и хранит информацию о вредных организмах. Это приложение работает как на сетевых, так и на мобильных платформах.

7.4 Выводы

Не все вредные организмы можно идентифицировать дистанционно. Некоторые случаи просто слишком слож-

ны, чтобы их можно было определить дистанционно, и они потребуют исследования образца. Безусловно, идентификацию насекомых по изображениям будет легче провести, чем идентификацию болезней растений. Тем не менее, нам, по меньшей мере, следует попытаться решать каждую проблему, связанную с вредными организмами, этим способом, если это означает, что борьбу с некоторыми из них можно осуществить быстрее. Создание системы дистанционной диагностики, включающей в себя сети и сохранение данных, дает всей системе здоровья растений множественные выгоды в части, касающейся формирования знаний посредством записи и хранения информации о вредных организмах в пространстве и времени, повышая функциональные возможности по мере того, как менее опытные люди через сети учатся посредством взаимодействия с более опытными людьми, и формируется лучшее понимание вредных организмов благодаря наблюдению за их распространением и случаями их обнаружений.



Рисунок 32. Дистанционная диагностика в поле, при которой фото- или видеоизображения вредных организмов записываются на мобильном устройстве и через интернет предоставляются группе людей, которые, вероятно, смогут предложить идентификацию, рекомендацию по борьбе или и то, и другое

8. Референтные коллекции

Введение

Референтная коллекция, используемая в фитосанитарных целях, может состоять из следующих типов образцов:

- грибов;
- членистоногих;
- брюхоногих;
- нематод;
- инвазивных растений;
- паразитических растений;
- частей растений, пораженных патогенами и вредными организмами.

Референтная коллекция необходима для реализации фитосанитарных целей, так как она:

- является основой для принятия решений, связанных с вопросами карантина и ответными мерами;
- позволяет проверять информацию о патогенах и вредителях из какой-либо страны для разрешения торговых споров;
- позволяет повторно изучить информацию о патогенах и вредителях, так как методы диагностики постоянно совершенствуются, а таксономия организмов меняется; в процессе таксономического пересмотра положение одного организма может быть пересмотрено и разделено на несколько различных видов или объединено с другим видом.

Хорошая референтная коллекция должна:

- состоять из хорошо сохранных образцов с четкими диагностическими характеристиками, пригодными для проведения анализа (например, молекулярного анализа) в будущем;
- храниться в условиях, обеспечивающих предотвращение заражения вредными организмами и повреждения от влаги;

- иметь этикетки, на которых дана информация о коллекции;
- должна сопровождаться базой данных, позволяющей быстро проводить поиск информации.

8.1 Общие требования

8.1.1 Здание

Конструктивные требования к зданию для содержания референтной коллекции:

- наличие специально отведенного помещения с минимальной вибрацией: могут быть рассмотрены сейсмостойкие здания, расположенные вдали от оживленных улиц и недоступные для посетителей без сопровождения;
- в помещении должно быть достаточно места для хранения референтных образцов и рабочая зона для куратора;
- цельный пол и стены без щелей в местах соединений во избежание заражения вредными организмами;
- большие рабочие столы для обработки образцов, исследований под микроскопом и поддержания культур;
- система хранения в виде коробок, ящиков, шкафов, боксов или стеллажей (обратите внимание: некоторые передвижные системы хранения документов являются более дорогими, но могут сэкономить много места);
- удобно расположенные телефон и точки доступа к сети;
- отсутствие водопроводного крана в месте хранения коллекции во избежание повреждения от влаги.

Работа с живыми образцами не должна проводиться в том же помещении, что и работа со референтными коллекциями для минимизации отрицательного воздействия на коллекцию и во избежание заражения такими вредителями, как клещи, книгоеды и жуки.

8. Референтные коллекции

8.1.2 Контролируемые условия окружающей среды

Референтные образцы легко повреждаются и уязвимы к вредителям, плесени и грибам. Следующие пункты помогут предотвратить повреждение коллекции:

- Кондиционеры и влагопоглотители имеют важное значение в регионах с теплым и влажным климатом. Затраты на эксплуатацию этих устройств могут быть значительными; таким образом, рекомендуется включать эти затраты в финансовый план.
- Рекомендуется поддерживать температуру на уровне 18-19°C и относительную влажность воздуха ниже 50% для предотвращения повреждения от влаги, роста грибов и размножения книгоедов и жуков, которые могут повредить образцы.
- В темноте образцы хранятся дольше. В помещении не должно быть никаких окон или световых люков; когда помещение не используется, свет должен быть выключен.
- Для борьбы с вредными организмами рекомендуется использовать герметичные контейнеры для образцов, средства отпугивания вредных организмов (например, камфорные бруски, липкие нафталиновые ловушки, запутывающие ловушки-барьеры), при необходимости проводить фумигацию или применять инсектициды, герметизировать щели в местах соединения деталей; замораживать все поступающие или возвращающиеся сухие гербарные образцы при -20°C в течение 48 часов и на регулярной основе (каждые 1-2 года).
- Референтная коллекция должна быть отделена от рабочей зоны, которая используется для работы с живым растительным материалом.

8.1.3 Меры защиты и обеспечения безопасности

Референтные коллекции содержат ценные ресурсы, которые являются важными для принятия решений, связанных с вопросами карантина и ответными мерами, и могут содействовать развитию торговли. Поэтому коллекции должны храниться на приемлемом уровне безопасности. Более того, для защиты персонала, работающего в коллекциях, должны быть приняты меры безопасности.

К некоторым требуемым мерам защиты и обеспечения безопасности относятся следующие:

- специальное помещение, отделяющее коллекции от офисных помещений и других зон;
- запираемое помещение или помещение в запираемом здании, доступ в которое ограничен;
- система сигнализации для защиты в нерабочие часы;
- телефон для экстренных вызовов;
- пожарная безопасность:
 - противопожарное одеяло, огнетушитель, инертный газ;
 - не пользуйтесь источником открытого огня;
 - не оставляйте электроприборы, особенно обогреватели, без присмотра;
 - поддерживайте электрическую проводку в исправном состоянии;
- принятие во внимание стихийных бедствий, например, землетрясений, цунами, наводнений, ураганов и лесных пожаров;
- не употреблять пищу в помещении хранения референтной коллекции;
- не принимать посетителей без сопровождения;
- носить обувь с закрытыми носками;
- не носить длинные волосы распущенными;
- доступ должен иметь только обученный персонал;

- работа с химическими веществами и оборудованием должна проводиться квалифицированным персоналом.

Некоторые химические вещества и реактивы, используемые при подготовке референтных образцов, – ядовиты. Должны быть рассмотрены следующие меры.

- Инструкции по безопасному обращению с материалами (ИБОМ) и любая товаросопроводительная литература должны быть изучены для того, чтобы иметь четкое представление об опасности, связанной с химическими веществами, реактивами или содержащим наборов (например, требования к хранению и обращению). Бумажные копии ИБОМ для каждого химического вещества, хранящегося в лаборатории, должны быть легкодоступны.
- Количество опасных веществ в лаборатории должно быть сведено к минимуму в соответствии с потребностями и сроком годности. При хранении этих веществ на видном месте должны быть размещены соответствующие информационные указатели.
- Персонал должен удостовериться в безопасности рабочей зоны путем проверки наличия огнетушителей, аптечки первой помощи и любого другого оборудования для обеспечения безопасности, которое может понадобиться.
- Соответствующие средства индивидуальной защиты и оборудование должны использоваться в соответствии с рекомендациями в ИБОМ, например, лабораторный халат, перчатки, защитные очки, предохранительные очки, лицевые щитки, маски.
- Законодательные требования страны по работе с химическими веществами и реактивами должны быть изучены.
- Химические вещества и реактивы следует утилизировать надлежащим образом; проконсультируйтесь с местными властями.

8.1.4 Требования по изоляции

Некоторые страны требуют хранить в помещении для изоляции гербарные образцы выявленного материала, представляющего высокую степень биологической опасности. Проконсультируйтесь с местными властями для уточнения того, какая степень изоляции требуется.

Растительный материал, зараженный экзотическими вредителями или болезнями и какие-либо засоренные расходные материалы (например, ветошь, полиэтиленовые пакеты, перчатки) должны утилизироваться надлежащим образом. Проконсультируйтесь с местными властями.

8.1.5 Система хранения

Образцы должны храниться в алфавитном порядке по названию патогена или растения-хозяина или по инвентарному номеру.

Для обеспечения эффективного ввода новых данных и информации, а также для извлечения данных с возможностью поиска и фильтрации результатов должна быть создана база данных. База данных может быть как в виде простой электронной таблицы в формате Excel, так и в виде программы, специально разработанной для гербариев. Не рекомендуется ограничиваться только ведением регистрационного журнала, так как журнал сложно обновлять, и поиск данных в нем проводить непросто.

8.1.6 Повседневный уход

Важно иметь специально назначенный персонал, занимающийся уходом за референтными коллекциями и осуществляющий контроль за их содержанием.

Уход за референтной коллекцией должен проводиться на повседневной основе путем:

8. Референтные коллекции

- регулярного контроля температуры, влажности, емкостей влагопоглотителей, безопасности и пожарной сигнализации, мер по борьбе с вредными организмами, которые могут применяться;
- постоянной проверки того, что образцы длительного хранения не высушаются, а этикетки не выцветают;
- обновления базы данных с учетом изменений названий и внесения новой информации.

Если запечатанный контейнер с высушенным гербарным образцом был открыт, необходимо повторить процесс сушки перед запечатыванием контейнера и возвращением образца в коллекцию.

Если сохраненные зараженные растительные ткани были отданы или обменены, необходимо заново ввести инокулят в травянистые или древесные растения (во всех возможных случаях) и сохранить определенную часть новой зараженной растительной ткани для пополнения запасов.

Некоторые патогены с течением времени могут потерять свои инфицирующие свойства; может возникнуть необходимость проведения анализа инокулированных травянистых или древесных растений серологическими или молекулярными методами для проверки успешности переноса заражения (например, в случае скрытого переноса).

8.1.7 Улучшение

Ценность референтных коллекций может быть повышена путем:

- обмена образцами с другими референтными коллекциями для получения референтных образцов;
- приглашения экспертов для повторного изучения образцов;
- получения ДНК-штрихкодов из образцов;

- хранения выделенных нуклеиновых кислот в условиях глубокой заморозки (рекомендуется при -80°C);
- создания виртуальной референтной коллекции.

Примечание: цифровые данные о коллекции, данные о последовательностях ДНК и изображения образцов в системе управления данными обеспечивают эффективный поиск информации, анализ и отчетность, что, в свою очередь, может способствовать оперативному принятию решений по обеспечению биологической безопасности.

8.2 Энтомологическая референтная коллекция

8.2.1 Референтные образцы (контрольные и физические)

Энтомологические референтные коллекции включают в себя всех наземных беспозвоночных, а также нематод, червей, улиток и слизней.

8.2.1.1 Критерии выбора образцов для сохранения (что сохранять)

Ограниченность пространства – основной ограничивающий фактор, определяющий, какое количество образцов возможно хранить; не все образцы могут быть сохранены для включения в коллекцию. В качестве руководства – рассчитывайте место для хранения примерно десяти образцов одного вида, хотя это количество может изменяться в зависимости от размера образца и его значимости. Критерии сохранения энтомологического образца:

- местная фауна, аборигенные или эндемичные виды, распространенные вредные организмы, поражающие местные сельскохозяйственные культуры, выявленные вредные организмы и недавно акклиматизировавшиеся виды;
- образцы самцов и самок каждого вида, если это возможно;

- распространение: образцы каждого вида из разных стран;
- местонахождение: образцы каждого вида из разных местностей или районов в пределах страны происхождения;
- вариации: внутривидовые вариации по цвету, рисунку, отличительным признакам, размеру и т.д.
- новый вид для коллекции;
- образец находится в лучшем состоянии, чем образцы, которые уже включены в коллекцию;
- собран с нового хозяина (новый хозяин – это хозяин, из которого или на котором было выращено насекомое, а не просто тот, на котором оно находилось);
- сохраняется для проведения обследований.

8.2.2 Оборудование и расходные материалы

8.2.2.1 Оборудование для обработки образца

- микроскоп;
- сушильная камера;
- нагревательная плитка или микроволновая печь;
- сушильная камера для ярлыков;
- морозильная камера;
- холодильник;
- увеличительное стекло или увеличительная лампа.

8.2.2.2 Расходные материалы и другие предметы

- пинцеты, тонкие и ультратонкие, из нержавеющей стали;
- булавки для закрепления насекомых (только из нержавеющей стали) от поставщика энтомологического оборудования (размеры 0, 3, 5);
- минуции для двойного закрепления;
- блок для накалывания (рис. 33);

- изогнутые минуции и минуции для подъема клещей и мелких насекомых (рис. 33);
- покровные стекла (круглое, диаметром 16 мм; круглое, 13 мм);
- предметные стекла для микроскопа (25 мм × 75 мм × 1 мм);
- плашки для накалывания насекомых (рис. 33);
- расправилки (различных размеров);
- доски из пенополиуретана с закрытыми порами;
- пробирки для гениталий (микропробирки);
- этикеточная бумага, ручки или карандаши (для нанесения надписей, не смываемых этиловым спиртом);
- этикетки для образцов;
- клей для закрепления насекомых (кардный);
- ножницы;
- пробирки из натриевого стекла различных размеров (Рис. 33):
 - например, 50 × 12 мм,
 - 75 × 25 мм;



Рисунок 33. Малое оборудование для стандартного закрепления насекомых

8. Референтные коллекции

- планшеты для окрашивания (часовые стекла) со стеклянными крышками (рис. 33).

8.2.2.3 Химические вещества и растворы

Список лабораторных химических веществ, необходимых для приготовления питательных сред и подготовки образцов:

- канадский бальзам (так как он разбавляется ксиленом, эупарал может быть предпочтительнее);
- камфора;
- хлоральгидрат;
- гвоздичное масло;
- дистиллированная вода
- энтомологический кардный клей;
- этиловый спирт (96%-ный) также разбавляется до 70% (*примечание:* так как чистый этиловый спирт часто трудно получить, некоторые держатели коллекций используют изопропанол (изопропиловый спирт));
- этилацетат;
- эупарал;
- фуксинсернистая кислота в порошке;
- безводная уксусная кислота;
- глицерол, глицерин;
- аравийская камедь;
- препарат «Histiclear» (оранжевое вещество для разжижения эупарала);
- бытовой отбеливатель (5%-ный раствор гипохлорита натрия);
- хлористоводородная кислота (10%-ная);
- молочная кислота (85%-ная);
- фенол;
- КОН (10%-ный).

Некоторые химические вещества, используемые при подготовке насекомых для идентификации – чрезвычайно токсичны или легко воспламеняются. Необходимо соблюдать максимальную осторожность при их использовании – использовать, предпочтительно, в вы-

тяжном шкафу, в месте с нижней тягой или, как минимум, в очень хорошо проветриваемом помещении. Важно также носить средства индивидуальной защиты, такие как перчатки и лабораторный халат. Некоторые химические вещества, согласно технике безопасности, не должны храниться вместе, и по технике безопасности требуется наличие специальных боксов (см. табл. 2).

8.2.2.4 Питательные среды

В этом разделе приводится список сред и рецепты их приготовления для разных отрядов насекомых.

Раствор Эссига/Уилки

- 85%-ная молочная кислота – 100 мл;
- Фенол⁵ (насыщенный водный раствор) – 10 мл;
- Безводная уксусная кислота – 20 мл;
- Дистиллированная вода – 5 мл.

Среда Хойера для закрепления образцов

- Дистиллированная вода – 50 мл;
- Хлоральгидрат – 200 г;
- Аравийская камедь (бесцветные кристаллы) – 30 г;
- Глицерин – 20 г.

Растворите аравийскую камедь в дистиллированной воде при комнатной температуре.

Добавьте хлоральгидрат и оставьте на день или два, пока оба вещества не растворятся.

Добавьте глицерин и пропустите через стеклянную вату, чтобы отфильтровать.

Красящий раствор

- Фуксинсернистая кислота – 0,5 г 10%;
- Хлористоводородная кислота – 25 мл;
- Дистиллированная вода – 300 мл.

¹ Предостережение: Летучие вещества, выделяемые фенолом, являются канцерогенными, поэтому работа с ним должна проводиться в вытяжном шкафу.

Таблица 2. Химические вещества и их категории опасности

Химическое вещество	Категория опасности
Канадский бальзам	Огнеопасен, вызывает сильное раздражение глаз, кожи, токсичен для водной флоры и фауны
Хлоральгидрат	Вызывает раздражение глаз и кожи
Гвоздичное масло	Токсично, вызывает раздражение кожи
Этилацетат	Легко воспламеняется, вызывает серьезное раздражение глаз, повреждение органов через контакт с кожей
Эупарал	Вызывает раздражение кожи, может вызвать симптомы аллергии или астмы и затруднение дыхания, может вызвать аллергическую реакцию кожи, может вызвать раздражение дыхательных путей, вызывает серьезное повреждение глаз
Фукусинсернистая кислота в порошке	Категория опасности: оценивается как раздражитель кожи и глаз. Не вдыхать и не глотать
Безводная уксусная кислота	Воспламеняющаяся жидкость, токсична, имеет общую токсичность, вызывает коррозию металла, повреждение кожи, глаз, наносит вред водной флоре и фауне, позвоночным
Глицерол	Может вызвать раздражение кожи, глаз и раздражение дыхательных путей. Может повлиять на почки
Аравийская камедь	Респираторный и контактный аллерген
Бытовой отбеливатель (5%-ный раствор гипохлорита натрия)	Смотрите инструкцию производителя
Хлористоводородная кислота	Смертельно опасна при проглатывании, вызывает коррозию металлов, тяжелые ожоги кожи и глаз, экзотоксична для водной флоры и фауны и позвоночных
Фенол	Высокотоксичен, вызывает коррозию металлов, тяжелые ожоги кожи и глаз, экзотоксичен для водной флоры и фауны, и позвоночных
Молочная кислота	Токсична, вызывает повреждения глаз и кожи, экотоксична для позвоночных
Гидроксид калия (KOH)	Высокотоксичен, вызывает коррозию металлов, повреждение кожи, глаз, наносит вред водной флоре и фауне, позвоночным

8.2.3 Обработка образцов для сохранения

В этом разделе приводится описание лучших методов хранения для каждого типа организма (например, этиловый спирт, подготовка микропрепарата сухим методом или сочетанием методов). Для получения более подробной информации о сохранении насекомых смотрите ОСНПИ. Простые методы сохранения насекомых и родственных видов. Объединение Содружества по научным и прикладным исследованиям. Документ доступен по ссылке: <http://>

www.ento.csiro.au/education/preserving.html (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 года).

8.2.3.1 Умерщвление

После отлова и расположения образца он может быть умерщвлен следующими методами.

Мякотелые и незрелые особи, которые теряют цвет, должны быть умерщвлены в только что вскипевшей воде и оставлены на 1-5 минут перед тем, как поместить их в 70-80%-ный этиловый

8. Референтные коллекции

спирт. Это помогает предотвратить их потемнение; личинок жесткокрылых, чешуекрылых и перепончатокрылых закрепляют таким образом. Умерщвление более крупных насекомых занимает больше времени, и может потребоваться несколько раз сменить кипящую воду.

Склеротизированные (с жестким тельцем) насекомые могут быть умерщвлены непосредственно в 70-90% этиловом спирте. Чешуйчатые насекомые, такие как чешуекрылые (*Lepidoptera*), волосистокрылые (*Trichoptera*) и настоящие комары (*Culicidae*) не должны умерщвляться с использованием жидких агентов, необходимо использовать замораживание или сухие морилки.

Паразитических перепончатокрылых лучше всего умерщвлять и сохранять в 96%-ном этиловом спирте. Такая высокая концентрация не допускает закручивания и складывания перепончатых крыльев, матирования волосков, сморщивания мягких частей тела.

Большинство образцов умерщвляются посредством их помещения в морозильную камеру на 30 минут; умерщвление более крупных насекомых занимает больше времени. Этот метод используется для лишения активных насекомых подвижности перед умерщвлением другими методами.

Маленькие насекомые для фиксации на предметном стекле умерщвляются непосредственно в жидкостях для очищения и красящих жидкостях.

Образцы насекомых также умерщвляют парами этилацетата (легковоспламеняющегося и раздражающего химического вещества) в морилке.

Улиток и слизней умерщвляют погружением в воду с уменьшенным содержанием кислорода (кипяченную) в морилке с плотно закрывающейся крыш-

кой, удаляют как можно больше воздуха и оставляют на 24 часа. Используйте наркотизированную воду (пропитанную табакотом) и не кипятите образец, так как это вызывает его затвердевание.

Дождевых червей (Annelida: *Oligochaeta*) можно умертвить в 70%-ном этиловом спирте.

8.2.3.2 Закрепление сухого образца

Следующие справочные материалы могут быть полезны:

Уокер, А.К., Кросби, Т.К., 1988 г. «Подготовка препаратов насекомых и их курирование», новое пересмотренное издание. Новая Зеландия – Информационная серия УНПИ (Управление научных и промышленных исследований) 163. Веллингтон, Издательство научной информации УНПИ. С. 92 / **Walker, A.K. & Crosby, T.K.** 1988. The preparation and curation of insects, new revised edn. New Zealand DSIR Information Series 163. Wellington, DSIR Science Information Publishing Centre. 92 pp. Доступно по ссылке: <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/nzac/specimen-preparation-and-curation> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 года).

Шауф, М.Е., под. ред., 2001 г. «Сбор и сохранение насекомых и клещей: методы и инструменты». Вашингтон, округ Колумбия, Лаборатория систематической энтомологии / **Schauff, M.E.**, ed . 2001. Collecting and preserving insects and mites: techniques and tools. Washington, DC, Systematic Entomology Laboratory. Доступно по ссылке: <http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=10141> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Хантер, Г. 2006 г. «Курирование образцов насекомых». Серия «Conserve O Gram». 11/8. Вашингтон, округ Колумбия, Управление национальных парков / **Hunter, G.** 2006. Curation of

insect specimens. Conserve O Gram No. 11/8. Washington, DC, National Park Service. Доступно по ссылке: <http://www.nps.gov/museum/publications/conserveogram/11-08.pdf> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

8.2.3.3 Накальвание

- Пчел, ос, мух, крылатых термитов, молей и бабочек следует накалывать через грудную клетку. Пчел, ос и мух следует накалывать чуть правее от центра, чтобы избежать повреждения хрупких диагностических признаков.
- Полужесткокрылых (*Hemiptera*) следует накалывать через щиток.
- Кузнечиков (*Orthoptera*) следует накалывать через переднеспинку.
- Жуков (*Coleoptera*) следует накалывать через правое надкрылье (рис. 34).

Булавки должны быть из нержавеющей стали, в противном случае они будут подвержены коррозии и разрушат образец. Тела насекомых следует прокалывать булавками соответствующего размера. Булавки номер 3, пригодные для прямого закрепления крупных насекомых, следует использовать каждый раз, когда это возможно. Булавки номер 5 используются для очень больших насекомых и номер 0 – для узкотелых насекомых. Все образцы меньшего размера следует накалывать на минуции (тонкие булавки) (смотрите раздел 8.2.3.4 «Двойное закрепление»).

Примечание: Булавки номер 00 и 000 слишком пружинисты, и существует риск повреждения образца при работе с ним.

8.2.3.4 Двойное закрепление

Маленькие насекомые, накалываемые на минуции, требуют двойного закрепления на специальные 3-миллиметровые квадратики при помощи полосок из пористого материала («Nu Poly») длиной 10-12 мм или пластозотовых полосок при помощи булавки номер 3 (рис. 35).



Рисунок 34. Верхний и боковой вид накалотого жука

8.2.3.5 Накальвание на картон

Всех небольших (<5 мм) насекомых с твердым телом следует приклеивать на треугольный кусочек картона (рис. 36).

Жуки (*Coleoptera*) должны быть закреплены так, чтобы брюшная сторона тела была видна.

Мухи, осы и другие насекомые, у которых крылья вытянуты над телом, должны быть закреплены на правом боку, желательнее с крыльями, расположенными вертикально.

Образцы должны быть расположены головой на правой стороне картона. Следует использовать только минимальное количество клея.

Кусочки картона накалываются на булавку номер 3.

8.2.3.6 Картонные прямоугольники

Очень маленьких насекомых, особенно удлиненных мягкотелых жуков, мелких перепончатокрылых (*Hymenoptera*)

8. Референтные коллекции

и жесткокрылых (*Coleoptera*), можно приклеить к прямоугольным карточкам (рис. 37). Этот метод лучше всего использовать, когда имеется более одного образца из той же серии, так как каждый образец может быть приклеен под другим углом, чтобы облегчить последующую идентификацию.

Ложные коконы и коконы от выращиваемых особей также можно закрепить таким образом. Карточки накалываются на булавку номер 3.

Примечание: Закрепление на картонный прямоугольник не является предпочтительным методом.

8.2.3.7 Расправление и расположение

Бабочек и молей следует расправлять таким образом, чтобы был виден цветовой рисунок (рис. 38). Задние края передних крыльев укладываются под прямым углом к телу. Задние крылья должны быть сильно вытянуты вперед, чтобы между передними и задними крыльями не было большого расстояния. На задних крыльях не должно быть складок. Крылья полностью покрываются невоощенной бумагой, легкой бумагой для авиапочты или калькой.

В режиме онлайн доступно пособие: Научное обучение. 2009 г. «Закрепление молей». / Science Learning. 2009. Mounting moths. Документ доступен по ссылке: <http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Hidden-Taonga/Sci-Media/Video/Mounting-moths> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

8.2.3.8 Сохранение в этиловом спирте

Следующие мягкотелые наземные и водные беспозвоночные после умерщвления или фиксирования должны храниться в 70-75%-ном этиловом спирте:

- личиночные формы большинства отрядов насекомых;
- термиты (*Isoptera*) – все стадии;

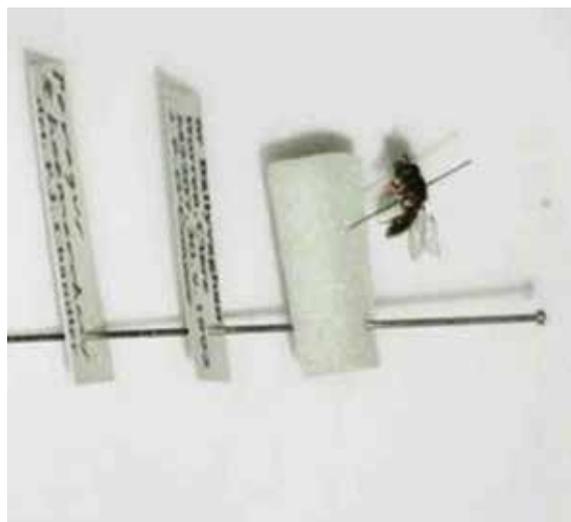


Рисунок 35. Вид сбоку дважды закрепленного насекомого

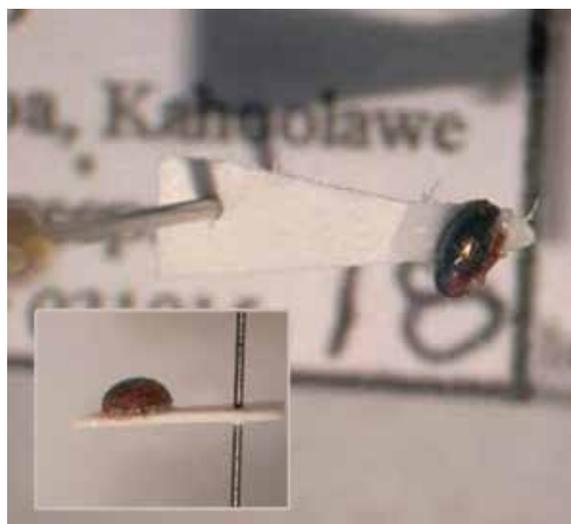


Рисунок 36. Вид насекомого, закрепленного на картон, сверху и сбоку



Рисунок 37. Насекомое на картонном треугольнике

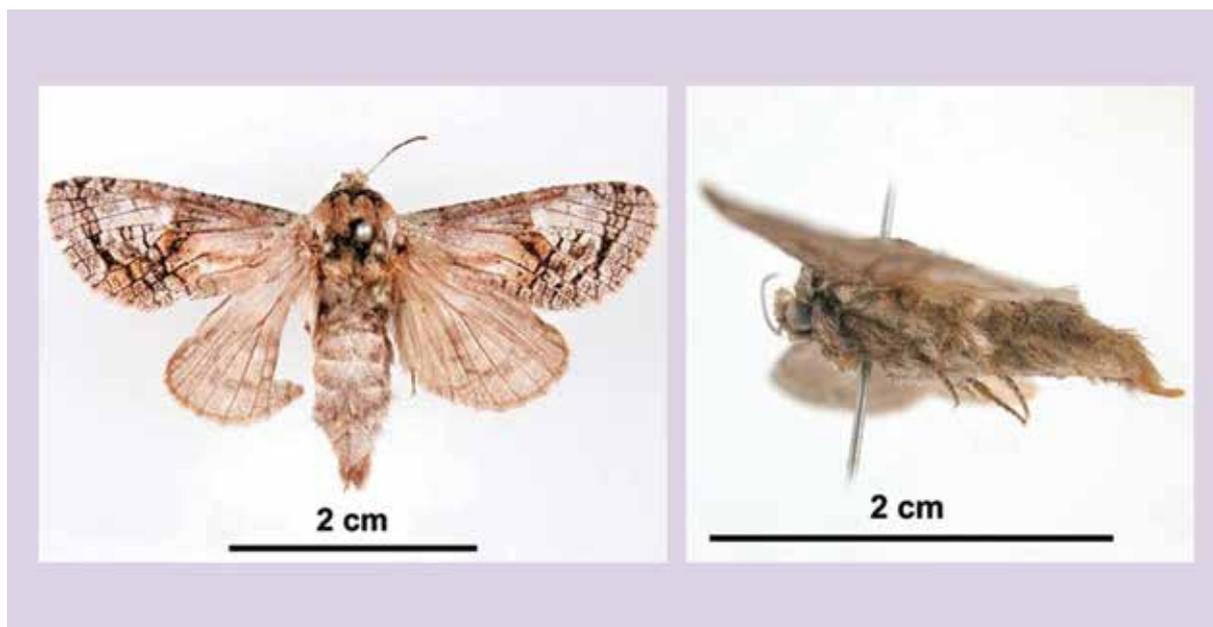


Рисунок 38. Вид сверху и сбоку моли с расправленными крыльями

- чешуйница (*Thysanura*);
- улитки и слизни (за исключением пустых раковин улиток);
- черви, сороконожки, многоножки, бокоплавы.

Образцы для молекулярной работы должны незамедлительно помещаться в 96%-ный этиловый спирт, который необходимо заменить через несколько дней для высушивания образцов для хранения.

8.2.3. Фиксация на предметном стекле

Насекомых нижеприведенных групп следует закреплять на предметном стекле. Методы подготовки фиксации на предметном стекле различаются для различных групп. Также смотрите методы фиксации на предметном стекле, описанные в работе **Дули Дж.**, 2002 г. «Подготовка препаратов образцов». Сан-Франциско, Калифорния. Защита и карантин растений / **Dooley, J.** 2002. Specimen preparation. San Francisco, CA, PPQ. Документ доступен по ссылке: http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/Dones_Lourdes/other_files/slide_prep_training.pdf (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

- Клещи (*Acari*) (могут быть закреплены напрямую в жидкости Хойера и осветлены на нагревательной плитке);
- Нематоды;
- Трипсы (*Thysanoptera*);
- Мучнистые червецы (*Pseudococcidae*);
- Щитовки (*Coccoidea*);
- Тли (*Aphidoidea*);
- Другие порядки, шкурки личинок, если требуется;
- Белокрылки (*Homoptera: Aleyrodidae*);
- Препарированные части насекомых: для этого метода требуются специальные микроинструменты (рис. 39). Эти микроинструменты легко изготовить из микробулавок путем их нагрева над пламенем и осторожного сгибания в желаемую форму при помощи очень тонкого пинцета, а затем помещения на небольшую бамбуковую палочку или деревянную зубочистку и приклеивания к ним.

Примечание: закрепление на предметных стеклах – превосходный способ сохранения и изучения небольших мягкотелых насекомых и гениталий.

- Внимательно следите! Исследуйте этикетки под микроскопом.
- Бумага должна быть гладкой и блестящей, а не зернистой или пятнистой.

Этикетки с информацией о месте происхождения

Этикетки с информацией о месте происхождения для всех образцов должны содержать уникальный регистрационный или учетный номер в целях отслеживаемости, данные о месте (или стране происхождения), хозяине, дате сбора:

- регистрационный/учетный номер;
- страна происхождения;
- хозяин и место обнаружения (на второй этикетке, если необходимо);
- ФИО лица, осуществившего сбор;
- дата.

Идентификационные (Опред.) этикетки

Вторая определительная или ИД этикетка используется для указания названия вида, лица, проводшего идентификацию, и года идентификации:

- Семейство (или подсемейство, если известно) заглавными буквами;
- Род и вид: курсивом (если создано на компьютере); название рода начинается с заглавной буквы, вида – со строчной;
- Лицо, проводшее идентификацию: инициалы и фамилия, год.
- Если название длинное, год может быть сокращен до последних двух цифр после апострофа ('13).
- Опреd.: М.Дж. Паркер, 2013.
- Опреd.: М.Дж. Паркер, 01 янв. 2013.
- Опреd.: С.П. Кортешевский, '13.

Этикетки последующей повторной идентификации

Эти этикетки должны быть нанесены на образец без удаления этикетки первоначальной идентификации.

Примечание: После повторной идентификации, в систематизированные документы, относящиеся к образцу, возможно, придется внести изменения.

Размещение этикеток на наколотые образцы

Этикетка с информацией о месте сбора должна быть помещена на расстоянии примерно 5 мм от наколотого образца. Примеры этикеток приведены ниже.

Для накальваемых образцов (рис. 40А) место прокалывания должно быть примерно в середине этикетки, не затрагивая надпись. Этот метод обеспечивает максимальную защиту хрупких частей тела образца.

В случае с образцами, наколотыми непосредственно на булавку, этикетка располагается по центру под образцом; горизонтальная ось этикетки должна располагаться в том же направлении, что и горизонтальная ось образца.

В отношении образцов, прикрепленных к картону или при помощи двойного закрепления (рис. 40Б), вонзите булавку в центр правой стороны этикетки так, чтобы длинная ось этикетки была расположена в том же направлении, что и картонная карточка. Этикетка протыкается булавкой с правой стороны от текста. Таким образом меньше повреждаются надпись и образец.

Оставьте достаточно свободного места между этикетками, чтобы данные можно было прочесть без наклона этикетки. Наклонение этикеток может ослабить их крепление, они могут проворачиваться на булавке, что создает риск повреждения соседних образцов.

Когда крепление этикеток становится слабым, снимите этикетку и закройте отверстие ногтем большого пальца, а затем наколите ее вновь, проделав новое отверстие.

8. Референтные коллекции

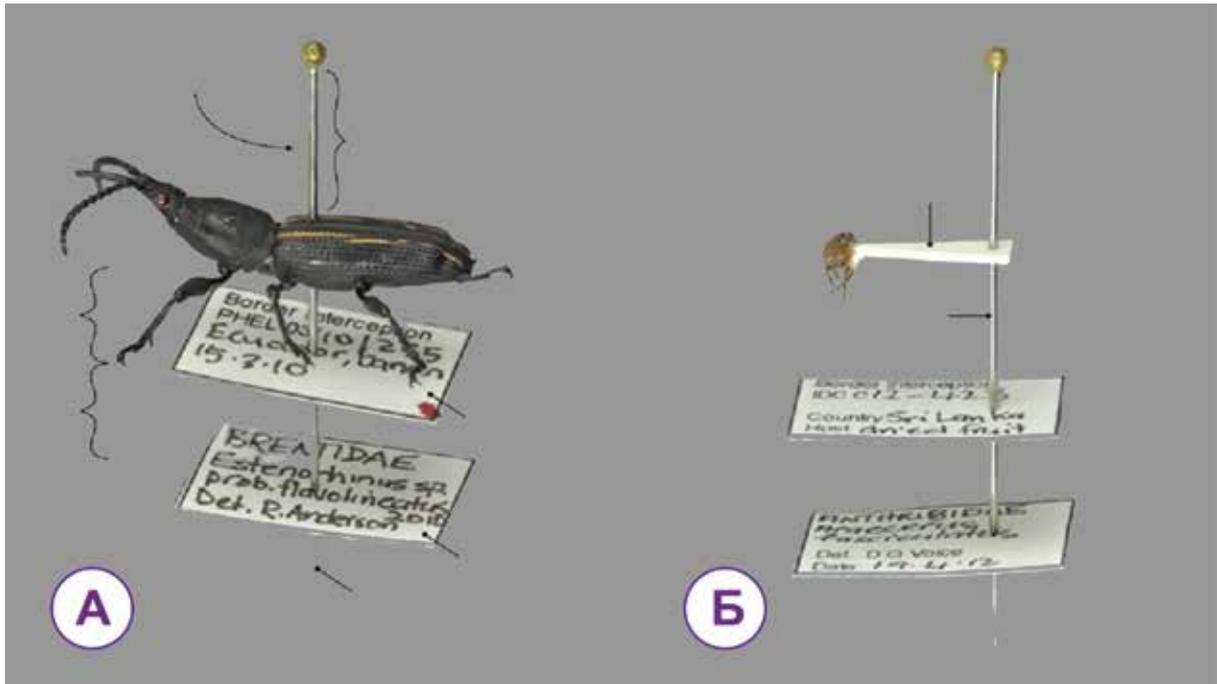


Рисунок 40. А – Образец, напрямую наколотый на булавку, демонстрирующий расположение этикеток; Б – Образец, наколотый на картон, демонстрирующий расположение этикеток и место накалывания

Расположение этикеток на образцах, хранящихся в пробирках

Это относится к этикеткам для образцов, хранящихся в стеклянных или пластиковых пробирках, сухими или в этиловом спирте. Эти этикетки больше, чем этикетки для наколотых образцов (до 15 мм × 40 мм), данные о месте происхождения и идентификации находятся на одной этикетке, расположенной вдоль длины пробирки. Используйте только одну этикетку, которая должна помещаться внутрь пробирки (рис. 41).

Данные о месте происхождения располагаются слева, данные об идентификации – справа.

Накрутите этикетку на карандаш надписью наружу для того, чтобы она была слегка скрученной, прежде чем поместить ее в пробирку. Это позволяет этикетке оставаться прижатой к стеклу, и плавающие образцы не смогут заслонить надпись.

Если необходимо вставить вторую этикетку: чтобы обеспечить читаемость

обеих этикеток, вставьте простой лист бумаги шириной с пробирку, чтобы разделить их так, чтобы надписи на обеих этикетках смотрели наружу.

Если образцы хранятся в 96%-ном этиловом спирте для целей молекулярной диагностики, это должно быть указано на этикетке.

Расположение этикеток на образцах на предметных стеклах

Этикетка с информацией о месте происхождения помещается на правой стороне, если голова образца смотрит вниз.

Этикетка с информацией об идентификации помещается на левой стороне предметного стекла (рис. 42).

8.2.5 Размягчение сухих образцов

Размягчение не требуется для только что умерщвленных образцов. Некоторые образцы, однако, погибают при транспортировке в лабораторию и становятся сухими и ломкими; они должны быть размягчены, чтобы предотвратить повреждение частей тела во время накалывания.

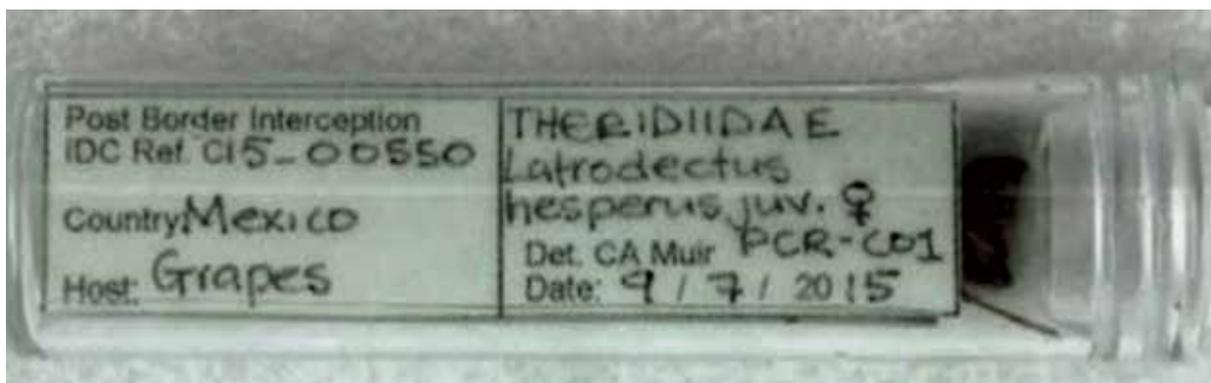


Рисунок 41. Пример этикетки для образца, хранящегося в пробирке

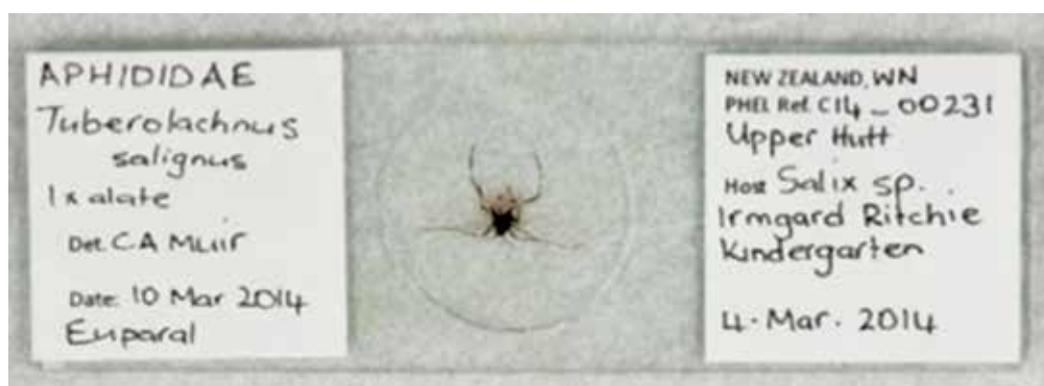


Рисунок 42. Нанесение этикетки на образец, зафиксированный на предметном стекле

Простая процедура размягчения:

- Налейте на дно камеры для размягчения (воздухонепроницаемый контейнер или сушилка) теплую воду примерно до 1 см, поместите решетку над водой и накройте ее фильтровальной бумагой или тканью.
- Добавьте несколько капель гвоздичного масла или дезинфицирующего средства для предотвращения развития плесени.
- Поместите образцы на фильтровальную бумагу в неглубокую посуду, такую как чашка Петри или пластиковая крышка.
- Закройте камеру для размягчения и оставьте на ночь. Длительность размягчения отличается для разных насекомых и размеров.

Кроме того, для получения быстрых результатов поместите камеру в печь при температуре 40°C. В течение нескольких

часов образцы должны достаточно размягчиться для того, чтобы с ними можно было работать.

Убедитесь в том, что на этикетки в камере размягчения не были нанесены водорастворимые чернила.

8.2.6 Высушивание образцов

Образцы для хранения в высушенном виде, включая раковины улиток, должны высушиваться в подходящих контейнерах в печи при 40°C или на воздухе при комнатной температуре в безопасном контейнере до их размещения в коллекцию на хранение. Высушенные образцы из коллекции не следует оставлять вне лаборатории на ночь, если только они не помещены в закрытые контейнеры.

Температура в сушильных шкафах в энтомологических лабораториях поддерживается на оптимальном уровне

8. Референтные коллекции

в 40°C для сушки энтомологических образцов. Как правило, образцы могут оставаться в сушильной печи до тех пор, пока они не будут перемещены в место постоянного хранения.

Наколотые образцы могут быть помещены в печь для сушки в лотках с отсеками или в коробках для хранения. Сушка в зависимости от размера и цвета образца может длиться от нескольких часов или ночи (например, небольшие двукрылые (*Diptera*)) до одной недели (например, большие черные жесткокрылые (*Coleoptera*)).

Материал на предметном стекле должен сушиться в энтомологической печи в течение не менее четырех недель. Полное высыхание различных сред и различных объемов сред может занять более продолжительное время. Для высыхания образцы на предметных стеклах помещают в печь на алюминиевых подносах для предметных стекол.

8.2.7 Препарирование

Препарирование – задача, требующая наличия навыков и практики. Любая часть тела насекомого может быть препарирована и закреплена на предметном стекле в среде Хойера для исследования. Однако после того, как трехмерная выступающая часть помещается под покровное стекло, может произойти ее повреждение, поэтому помещение образца в ванночку, предназначенную для использования при окрашивании, с песком и 95%-ным этиловым спиртом позволяет исследовать образец под разными углами. Выступающие части должны храниться в 80%-ном этиловом спирте с добавлением 5%-ного глицерина. Части очень небольшого размера могут быть зафиксированы на предмете стекле с лункой.

8.2.7.1 Гениталии

- Поместите брюшко и надкрылья в 70%-ный этиловый спирт; если на-

секомое было умерщвлено недавно, нет необходимости помещать их в этиловый спирт, нагревайте в 10% КОН до одного часа.

- Осторожно поместите гениталии и последний измененный сегмент брюшка в дистиллированную воду.
- Переместите в 90%-ный этиловый спирт либо после проведения наблюдений зафиксируйте в среде Хойера сразу после того, как достанете из дистиллированной воды. Учтите, что может произойти повреждение.

Можно также временно закрепить на предметном стекле в глицерине для исследования; или исследовать в воде в часовом стекле.

Гениталии и размягченные части лучше всего сохраняются в глицерине в микропробирке, наколотой вместе с образцом (на одной и той же булавке).

Справочные материалы по препарированию и подготовке гениталий чешуекрылых:

Хайден Дж.Е., Ли С., Пассоа С.К., Янг Дж., Лэндри Дж.Ф., Назари В., Малли Р., Сомма Л.А. и Алмарк К.М. 2013 г. «Цифровая идентификация микрочешуекрылых на *Solanaceae*». Форт-Коллинз, Колорадо, Министерство сельского хозяйства США – Служба инспекции здоровья животных и растений – Карантин и защита растений. Программа идентификационных технологий (ITP) / **Hayden, J.E., Lee, S., Passoa, S.C., Young, J., Landry, J.F., Nazari, V. Mally, R., Somma, L.A. & Ahlmark, K.M.** 2013. Digital identification of microlepidoptera on Solanaceae. Fort Collins, CO, USDA-APHIS-PPQ Identification Technology Program (ITP). Документ доступен по ссылке: <http://idtools.org/id/leps/micro/> (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Хоар Р. Дж. Б., 2000 г. «Новый род примитивных Nepticulidae (*Lepidoptera*) из восточной Австралии, с пересмотренной диагностикой подсемейств молей-малюток», «Зоологический жур-

нал Линнеевского общества», 128(3): 289–317. (стр. 292) / **Hoare, R.J.B.** 2000. A new genus of primitive Nepticulidae (Lepidoptera) from eastern Australia, with a revised diagnosis of nepticulid subfamilies. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 128(3): 289–317. (p. 292).

8.7.2 Личинки двукрылых (Diptera) и другие части насекомых

- Поместите личинку в воду в препаративную ванночку и разрежьте кутикулу тонкими анатомическими ножницами вдоль одной стороны, начиная вблизи переднего края, проходя ниже бокового дыхательного отверстия и почти до заднего края.
- Поместите личинку в раствор Эссига / Уикли и осторожно нагревайте в течение одного часа. Когда личинка хорошо размягчиться, удалите содержимое тела.
- Почти полностью отделите заднюю дыхальцевую зону от оставшейся части кожицы и вытяните головную и глоточную часть скелета из тела. Поместите кожу в 95%-ный этиловый спирт.
- Закрепите на предметном стекле в растворе Хойера кожей наизнанку так, чтобы головная и глоточная часть скелета с ротовыми крючками была расположена на некотором расстоянии от кожи и задняя дыхальцевая зона расположена обоими дыхальцами вверх.

В случае с некоторыми другими порядками голова образца осторожно закрепляется на предметное стекло так, чтобы можно было исследовать ротовые органы.

Другие части тела насекомого, такие как усики, ноги и щупальца, могут быть закреплены на предметное стекло непосредственно в растворе Хойера.

8.2.7.3 Набивка образцов Orthoptera, Cicadidae и Phasmatodea

Может потребоваться препарирование крупных кузнечиков, крупных полужесткокрылых (*Hemiptera*) (например, *Cicadidae*) и других прямокрылых насекомых для их постоянного хранения в высушенном виде. Используя анатомические ножницы, сделайте надрез под брюшком; кишечник с содержимым удаляется пинцетом, полость протирается ватой, смоченной в этиловом спирте, а затем чистая вата помещается внутрь полости для заполнения пространства. Разрезанные края могут быть соединены и склеены до того, как образец будет сушиться в печи.

Для сохранения брюшка привиденьевых (*Phasmatodea*) твердым до сушки в печи, возможно, потребуется через конец брюшка удалить кишечник с содержимым и поместить внутрь нейлоновые щетинки.

8.2.7.4 Процедура препарирования крыльев чешуекрылых (Lepidoptera)

- Аккуратно отрежьте крылья в месте нижнего прикрепления к образцу.
- Продезинфицируйте крылья чешуекрылых, поместив их в бытовой отбеливатель или в отбеливатель для белья (5%-ный раствор гипохлорита натрия) на 1-3 минуты. Предварительное смачивание этиловым спиртом активизирует процесс дезинфицирования. *Примечание:* за процессом дезинфицирования следует внимательно наблюдать под микроскопом, так как крылья могут повредиться, если остаются в химическом веществе слишком долго.
- Как только жилки станут видимыми, достаньте крылья из отбеливателя и промойте их в чистой воде.
- Удалите чешуйки *Lepidoptera* в воде при помощи щетки с тонкой щетиной.

8. Референтные коллекции

- Крыло без чешуек, при желании, затем можно окрасить раствором фуксинсернистой кислоты.
- Промойте в 95%-ном этиловом спирте и закрепите на предметном стекле в глицерине или растворе Хойера.
- Для подготовки постоянного препарата поместите крылья в гвоздичное масло на 5-10 минут перед закреплением в эупарале или канадском бальзаме.
- Расположите крыло, как пожелаете, переворачивая его, если необходимо, и убедившись в том, что его основание хорошо растянуто, и все жилки видны.

8.2.8 Процедура фиксации небольших членистоногих на предметном стекле

Подготовку препаратов на предметных стеклах всех образцов для референтной коллекции необходимо проводить согласно процедуре закрепления для постоянного хранения. Процедура закрепления для временного хранения также приводится ниже. Она может быть использована для быстрой идентификации и кратковременного хранения и может быть переделана в препарат для постоянного хранения.

8.2.8.1 Процедура для ногохвостиков (*Collembola*), тлей и незрелых особей полужетскокрылых (*Hemiptera*) (клопы)

- Поместите образцы в раствор Эссига/Уилки в ванночку, предназначенную для использования при окрашивании.
- Накройте стеклянной крышкой и нанесите этикетку с уникальным идентификационным номером.
- Нагревайте до осветления раствора (от 30 минут до часа) на нагревательной плитке или под лампочкой в вытяжном шкафу.

- При необходимости добавьте 3 или 4 капли окрашивающего раствора фуксинсернистой кислоты.
- Извлеките содержимое тела и повторите, при необходимости, используя новый раствор Эссига/Уилки.

Для постоянных препаратов

- Поместите в 25%-ный этиловый спирт на 5-10 минут.
- 50%-ный этиловый спирт – на 5-10 минут.
- 75%-ный этиловый спирт – на 5-10 минут.
- 100%-ный этиловый спирт – на 5-10 минут.
- Гвоздичное масло – на 5-10 минут.
- И, наконец, закрепите непосредственно в канадском бальзаме.

Для временных препаратов

Закрепите непосредственно в растворе Хойера (ногохвостки также могут быть осветлены в молочной кислоте в духовке при 40°C).

8.2.8.2 Трунцы (*Thysanoptera*)

Процедура подготовки постоянного препарата

- Поместите в 10%-ный КОН или раствор Эссига/Уилки на различное время, в зависимости от цвета образца:
 - черные или темно-коричневые – на несколько часов;
 - бледные – на 2 часа.
- Переместите в воду (не менее чем на 1 час, можно оставить на несколько дней).
- Переместите в 30%-ный этиловый спирт (на 1 час, можно оставить на 2-3 дня).
- Переместите в 70%-ный этиловый спирт (на 1 час, можно оставить на 2-3 дня).
- Переместите в 95%-ный этиловый спирт (на 1 час, можно оставить на 2-3 дня).

- Переместите в чистый спирт (на 1 час, можно оставить на 2-3 дня).
- Поместите в гвоздичное масло (не менее чем на 1 час, можно оставить на 2-3 дня).
- Закрепите на предметном стекле в канадском бальзаме, обычно один трипс на одно предметное стекло; голова образца смотрит вниз.

Процедура подготовки временного препарата

- Поместите трипсов в раствор Эссига/Уилки в лунку часового стекла на разное время в зависимости от цвета образца.
- Накройте стеклянной крышкой, нанесите этикетку и положите под лампу для осветления.
- После осветления (примерно в течение 1 часа, в зависимости от цвета образца), удалите внутренние части; промойте образец в 70-96%-ном этиловом спирте.
- Закрепите на предметном стекле в среде Хойера, обычно один трипс на одно предметное стекло, спинкой вверх, головой в сторону специалиста.
- Нанесите на препарат этикетку, при этом головка образца должна смотреть вниз.

Справочный материал: Трипсы-Вики. 2013. «Сбор и подготовка трипсов для исследования». Доступно по ссылке: http://thrips.info/wiki/Collecting_and_preparing_thrips_for_study (последний доступ осуществлен 22 сентября 2015 г.).

8.2.8.3 Процедура подготовки препаратов щитовок-щитоносцев и ложнощитовок (*Hemiptera: Diaspididae* и *Coccidae*) для временного хранения

Целью подготовки этого препарата является устранение как внешней секреции, покрывающей тело, так и внутренних

органов, не повреждая при этом внешние диагностические структуры тела.

- Под бинокулярным микроскопом достаньте образцы из пробирок и растительного субстрата и поместите их в ванночку, предназначенную для использования при окрашивании, содержащую раствор Эссига/Уилки.
- Осторожно удалите чешуйки с покрытия (контроли), сделайте прокол в брюшной среднегрудной зоне и добавьте несколько капель фуксинсернистой кислоты к красителю.
- Накройте стеклянной крышкой, нанесите этикетку и поместите под лампу для осветления. Образцы могут быть продуты и слегка вычищены на этом этапе, чтобы содействовать процессу осветления. Свежие образцы, как правило, освещаются должным образом в течение 1-2 часов.
- Переместите в свежий раствор Эссига/Уилки, извлеките внутренние части, а затем промойте образец в 75%-ом этиловом спирте.
- Закрепите в среде Хойера на предметном стекле брюшной стороной вверх с хвостовым щитком, смотрящим вверх.
- Нанесите этикетку на предметное стекло.

8.2.8.4 Процедура подготовки препаратов мучнистых червецов (*Hemiptera: Pseudococcidae*) и гигантских червецов (*Hemiptera: Monophlebidae*)

Целью подготовки этого препарата является устранение как внешней секреции, покрывающей тело, так и внутренних органов, не повреждая при этом внешние диагностические структуры тела.

- Под бинокулярным микроскопом извлеките образцы из растительного субстрата и пробирок и поместите

8. Референтные коллекции

их в ванночку, предназначенную для использования при окрашивании, содержащую раствор Эссига/Уилки.

- Сделайте небольшой надрез тонкой иглой на спинной стороне червеца или щитовки между тазиками задних ног.
- Поместите несколько капель хлороформа для удаления воскового слоя на теле и несколько капель фуксинсернистой кислоты для окрашивания.
- Накройте ванночку, предназначенную для использования при окрашивании, стеклянной крышкой, нанесите этикетку и поместите под лампу для осветления. Образцы могут быть продуты и слегка вычищены на этом этапе для содействия осветлению. Свежие образцы, как правило, освещаются должным образом в течение 1-2 часов.
- Переместите в свежий раствор Эссига/Уилки, извлеките внутренние части, а затем промойте образец в 75%-ном этиловом спирте.
- Закрепите на предметном стекле в среде Хойера брюшком вверх и головой вниз.
- Нанесите этикетку на предметное стекло.

8.2.8.5 Процедура подготовки препаратов мучнистых червецов и щитовок (*Hemiptera: Coccoidea*) для длительного хранения при помощи микроволновой печи

- Переместите щитовок или мучнистых червецов из растительного материала в сухую ванночку, предназначенную для использования при окрашивании. На этом этапе могут быть сделаны наблюдения – паразитизм, образец живой или мертвый, проведены подсчеты, предварительная идентификация и т.д.

- Накапайте 95%-ный этиловый спирт на червецов, чтобы он проник в воск.
- Сделайте прокол в среднегрудной части – минibuлавка с держателем идеально подходит для этой цели.
- Переместите насекомых в раствор Эссига/Уилки с добавлением одной или двух капель раствора фуксинсернистой кислоты; используйте 1 мл жидкости в пробирке емкостью 5 мл. Неплотно закройте крышкой – не закручивайте ее. Крышка должна иметь 3-4 вентиляционных отверстия, так как содержимое будет кипеть в пробирке (плотно закрытая пробирка может взорваться).
- Поместите в микроволновую печь на 1 минуту. *Примечание:* Время и мощность будет зависеть от мощности (количество потребляемых ватт) используемой микроволновой печи. Фенольные соединения будут испаряться, поэтому используйте вытяжной шкаф.
- Как только пробирка достаточно остынет, вылейте жидкость в ванночку для окрашивания. Насекомые должны быть осветлены. Если насекомые не осветлены, то аккуратно продуйте насекомое для очистки, а затем поместите обратно в пробирку и поместите в микроволновую печь еще на одну минуту.
- Переместите насекомых в 95%-ный этиловый спирт. Используйте пинцет с плоским кончиком, чтобы аккуратно выровнять брюшно-спинную зону, при этом вытолкнуть оставшееся внутреннее содержимое. Насекомые теперь могут быть закреплены в среде Хойера.
- Незамедлительно поместите в гвоздичное масло в ванночку для окрашивания. Накройте ванночку и поместите в микроволновую печь на 1 минуту. *Примечание:* время и мощность будет зависеть от мощности (количество потребляемых ватт) используемой

микроволновой печи. Масло не кипит, поэтому пробирка не используется. Масло растворяет следы жира и воска, которые в противном случае затемняют препараты в канадском бальзаме. Для некоторых насекомых, например, очень жирных червецов или гигантских червецов, может возникнуть необходимость повторить этот этап в свежем гвоздичном масле, если гвоздичное масло имеет густой мутный вид после нагрева в микроволновой печи.

- Переместите непосредственно в канадский бальзам на предметных стеклах.

Справочный материал: Процедура подготовки препарата на предметном стекле – это модификация метода, предложенного в работе **Ло П.Л. и Бланка Р.Х.** 1989 г. «Обследование видов щитовок-щитаносцев (Hemiptera: *Diaspididae*) в садах киви». Журнал «Энтомолог Новой Зеландии» 12: 1-4 / **Lo, P.L. & Blank, R.H.** 1989. A survey of armoured scale species (Hemiptera: *Diaspididae*) in kiwifruit orchards. *New Zealand Entomologist*, 12: 1–4.

8.2.8.6 Клещи (*Acari*)

Хорошо склеротизированных клещей следует осветлять в молочной кислоте до приготовления препарата на предметном стекле. Избегайте чрезмерного осветления в молочной кислоте, так как это может чрезмерно осветлить клещей и усложнить работу с ними.

Для того чтобы достать клещей из растительного субстрата, смочите иглу в молочной кислоте, среде Хойера или используйте тонкую кисть для рисования.

- Поместите их в ванночку для окрашивания или на предметное стекло с лункой с молочной кислотой и нагревайте под лампой, на нагревательной плитке или в печи при температуре 70°C.

- Закрепите осветленный образец на предметном стекле в среде Хойера.

Слегка склеротизированные и несклеротизированные клещи могут быть сразу закреплены на предметном стекле в среде Хойера. Поместите предметное стекло на нагревательную плитку для осветления при температуре 70°C. Образцы, как правило, осветляются для идентификации в течение часа.

Справочный материал: **Дули Дж.** 2002 г. «Подготовка препарата образца». Сан-Франциско, Калифорния: Карантин и защита растений / **Dooley, J.** 2002. *Specimen preparation*. San Francisco, CA: PPA. Документ доступен по ссылке адресу: http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/PDF_PwP%20ETC/Slide%20Prep%20Training.pdf (последний доступ осуществлен 22 сентября 2015 г.).

8.2.8.7 Незрелые особи белокрылок и листоблошек (*Hemiptera, Psylloidea: Aleyrodidae*) (*nyaparuu*)

- Поместите образцы в 75%-ный этиловый спирт.
- Переместите образцы в 10%-ный КОН и осветляйте в течение нескольких часов при комнатной температуре. (*Примечание:* никогда не нагревайте образцы белокрылки в КОН, так как это влияет на хитин и снижает его способность удерживать окраску). Не помещайте черные экземпляры в КОН, так как это вызывает сморщивание их кожи.
- Замочите в 75%-ном этиловом спирте (делать надрезы необязательно), а затем в отбеливающем растворе перекиси водорода и гидроксида аммония в пропорции 50:50.
- Убедитесь в том, что образцы погружены в раствор. Проверяйте каждые 15 минут.
- Как только образцы станут равномерного коричневого цвета, переместите их в 75%-ный этиловый спирт для промывания и нейтрализации КОН.

8. Референтные коллекции

- Переместите в раствор Эссига/Уикли с окрашивающей фуксинсернистой кислотой.
- Переместите в гвоздичное масло. Никогда не пытайтесь продувать или извлекать содержимое тела личинок (нимф), так как щетинки – очень тонкие и легко повреждаются. Оставьте на 5-10 минут, пока они не осветлятся.
- Поместите крошечную каплю на предметное стекло, распределите так, чтобы покрыть всю зону покровного стекла.
- Разместите образцы; позвольте канадскому бальзаму стать немного липким.
- Поместите покровное стекло осторожно на бальзам и образцы.
- Если бальзам не покрывает зону покровного стекла, вы можете добавить еще немного бальзама.

8.2.8.8 Взрослые особи белокрылки

Процедура временного закрепления

- Поместите образцы в 70%-ный этиловый спирт.
- Поместите образец на предметное стекло со средой Хойера. Образцы на предметном стекле должны быть расположены спинкой вверх или на боку. Расположить на боку труднее, но необходимые структуры лучше различимы.
- Нагревайте предметное стекло при 40-60°C в течение нескольких часов.

Процедура постоянного закрепления

- Поместите образцы в 70%-ный этиловый спирт (делать надрезы не обязательно, и их не следует делать).
- Используйте лопаточку, достаточно широкую для поддержания большинства частей тела и крыльев, когда вы переносите их из одного реактива в другой.

- Переместите образцы в 10%-ный КОН и осветляйте в течение нескольких часов при комнатной температуре. Лучше всего оставить на ночь, если только не требуется провести быстрое определение. *Примечание:* Никогда не нагревайте образцы в КОН!
- Переместите в этиловый спирт для промывания и нейтрализации КОН.
- Переместите в раствор Эссига/Уилки с окрашивающим веществом (ногами вниз, спинкой вверх; не обязательно погружать весь образец, иначе крылья, скорее всего, будет невозможно отделить от остальной части тела); нагревайте при 50°C (не пытайтесь извлечь содержимое тела, так как белокрылка становится очень липкой в нагретом растворе Эссига/Уилки).
- Переместите в гвоздичное масло и извлеките содержимое тела очень тонкой изогнутой иглой (булавки для насекомых № 00 или 0); поместите обратно в раствор Эссига/Уилки (окрашенный или неокрашенный), при необходимости, и нагревайте. Вновь поместите в гвоздичное масло, если образцы нагревались в растворе Эссига/Уилки.
- Закрепите образцы на предметном стекле при помощи покровного стекла с креплениями (крепления должны быть виниловыми или из короткой моноволоконной медной рыболовной проволоки диаметром около 0,25 мм).

Примечание: важно поместить образцы в очень тонкий слой жидкого канадского бальзама, разбавленного ксиленом до текучего или капяющего состояния, иначе усики, а зачастую и ноги, разрушатся и станут бесполезными для целей идентификации. Густой бальзам не может проникнуть через небольшие отверстия в этих структурах достаточно быстро. Густой бальзам можно добавить перед покрытием покровным стеклом, и, вероятно, густой бальзам необходим для предметных стекол с креплением в

любом случае, так как ксилен испарится, оставив недостаточное количество бальзама для покрытия образцов.

- Образцы должны быть расположены спинкой вверх или на боку. Расположить их на боку сложнее, но необходимые структуры – лучше различимы.

Справочный материал: Эта процедура была взята из временного ключа по взрослым белокрылкам Калифорнии, автор – Р. Дж. Джилл / R.J. Gill (1989 г., неопубликованные данные).

8.2.9 Справочные материалы по методам подготовки препаратов и их фиксации

Авторы рекомендуют следующую литературу по методам подготовки и фиксации образцов. В этих справочных материалах приводятся методы подготовки препаратов различных групп.

Общие

Науманн Д.И., под ред. 1991 г. «Насекомые Австралии: учебник для студентов и научных работников» (части 1 и 2). Мельбурн, Издательство «Melbourne University Press». С.1029 / **Naumann, D.I.**, ed. 1991. The insects of Australia: a textbook for students and research workers (Parts 1 & 2). Melbourne, Melbourne University Press. 1029 pp.

Уокер А.К. и Кросби Т.К. 1988 г. «Подготовка и курирование насекомых», новое пересмотренное издание. Новозеландская информационная серия УНПИ (Управление научных и промышленных исследований) 163. Веллингтон, Издательство научной информации УНПИ. С 92 / **Walker, A.K. & Crosby, T.K.** 1988. The preparation and curation of insects, new revised edn. New Zealand DSIR Information Series 163. Wellington, DSIR Science Information Publishing Centre. 92 pp. Доступно по ссылке: <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/nzac/specimen-preparation->

[and-curation](#) (последний доступ осуществлен 17 сентября 2015 г.).

Стер Ф.В., под ред. 1987 г. «Незрелые насекомые». Дабек, Айова, Издательство «Kendall / Hunt Publishing». С. 754. (Т. 1, стр. 9-17) / **Stehr, F.W.**, ed. 1987. Immature insects. Dubuque, IA, Kendall/Hunt Publishing. 754 pp. (Vol. 1, pp. 9–17).

Клещи (Acari)

Кранц Г.В. и Уолтер, Д.Е. 2009 г. «Руководство по акарологии», 3-е изд. Лаббок, Техас, Издание «Texas Tech University Press». С. 816. (Стр. 83-96) / **Krantz, G.W. & Walter, D.E.** 2009. A manual of acarology, 3rd edn. Lubbock, TX, Texas Tech University Press. 816 pp. (pp. 83–96).

Джеппсен Л.Р., Ллойда Х.Х., Кифер Н.Н. и Бейкер Е.В., 1975 г. «Клещи, повреждающие экономически важные растения». Беркли, Калифорния, Издательство «University of California Press». С. 614. (Стр. 385-392) / **Jeppson, L.R., Keifer, N.H. & Baker, E.W.** 1975. Mites injurious to economic plants. Berkeley, CA, University of California Press. 614 pp. (pp. 385–392).

Пауки (Araneae)

Убик Д., Пакуин П., Кушинга П.Е. и Рот Б., под ред. 2005 г. «Роды пауков Северной Америки: руководство по идентификации». Американское арахнологическое общество. (стр. 8-9) / **Ubick, D., Paquin, P., Cushing, P.E. & Roth, V.**, eds. 2005. The spider genera of North America: an identification manual. The American Arachnological Society. (pp. 8–9).

Жесткокрылые (Coleoptera)

Бут Р.Г., Кокс М.Л. и Мэдж Р. Б. 1990 г. «Руководство по насекомым, имеющим важное значение для человека. Том 3. Coleoptera». Оксфорд. Издательство «Oxford University Press». С. 392 (Взрослые особи, стр. 10-12; Личинки, стр. 205-208.) / **Booth, R.G., Cox, M.L. & Madge, R.B.** 1990. IIE guides to insects of importance

8. Референтные коллекции

to man. Vol. 3. Coleoptera. Oxford, Oxford University Press. 392 pp. (Adults, pp. 10–12; larvae, pp. 205–208).

Двукрылые (Diptera)

Феррар П., 1987 г. «Руководство по размножению и незрелым стадиям Diptera Cyclorrhapha». Часть 1. Текст; Часть 2. Цифры. Лейден Е. Дж., Брилл. Копенгаген, Издательство «Scandinavian Science Press». С. 907. (стр. 10–12) / **Ferrar, P.** 1987. A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha. Part 1. Text; Part 2. Figures. Leiden, E.J. Brill; Copenhagen, Scandinavian Science Press. 907 pp. (pp. 10–12).

Уайт И. и Элсон-Харрис М.М., 1992 г. «Фруктовые мухи экономической значимости: их идентификация и биология». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 600. (Стр. 24–29) / **White, I. & Elson-Harris, M.M.** 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Wallingford, UK, CAB International. 600 pp. (pp. 24–29).

Дрю Р.А.И., Хупер Г.Х.С. и Бейтман М. А. 1978 г. «Экономически значимые фруктовые мухи южной части Тихоокеанского региона». Квинсленд, Департамент сырьевой промышленности; Канберра, Департамент здравоохранения. С.137. (стр. 2–4) / **Drew, R.A.I., Hooper, G.H.S. & Bateman, M.A.** 1978. Economic fruit flies of south Pacific region. Queensland, Department of Primary Industries; Canberra, Department of Health. 137 pp. (pp. 2–4).

Фут Р.Х., Бланк Ф.Л. и Норрбом А.Л. 1993 г. «Справочник по фруктовым мухам (Diptera: Tephritidae) Америки к северу от Мексики». Итака, штат Нью-Йорк. С. 576. (стр. 37–41) / **Foote, R.H., Blanc, F.L. & Norrbom, A.L.** 1993. Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America north of Mexico. Ithaca, NY, Comstock. 576 pp. (pp. 37–41).

Полужесткокрылые (Heteroptera)

Слатер Дж.А. и Барановски Р.М. 1978 г. «Как распознать истинных клопов (Hemiptera–Heteroptera)». Дабек, Айова, Издательство «W.C. Brown» (стр. 12–15) / **Slater, J.A. & Baranowski, R.M.** 1978. How to know the true bugs (Hemiptera–Heteroptera). Dubuque, IA, W.C. Brown. (pp. 12–15).

Белокрылки (Aleyrodidae)

Мартин Дж.Х. 1999 г. «Белокрылки фауны Австралии (Sternorrhyncha: Aleyrodidae): руководство по таксономии и идентификации». Канберра, Государственное объединение научных и прикладных исследований. (стр. 124–125) / **Martin, J.H.** 1999. The whitefly fauna of Australia (Sternorrhyncha: Aleyrodidae): a taxonomic account and identification guide. Canberra, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. (pp. 124–125).

Тли (Aphididae)

Блэкмен Р.Л. и Истоп В.Ф., 2000 г. «Тли на мировых сельскохозяйственных культурах: руководство по идентификации и информации». 2-е издание. СК. Издательство «Wiley». С. 250 (стр. 363–365) / **Blackman, R.L. & Eastop, V.F.** 2000. Aphids on the worlds crops: an identification and information guide, 2nd edn. UK, Wiley. 250 pp. (pp. 363–365).

Ложнощитовки (Coccidae)

Джилл Р.Дж. 1988 г. «Насекомые-щитовки Калифорнии. Часть 1. Ложнощитовки (Homoptera: Coccoidea: Coccidae)». Техническая серия по сельскохозяйственной биосистематике и фитопатологии № 1. Сакраменто, Департамент продовольствия и сельского хозяйства Калифорнии. С.132. (стр. 126–127) / **Gill, R.J.** 1988. The scale insects of California. Part 1 The soft scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Technical Series in Agricultural

Biosystematics and Plant Pathology No. 1. Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 132 pp. (pp. 126–127).

Кокциды (Coccoidea)

Джилл Р.Дж., 1988. «Насекомые-щитовки Калифорнии. Часть 2. Второстепенные семейства (Homoptera: Coccoidea)». Сакраменто, Департамент продовольствия и сельского хозяйства Калифорнии. С. 241 / **Gill, R.J.** 1993. The scale insects of California. Part 2 The minor families (Homoptera: Coccoidea). Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 241 pp.

Щитовки (Diaspididae)

Джилл Р.Дж. 1987 г. «Насекомые-щитовки Калифорнии. Часть 3. Щитовки-щитоносцы (Homoptera: Diaspididae)». Техническая серия по сельскохозяйственной биосистематике и фитопатологии № 3. Сакраменто, Департамент продовольствия и сельского хозяйства Калифорнии. С. 307 / **Gill, R.J.** 1997. The scale insects of California. Part 3. The armored scales (Homoptera: Diaspididae). Technical Series in Agricultural Biosystematics and Plant Pathology No. 3. Sacramento, California Department of Food and Agriculture. 307 pp.

Вильямс Д. Дж. и Ватсон Г.В. 1988 г. «Щитовки тропиков южной части Тихоокеанского региона. Часть 1. Щитовки-щитоносцы (Diaspididae)». Валлингфорд, СК, Энтмологический институт Международного центра сельскохозяйственных исследований. (стр. 13) / **Williams, D.J. & Watson, G.W.** 1988. The scale insects of the tropical south Pacific region. Part 1. The armoured scales (Diaspididae). Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology. (p. 13).

Мучнистые червецы (Pseudococcidae)

Вильямс Д.Дж. и де Виллик М.С.Г. 1992 г. «Мучнистые червецы Центральной и Южной Америки». Валлингфорд,

СК, Энтмологический институт Международного центра сельскохозяйственных исследований. (стр. 22) / **Williams, D.J. & de Willink, M.C.G.** 1992. Mealybugs of Central and South America. Wallingford, UK, CAB International. 635 pp. (p. 22).

Вильямс Д. Дж. и Ватсон Г.В. 1988 г. «Щитовки тропиков южной части Тихоокеанского региона. Часть 2. Мучнистые червецы (Pseudococcidae)» Энтмологический институт Международного центра сельскохозяйственных исследований. С. 260. (стр. 11). / **Williams, D.J. & Watson, G.W.** 1988. The scale insects of tropical south Pacific region. Part 2. Mealybugs (Pseudococcidae). CAB International Institute of Entomology. 260 pp. (p. 11).

Чешуекрылые (Lepidoptera)

Холловей Дж.Д., Брэдли Дж.Д. и Беттс С.Р., под ред. 1987 г. «Руководство по насекомым, важным для человека. Т.1. Lepidoptera». Валлингфорд, СК, Энтмологический институт Международного центра сельскохозяйственных исследований. (стр. 11–14) / **Holloway, J.D., Bradley, J.D. & Betts, C.R.**, eds. 1987. CIE guides to insects of importance to man. Vol. 1. Lepidoptera. Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology. (pp. 11–14).

Трипсы (Thysanoptera)

Палмер Дж.М., Моунд Л.А. и Оме Г.Дж. 1989 г. «Руководство по значимым для человека насекомым. Т.2. Thysanoptera». Валлингфорд, Энтмологический институт Международного центра сельскохозяйственных исследований; Лондон, Британский музей естественной истории. С. 73. (стр. 3–5) / **Palmer, J.M., Mound, L.A. & du Heume, G.J.** 1989. CIE guides to insects of importance to man. Vol. 2. Thysanoptera. Wallingford, UK, CAB International Institute of Entomology; London, British Museum of Natural History. 73 pp. (pp. 3–5).

8. Референтные коллекции

Трипсы-Вики. 2013 г. Сбор и подготовка трипсов для исследования. Доступно по ссылке: http://thrips.info/wiki/Collecting_and_preparing_thrips_for_study (последний доступ осуществлен 22 сентября 2015 г.).

8.3 Референтная коллекция нематод

8.3.1 Оборудование и реактивы

- высушивающее средство (например, силикагель, хлорид кальция, 95%-ный этиловый спирт);
- этиловый спирт;
- формалин;
- глицерин;
- парафильм;
- сушилка;
- препаровальная игла;
- стеклянная крышка для покрытия часового стекла;
- нагреватель;
- предметное стекло для микроскопа;
- покровное стекло для микроскопа;
- пипетка;
- мелкие стеклянные шарики, тонкая проволока или воск для закрепления крышек;
- пробирка;
- часовое стекло.

8.3.2 Процедура фиксации нематод для постоянного хранения

- Выделите нематод на разных стадиях развития, как описано в Главе 5.
- Переместите живые образцы на часовое стекло.
- Уменьшите количество воды в часовом стекле до 1 мл.
- Добавьте 2 мл 3%-ного горячего формалина на часовое стекло и оставьте для затвердевания на, как минимум, 2 недели.

Примечание: Не используйте фиксирующие жидкости, содержащие этиловый спирт, так как это приводит к повреждению.

8.3.2.1 Препараты для длительного хранения

- После умерщвления и фиксации переместите образцы из фиксирующего вещества в 1 мл раствора Сейнхорста I (20 частей 95%-ного этилового спирта, 1 часть глицерина и 79 частей воды) в часовом стекле.
- Поместите часовое стекло с образцами в сушилку с высушивающим веществом на 2-3 дня.
- Добавьте в два раза больше раствора Сейнхорста II (5 частей глицерина и 95 частей 95%-ного этилового спирта) к имеющемуся раствору в часовом стекле.
- Накройте часовое стекло стеклянной крышкой, оставив небольшой зазор около 1-2 мм шириной.
- Храните образцы при комнатной температуре, чтобы обеспечить медленное испарение спирта в течение 2-х недель.
- Переместите образцы препаровальной иглой (или же закрепите ресничку или перышко на держателе для ручек) на стеклянное предметное стекло с каплей глицерина.
- Распределите нематод, при необходимости.
- Добавьте маленькие стеклянные шарики, тонкую проволоку или воск для поддержания покровных стекол для крупных нематод.
- Осторожно поместите покровное стекло и запечатайте его лаком для ногтей.

8.3.2.2 Незакрепленные образцы

- После умерщвления и фиксации переместите образцы в пробирку.
- Добавьте 3%-ный формалин с 2%-ным глицерином для предотвращения разрушения образцов в случае испарения консервирующего вещества;
- Запечатайте пробирку парафильмом и прикрепите этикетку.

8.4 Референтная коллекция фитопатогенов и гербарий

Референтная коллекция возбудителей болезней растений и гербарий может содержать любые из нижеприведенных типов образцов:

- грибы;
- инвазивные растения;
- паразитические растения;
- части растений, пораженные патогенами (например, бактериями, грибами, нематодами, вирусами, вириодами, фитоплазмами, *Liberibacter*)
- части растений, пораженных абиотическими факторами.

В хорошей референтной коллекции возбудителей болезней растений и в гербарии (в дополнение к перечисленным во введении) должны храниться:

- образцы с достаточным количеством материала;
- образцы с разными частями растений с разными стадиями развития симптомов;
- образцы с разными морфологическими состояниями, что касается грибов (например, анаморф и телеоморф, или в состоянии эцидия, пикниды, урединия и телия);
- образцы из разных стран;
- образцы из разных административных районов;
- множество образцов, чтобы охватить разнообразие среди популяций;
- дополнительная информация, например, фотографии симптомов в поле и фотографии образцов перед сушкой.

Примечание: Можно приготовить препарат образцов на предметных стеклах для микроскопа и хранить его в гербарии.

8.4.1 Выбор метода

Большинство образцов растений, включая зараженные патогенами,

могут быть сохранены посредством воздушной сушки, сушки с помощью десикантов, сушки под прессом, лиофильной сушки, заморозки и ламинирования. Очень мясистые и хрупкие образцы можно сохранить посредством консервации для сохранения формы образца. Преимущества и недостатки каждого из этих методов кратко представлены в табл. 3.

8.4.2 Требования к образцам

Образцы должны быть обработаны в кратчайшие сроки. Если этого не делается, то наклейте на образцы этикетки и храните их в надлежащих условиях – в холодильнике или в прохладном затененном месте. *Примечание:* Некоторые тропические растения становятся темно бурыми, когда их хранят в холодильнике.

Образцы должны содержать достаточно материала в хорошем состоянии для их сохранения. Перед обработкой образцов необходимо сфотографировать их, если это требуется. *Примечание:* Сушка изменит цвет больной ткани с симптомами и форму мясистых частей растений.

Рекомендуется выбирать части растений, на которых проявляются разные стадии симптоматики или разное состояние патогенов. Части растений следует разрезать, чтобы они поместились в контейнеры. Объемный материал можно разрезать пополам или на четыре части или нарезать ломтиками для упрощения сушки.

Необходимо надеть одноразовые перчатки и начисто вытереть поверхности рабочего стола и инструменты дезинфицирующим средством. Это особенно важно при работе с материалом, зараженным болезнями, которые могут оказать неблагоприятное воздействие.

8. Референтные коллекции

Таблица 3. Преимущества, недостатки и типы образцов, подходящих для каждого метода сохранения в гербарии

Метод сохранения	Типы образцов	Преимущества	Недостатки
Воздушная сушка	Сухие и менее мясистые образцы	Низкие организационные и эксплуатационные издержки. Симптомы хорошо сохраняются	Нуклеиновые кислоты плохо сохраняются
Сушка при помощи десикантов	Сухие и менее мясистые образцы	Низкие организационные и эксплуатационные издержки. Нуклеиновые кислоты сохраняются относительно хорошо	Может потребоваться заменять десиканты. Симптомы хорошо не сохраняются
Сушка под прессом	Сухие, менее мясистые и менее объемные образцы	Низкие организационные и эксплуатационные издержки. Симптомы хорошо сохраняются	Нуклеиновые кислоты плохо сохраняются
Лиофильная сушка	Подходит для большинства образцов	Нуклеиновые кислоты хорошо сохраняются	Ампулы для лиофильной сушки ограничивают размер образцов. Организационные и эксплуатационные расходы выше. Симптомы не сохраняются хорошо
Заморозка	Подходит для всех типов образцов	Нуклеиновые кислоты хорошо сохраняются	Пространство морозильника может быть ограничено. Организационные и эксплуатационные расходы выше. Нуклеиновые кислоты могут разрушиться в процессе многочисленных заморозок-оттаиваний
Ламинирование	Сухие и относительно плоские образцы	Низкие организационные и эксплуатационные издержки. Быстрая и легкая подготовка. Симптомы хорошо сохраняются	Трудно изучать образцы под лупой или микроскопом. Трудно выделять образцы для дополнительных анализов. Нуклеиновые кислоты плохо сохраняются
Консервирование	Очень мясистые или хрупкие образцы	Низкие организационные и эксплуатационные издержки. Симптомы хорошо сохраняются	Нуклеиновые кислоты плохо сохраняются в некоторых случаях консервирования

8.4.2.1 Сохранение образцов, зараженных вирусами, виридами и бактериеподобными организмами, культуру которых невозможно выделить, такими как фитоплазмы и *Liberibacter*

- Во всех возможных случаях необходимо сохранить оригинальную растительную ткань (например, ткань растений, зараженных вирусом).
- Что касается механически передаваемых вирусов и виридов, зараженные травянистые или древесные растения могут храниться вместо или в дополнение к оригинальной растительной ткани.
- Что касается всех вирусов, виридов и микроорганизмов, культуру которых невозможно выделить (например, фитоплазмы, *Liberibacter*), то также могут храниться зараженные растения.
- Большинство вирусов, виридов и микроорганизмов, культуру которых невозможно выделить, хорошо сохраняются. Однако некоторые из этих организмов могут разрушиться в течение этого процесса по причине их нестабильной природы – например, ткани растений, хранящиеся в морозильнике, со временем разрушаются после многочисленных циклов оттаивания и заморозки.

- Наилучший метод сохранения – это лиофильная сушка растительной ткани; однако хорошим методом также является сушка растительной ткани на десикантах (например, хлористый кальций). Замороженная растительная ткань также хороша до тех пор, пока материал слишком часто не подвергается циклам оттаивания и заморозки.
- Микроорганизмы, выделение культуры которых невозможно (например, фитоплазмы, *Liberibacter*), можно сохранить только в живых растениях для проведения биологических работ (например, заражение привителем или насекомыми).

8.4.3 Методы сохранения

Общее оборудование, расходные материалы и реактивы:

- канцелярские товары;
- этикеточная бумага;
- тонкая оберточная бумага;
- секционный набор (пинцеты, скальпели, ножницы);
- разделочная доска;
- контейнеры для образцов (например, большие полиэтиленовые пакеты, бумажные конверты, стеклянные флаконы);
- десиканты: этиловый спирт, изопропиловый спирт или коммерческий десикант (например, Trigen, Virkon);
- средства индивидуальной защиты (например, лабораторные халаты, одноразовые перчатки, маски, очки);
- камера, столик для фотографирования и сканер;
- компьютер и принтер;
- холодильник.

8.4.3.1 Воздушная сушка

Образцы можно высушить, используя дегидратор для сушки пищевых продуктов, духовку с конвекцией или просто коробку или ящик с вентилятором внутри для обеспечения циркуляции воздуха, чтобы облегчить сушку.

Примечание: При создании некоторых референтных коллекций патогенов растений и гербариев используют микроволновые печи для сушки образцов; однако этого делать не рекомендуется, потому что некоторые части растений могут взорваться, и процесс нагрева повреждает ДНК образца, которая в будущем может пригодиться для проведения молекулярных исследований.

В качестве контейнеров для образцов могут использоваться изготовленные на заказ конверты для гербария, почтовые конверты, воздухонепроницаемые пластмассовые коробки или герметизируемые пластиковые пакеты.

Процедура воздушной сушки образцов:

- Разложите образцы на лотках для облегчения сушки.
- Поместите лотки в сушилку и включите сушилку.
- Соберите образцы, когда они полностью высохнут.
- Наклейте на контейнеры для каждого образца этикетки с уникальным номером образца.
- Поместите высушенные образцы в контейнеры с этикетками.
- Поставьте контейнеры в морозильную камеру на 2 дня при температуре -18°C , чтобы все вредные организмы гербария погибли. *Примечание:* положите контейнеры из бумаги (например, конверты для гербария, конверты) в герметизируемые пластиковые пакеты во избежание конденсации воды.
- Удалите весь конденсат воды с поверхности контейнеров.
- Храните контейнеры с образцами в системе хранения.
- Обновите базу данных по гербарии.

8.4.3.2 Сушка под прессом

Список оборудования, расходных материалов и реактивов:

8. Референтные коллекции

- газетная или фильтровальная бумага;
- деревянная доска (существуют коммерчески производимые прессы для растений);
- обхваты;
- груз;
- бумажная папка;
- веревочки (например, зубные нити, хлопчатобумажная нитка);
- ленты (используйте высококачественные ленты, чтобы не допустить их отделения от образца через несколько лет).

Процедура сушки образцов под прессом:

- Выложите и разместите образцы между листами газет (или фильтровальной бумаги). *Примечание:* Согните длинные стебли в форме буквы «V» или «W».
- Напишите номер образца на листке бумаги и положите его вместе с образцом.
- Между образцами дополнительно положите газеты, чтобы они впитывали влагу.
- Положите стопку газет с образцами между двумя деревянными досками.
- Завяжите обхваты вокруг стопки и затяните их.
- Поместите тяжелый груз сверху на стопку для добавления дополнительного веса.
- Держите стопку в теплом и сухом месте.
- Правильно разместите образцы через несколько часов или дней их нахождения под прессом.
- Ежедневно меняйте газеты в течение первых нескольких дней, а затем чуть реже в зависимости от состояния образцов и относительной влажности. *Примечание:* Некоторые виды растений становятся темно бурыми, если газеты часто не менялись, чтобы дать образцам достаточно быстро высохнуть. Использованные газеты следует выбросить или тщательно высушить перед повторным использованием.

- Регулярно осматривайте образцы, чтобы предотвратить появление плесени.
- Собирайте образцы, которые полностью высохли.
- Приклейте на бумажные папки номер образца.
- Положите в бумажные папки образцы и зафиксируйте их веревочками и лентами.
- Обновите базу данных по референтной коллекции фитопатогенов и гербария.

8.4.3.3 Сушка при помощи десикантов

Список оборудования, расходных материалов и реактивов:

- высушивающие средства, например, хлорид кальция или впитывающие влагу шарики силикагеля (*примечание:* смотрите национальные руководства по надлежащей утилизации этих токсичных химических веществ);
- контейнеры для хранения с завинчивающимися крышками (пластмассовые или стеклянные);
- хлопковая вата или бумажное полотенце (для недопущения соприкосновения хлорида кальция с растительной тканью).

Подготовка контейнеров:

- Добавьте десикант на дно пластмассового контейнера. *Примечание:* наденьте перчатки, маску для лица и очки для работы с этим химическим веществом.
- Плотнo приложите хлопковую вату или бумажное полотенце ко дну контейнера для того, чтобы создать барьер между хлоридом кальция и растительной тканью.
- Вложите этикетку с указанием, как минимум, уникального идентификационного номера.

Подготовка образцов:

- Выберите растительную ткань для сохранения. Она должна быть настолько свежей, насколько это возможно, и должна содержать симптомы. *Примечание:* Использование сухой или гнившей ткани следует избегать. Работайте с зараженными растительными материалами в перчатках. Образцы все время должны находиться на льду.
- Удалите всю влагу, аккуратно высушив поверхность бумажным полотенцем.
- На чистой и продезинфицированной разделочной доске порежьте растительную ткань на кусочки, которые поместятся в контейнер, используя лезвие скальпеля или бритвы. *Примечание:* Работая с растительным материалом, зараженным разными организмами, меняйте перчатки, утилизируйте одноразовые лезвия бритвы, дезинфицируйте разделочную доску и лезвие таким дезинфицирующим веществом, как 70%-ный раствор спирта, препарат «Виркон» или водный раствор гипохлорита натрия, или такими влажными салфетками, как «Isowipes», «Mediwipes», «Trigene» или «V-wipes».

Сушка и хранение образцов:

- Поместите кусочки растительной ткани в пластмассовый контейнер.
- Плотнo закройте пластмассовый контейнер.
- Наклейте на контейнер этикетку с надписью стойкими чернилами или карандашом или напрямую на контейнере сделайте надпись стойкими чернилами. *Примечание:* Минимальное количество информации, которое должно быть размещено на этикетке, включает в себя научное название растительного материала и уникальный идентификационный номер.

- Храните при комнатной температуре в сухом прохладном месте.
- Обновите базу данных по гербарию.

8.4.3.4 Лиофильная сушка

Список оборудования, расходных материалов и реактивов:

- холодильник с температурой 4°C или холодильный склад;
- лиофильная сушилка;
- стеклянные флаконы, резиновые уплотнители и закручивающиеся крышки для лиофильной сушилки;
- впитывающие влагу шарики силикагеля;
- хлопковая вата или бумажное полотенце;
- лезвия скальпеля или лезвия бритвы;
- одноразовые перчатки;
- разделочная доска;
- дезинфицирующее средство (например, 70%-ный раствор этилового спирта; влажные салфетки, например Trigene);
- бумажные этикетки (чтобы положить их внутрь стеклянных флаконов);
- клейкие этикетки (для приклеивания на крышки флаконов);
- фломастеры, ручка;
- компьютерная база данных или лист бумаги для записей.

Подготовка флаконов:

- Положите несколько шариков впитывающего влагу силикагеля в каждый флакон (3–5 флаконов для каждого образца).
- Плотнo ко дну флакона приложите хлопковую вату или бумажное полотенце для создания барьера между шариками силикагеля и образцом.
- Вложите этикетку с указанием, как минимум, уникального идентификационного номера.

Подготовка образца:

- Выберите растительную ткань для сохранения. Она должна быть настолько свежей, насколько это возможно,

8. Референтные коллекции

и иметь симптомы. *Примечание:* Использование сухой или сгнившей ткани следует избегать. Работайте с зараженными растительными материалами в перчатках. Образцы все время должны находиться на льду.

- Порезьте растительную ткань на маленькие кусочки, используя лезвие скальпеля или лезвие бритвы и продезинфицированную разделочную доску. *Примечание:* Работая с растительным материалом, зараженным разными организмами, меняйте перчатки, утилизируйте одноразовые лезвия бритвы, дезинфицируйте разделочную доску и лезвие таким дезинфицирующим веществом, как 70%-ный раствор спирта, препарат «Виркон» или водный раствор гипохлорита натрия, или такими влажными салфетками, как «Isowipes», «Mediwipes», «Trigene» или «V-wipes».
- Перенесите приблизительно 0,5 г измельченной растительной ткани в подготовленный стеклянный флакон с этикеткой.

Сушка и хранение образцов:

- Поместите флаконы на металлический стеллаж лиофильной сушилки.
- Неплотно поместите резиновую прокладку на горлышко флакона.
- Поместите стеллаж с подготовленными образцами в камеру лиофильной сушилки.
- Оставьте лиофильную сушилку работать на ночь. *Примечание:* Цвет силикагеля должен стать темно синим, когда образец полностью высохнет.
- Запечатайте флаконы, закрутив закручивающий механизм.
- Прикрутите пластмассовую крышку.
- Поставьте инвентарный номер на верх крышки.
- Перенесите флаконы в холодильник с температурой 4°C для длительного хранения. *Примечание:* Если силикагель превратится из синего в розовый,

это показатель того, что прокладка на флаконе, возможно, пропускает влагу и растительную ткань внутри нужно незамедлительно высушить или выбросить.

- Обновите базу данных по референтной коллекции фитопатогенов и гербария.

8.4.3.5 Заморозка

Список оборудования, расходных материалов и реактивов:

- контейнеры для хранения (пластмассовые или стеклянные) с завинчивающимися крышками или герметизируемые пластиковые пакеты;
- хлопчатобумажное или бумажное полотно для отделения хлорида кальция от растительной ткани;
- клейкие этикетки, подходящие для заморозки;
- фломастеры или карандаши;
- лезвия скальпеля или лезвия бритвы;
- одноразовые перчатки;
- разделочная доска;
- дезинфицирующее средство (например, 70%-ный раствор этилового спирта, препарат «Виркон», раствор гипохлорита натрия, или такие влажные салфетки, как, например, «Trigene»).
- компьютер/база данных или лист бумаги для записей.

Подготовка контейнера:

- Подготовьте клейкую этикетку с указанием, как минимум, уникального идентификационного номера или напишите его прямо на контейнере или пластиковом пакете стойкими чернилами. *Примечание:* Со временем фломастер снаружи может стереться.
- По выбору: Можно внутрь контейнера или пластикового пакета вложить бумажную этикетку.

Подготовка образцов:

- Выберите растительную ткань для сохранения: Она должна быть настолько свежей, насколько это возможно, и с симптомами. *Примечание:* Использование сухой или сгнившей ткани следует избегать. Работайте с зараженными растительными материалами в перчатках. Образцы все время должны находиться на льду.
- Удаляйте всю влагу, мягко протирая поверхность бумажным полотенцем.
- Расправьте растительный материал, если это возможно.
- Поместите растительную ткань в контейнер или пластиковый пакет, помеченные этикеткой, и закройте их.

Примечание: Работая с растительным материалом, зараженным разными организмами, меняйте перчатки, утилизируйте одноразовые лезвия бритвы, дезинфицируйте разделочную доску и лезвие таким дезинфицирующим веществом, как 70%-ный раствор спирта, препарат «Виркон» или водный раствор гипохлорита натрия, или такими влажными салфетками, как «Isowipes», «Mediwipes», «Trigene» или «V-wipes».

Хранение образцов

- Храните образцы в морозильной камере с температурой -20°C или, желательно, в морозильной камере с температурой -80°C . *Примечание:* Не допускайте многочисленных оттаиваний и заморозок, поскольку это разрушит растительную ткань.
- Обновите базу данных по референтной коллекции фитопатогенов и гербария.

8.4.3.6 Ламинирование

Список оборудования, расходные материалы и реактивы:

- ламинатор;
- листы ламинационной пленки.

Процедура ламинирования сухих образцов:

- Положите и разместите образцы между листами ламинационной пленки.
- Напишите номер образца на листке бумаги и положите ее с образцом. Также можно сделать надпись на листе ламинационной пленки после ламинирования.
- Включите ламинатор и подождите, пока он не нагреется и не будет готов к ламинированию.
- Пропустите листы ламинационной пленки через ламинатор.
- Выключите ламинатор.
- Обновите базу данных по референтной коллекции фитопатогенов и гербария.

8.4.3.7 Консервирование

Список оборудования, расходных материалов и реактивов

- воздухонепроницаемые стеклянные контейнеры;
- консервирующие вещества (например, 70%-ный этиловый спирт).

Процедуры подготовки консервирования образцов

- Слейте лишнюю жидкость, если необходимо.
- Положите образец в стеклянный контейнер, заполненный консервирующим веществом. *Примечание:* удостоверьтесь, что образец полностью погружен в консервирующее вещество и крышка стеклянного контейнера плотно закрыта.
- Приклейте на стеклянный контейнер этикетку с номером образца и типом использованного консервирующего вещества.
- Меняйте один или несколько раз консервирующее вещество, в котором находятся образцы с высоким содержанием воды.
- Обновите базу данных по референтной коллекции фитопатогенов и гербария.

8. Референтные коллекции

8.4.3.8 Живые культуры

Живые культуры грибов и бактерий можно поддерживать посредством частого их переноса на свежую питательную среду. Хранение культур в холодильнике (4°C) или погруженными в минеральное масло могут продлить период времени между посевами на новую среду. Грибные культуры, которые формируют споры, могут сохраняться посредством лиофильной сушки в герметичных стеклянных ампулах. Большинство культур могут годами храниться в морозильных камерах (-20°C или -40°C) и камерах глубокой заморозки (-80°C); и десятилетиями в криогенных морозильных камерах (ниже -135°C) и в парах жидкого азота, при этом наибольшая сохранность образцов обеспечивается последними двумя методами. Однако оомицеты, такие как *Pythium* и *Phytophthora*, лучше всего сохраняются в стеклянных флаконах с водой в холодильнике (4°C). Подробное описание этих методов можно найти в приведенных ниже справочных материалах:

Кирсоп Б.Е. и Дойль А. 1991 г. «Поддержание микроорганизмов и культивируемых клеток: руководство по лабораторным методам», 2-е издание. Издательство «Академическая пресса», С. 288 / **Kirsop, B.E. & Doyle, A.** 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods, 2nd edition. Academic Press. 288 pp.

Смит Д. и Аньонс А.Х.С. 1994 г. «Сохранение и поддержание живых грибов», 2-е издание. СК, Международный микологический институт. С. 132 / **Smith, D. & Onions, A.H.S.** 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2nd edition. UK, International Mycological Institute. 132 pp.

Уоллер Дж.М., Ленне Дж.М. и Уоллер С.Дж., под ред. 2001 г. «Карманная книга фитопатолога», 3-е издание. Вал-

лингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Waller, J.M., Lenné, J.M. & Waller, S.J.**, eds. 2001. Plant pathologist's pocketbook, 3rd edn. Wallingford, UK, CAB International. 528 pp.

8.4.4 Маркировка и сбор данных

Каждый образец в референтной коллекции фитопатогенов и в гербарии должен быть промаркирован уникальным номером образца. На этикетке или в отдельной базе данных можно указать дополнительную информацию, такую, как указана ниже:

- научные названия растений;
- научные названия патогенов;
- часть растения или субстрат;
- адрес и GPS-координаты места сбора;
- ФИО лица, осуществившего сбор;
- дата сбора;
- ФИО лица, осуществившего идентификацию;
- дата проведения идентификации;
- метод, использованный для идентификации;
- дата сохранения;
- изображение;
- симптомы, наблюдавшиеся на растениях;
- полевые заметки;
- кратковременные свойства (цвет, запах, форма) перед сушкой.

На каждом микроскопическом препарате должны быть наклеены этикетки с уникальным номером образца, из которого он был приготовлен. На этикетке также рекомендуется записать дополнительную информацию, указанную ниже:

- название патогена;
- название растения-хозяина;
- ФИО лица, осуществившего идентификацию;
- дата проведения идентификации.

8.5 Другие референтные коллекции

8.5.1 Прочие референтные материалы

Экстракты нуклеиновых кислот, полученные из вредных организмов, патогенов и зараженного растительного материала могут храниться в морозильной камере с температурой -80°C в качестве генетического референтного материала. ДНК может храниться намного дольше, поскольку она более стабильна, чем РНК. В любом случае, не допускайте многочисленных оттаиваний и заморозок, поскольку это повлияет на качество нуклеиновых кислот.

Сетки, используемые в трансмиссионной электронной микроскопии для визуализации патогенов, могут храниться в качестве референтного материала. Эти сетки могут храниться много лет в сухих и прохладных условиях.

8.5.2 Международные референтные коллекции

Во всех возможных случаях экземпляры сохраненных образцов следует отправлять в международные референтные коллекции. В некоторых странах могут иметься собственные референтные коллекции в музеях или университетах. Институты, желающие располагать референтной коллекцией, должны вести четкую базу данных, легкодоступную для других исследователей внутри страны и за ее пределами.

Примеры международных коллекций членистоногих и их сокращения:

- BMNH – Музей естественной истории, Лондон;
- BPBM – Музей Бишопа, Гонолулу, Гавайи;
- NMNW – Намибийская национальная коллекция насекомых, Виндхук, Намибия (Е. Мараис);
- NMSA – Наталский музей, Питермаритцбург, Квазулу-Натал, Южная Африка (М. Мостовски);

- PCV P – Коллекция Черретти, Верона, Италия;
- SMNS – Государственный музей естествознания, Штутгарт, Германия Х-П. Тшорсниг);
- TAU – Факультет зоологии, Тель-Авивский университет, Израиль (А. Фрайдберг);
- TZC – Коллекция Тео Зегерса, Султ, Нидерланды;
- ZMAN – Зоологический музей, Амстердам, Нидерланды (Б. Бругге);
- NZAC – Новозеландская коллекция членистоногих, Окленд.

Полный список референтных коллекций фитопатогенов и гербариев можно найти на сайте <http://sweetgum.nybg.org/>, который поддерживает Нью-Йоркский ботанический сад.

Несколько дополнительных примеров международных гербариев для микроорганизмов на растениях:

- Сельскохозяйственный колледж Университета Пердью, Гербарии Пердью – Артуровский микологический гербарий (PUR): <https://ag.purdue.edu/btny/Herbaria/Pages/arthur.aspx>;
- Фитопатологический гербарий Корнельского университета (CUP): <http://www.plantpath.cornell.edu/CUPpages/index.html>;
- Фитопатологический гербарий Министерства сырьевой промышленности Нового Южного Уэльса (HERB-DAR): <http://www.dpi.nsw.gov.au/aboutus/services/collections/herbarium>;
- Нью-Йоркский ботанический сад (NYBG): <http://sciweb.nybg.org/science2/Mycology.asp>;
- Научно-исследовательский институт охраны земельных ресурсов. Новозеландская коллекция грибных болезней и болезней растений (PDD): <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/pdd>;

8. Референтные коллекции

- Природные ресурсы Канады. Гербарий лесной фитопатологии Тихоокеанского лесного центра (DAVFP): <http://www.nrcan.gc.ca/forests/research-centres/pfc/13493>;
- Фитопатологический гербарий и коллекция насекомых Министерства сельского, рыбного и лесного хозяйства, Австралия (BRIP): <http://collections.daff.qld.gov.au/web/home.html>;
- **Фарр Д.Ф. и Россман, А.Й.** «Базы данных по грибам». Лаборатория систематической микологии и микробиологии, Научно-исследовательская сельскохозяйственная служба, Министерство сельского хозяйства США / **Farr, D.F. & Rossman, A.Y. Fungal databases.** Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

Полный список коллекций культур доступен на сайте Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) <http://www.wfcc.info>. Во Всемирном каталоге микроорганизмов <http://wdcm.org/> представлена интернет-база данных по микробным штаммам, специально отобраным во многих международных коллекциях.

Некоторые дополнительные примеры международных коллекций культур микроорганизмов на растениях:

- Компания «Agdia»: <http://www.agdia.com/>;
- Американская коллекция типовых культур (ATCC): <http://www.atcc.org/>
- Центральное бюро грибных культур – Коллекции Института грибного разнообразия «CBS-KNAW»: <http://www.cbs.knaw.nl/collections/>;
- Служба микроорганизмов Международного центра сельскохозяйственных исследований: <http://www.cabi.org/services/microbial-services/culture-collection/>;
- Институт им. Лейбница «DSMZ» – Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур: <http://www.dsmz.de/>;
- Международная коллекция микроорганизмов, выделенных из растений (ICMP): <http://www.landcareresearch.co.nz/resources/collections/icmp>
- Японская коллекция микроорганизмов (JCM): <http://www.jcm.riken.jp/>
- LOEWE: http://www.loewe-info.com/index.php?cp_sid=142506643c4&cp_tpl=5501;
- Международный центр сельскохозяйственных исследований. Национальная коллекция культур Соединенного Королевства (UKNCC): <http://www.ukncc.co.uk/>.

8.5.3 Виртуальные референтные коллекции

Некоторые примеры виртуальных коллекций:

- Справочник CABI по защите сельскохозяйственных культур: <http://www.cabi.org/cpc>;
- Справочник CABI по лесному хозяйству: <http://www.cabi.org/fc/>;
- PaDIL – Изображения в высоком качестве и информационные инструменты, разработанные для обеспечения биобезопасности и биоразнообразия: <http://www.padil.gov.au/>;
- Банк знаний «Plantwise»: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/home.aspx>;
- Изображения, связанные с лесным хозяйством: <http://www.forestryimages.org/>;
- Изображения болезней растений, Университет штата Мэн: <http://extension.umaine.edu/ipm/ipddl/plant-disease-images/>;
- AntWeb – самая большая база данных в мире по муравьям, доступная через интернет, с изображениями, учетной информацией по образцам и информацией по естественной истории: http://www.antweb.org/user_guide.jsp.

8.5.4 Референтная коллекция последовательностей ДНК

Существует несколько баз данных по последовательностям.

Все организмы

- База данных по последовательностям «GenBank» НЦБИ (Национального центра биотехнологической информации): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>;
- База данных «BOLDSYSTEMS» (Системы данных «Штрих-коды жизни»): <http://www.boldsystems.org/>;
- База данных «Q-Bank» – Всеобъемлющие базы данных по карантинным вредителям и болезням растений: <http://www.q-bank.eu/>.

Грибы

- База данных «Mycobank»: <http://www.mycobank.org/>;
- База данных «Fusarium-ID»: <http://isolate.fusariumdb.org/index.php>;
- База данных по *Phytophthora*: <http://www.phytophthoradb.org/>;

- База данных «Phytophthora-ID»: <http://phytophthora-id.org/seq-id.html>;
- База геномных данных по *Pythium*: <http://pythium.plantbiology.msu.edu/>.

Бактерии

- База данных по микробам, связанным с растениями и окружающей средой (PAMDB.org): <http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>

Нематоды

- База данных «WormBase» по генетике нематод: <http://www.wormbase.org>

Насекомые

- База данных «BeeBase» по исследованиям пчел: <http://hymenopteragenome.org/beebase/>;
- База данных «FlyBase» по генам и геномам *Drosophila*: <http://flybase.org>;
- База данных «BeetleBase» по генетике, геномике и биологии развития *Tribolium castaneum*: <http://beetlebase.org>.

9. Отчетность

Введение

По завершении диагностической работы сведения об идентификации должны быть представлены заявителю в согласованные временные сроки. Важно, чтобы другой компетентный штатный сотрудник проверил окончательный отчет до его отправки заявителю во избежание ошибок.

Ответы по поводу образцов должны:

- быть настолько краткими, насколько это возможно;
- формулироваться с осторожностью;
- предоставлять информацию, запрошенную заявителем, во всех возможных случаях;
- не превышать уровня компетенции штатного сотрудника;
- не превышать уровня официальности идентификации.

Окончательный отчет должен содержать:

- всю информацию о заявителе;
- всю информацию об образце;
- все проведенные анализы;
- научное название вредителя и болезни в соответствии с принятым форматом, например, для энтомологии – *Род вид* [ОТРЯД: Семейство];
- подписи специалистов, проводивших идентификацию;
- сведения о найденных дополнительных образцах (если таковые имеются);
- и, если применимо:
 - состояние: живой/погибший;
 - статус вредного организма/ статус регулирования;
 - количество организмов и стадии их развития;
 - дата и время ответа;
 - напечатанные ФИО специалистов, проводивших идентификацию;
 - расценки.

Важно представить доказательство того, что заявителю был отправлен ответ, в частности:

- что было отправлено;
- как было отправлено;
- когда было отправлено;
- кто отправил.

Промежуточный отчет

Рекомендуется отправить промежуточный отчет, если идентификацию невозможно завершить в сроки, согласованные для предоставления отчета.

Правки в окончательном отчете

В случаях, когда содержание отчета отсутствует или является неверным (например, идентификация организмов или результаты анализов – неправильные), исправленный отчет должен быть отправлен заявителю. Повторно подготовьте окончательный отчет и позаботьтесь о том, чтобы в этот новый отчет было включено дополнительное сообщение, констатирующее, что этот новый отчет заменяет Отчет номер: XXXXXX или что он заменяет отчет, выданный дд/мм/гггг.

Обнаружение нового организма

Обязанностью сотрудников, осуществляющих диагностику, является обеспечение того, чтобы руководство лаборатории было уведомлено в кратчайшие сроки о следующих категориях идентификации:

- идентификация любого организма, который, как предполагается, является новым для страны;
- любая идентификация нежелательного организма, которая ожидает подтверждения;
- любое значимое обнаружение организма, при выявлении которого необходимо принимать соответствующие меры.

9. Отчетность

Такая идентификация новых вредных организмов должна быть подтверждена другим ученым либо экспертом,

признанным на национальном или международном уровне.

10. Дальнейшие действия с образцом

Введение

Диагностической лаборатории необходимо рассмотреть наилучшие способы того, что делать с образцом, после того как он был полностью проанализирован, и финальный отчет по диагностике был подготовлен.

Образцы могут быть утилизированы надлежащим образом в соответствии с риском, который они представляют для биобезопасности, или сохранены для использования в будущем.

10.1 Утилизация

Перед тем, как будет принято решение об утилизации образца, лаборатория должна принять во внимание необходимость его сохранения в качестве документального подтверждения. Смотрите раздел 2.5 МСФМ 27 («Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов») для получения дополнительного руководства в этой сфере. Образец должен также рассматриваться с точки зрения его ценности для будущего использования, как описано ниже.

Если считается, что образец не будет иметь никакой ценности в дальнейшем, его следует утилизировать способом, который сделает его безопасным с точки зрения фитосанитарного риска. В лаборатории для этого должны иметься помещения, как описано в Главе 2.

10.2 Сохранение образца или препарата

Лаборатория может сделать выбор в пользу сохранения образцов и их препаратов по многим причинам.

В контексте фитосанитарных вопросов сохранение образца может быть важным для того, чтобы обеспечить до-

казательство для случаев несоответствия, юридических действий, возникающих в результате фитосанитарного действия или торгового спора, смотрите раздел 2.5 МСФМ 27 («Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов»).

Образцы также могут сохраняться ввиду их диагностической ценности в качестве референтных образцов, либо они могут представлять собой первый зарегистрированный случай обнаружения вредного организма в зоне. В последнем случае доказательство может использоваться НОКЗР в ее официальном статусе для таких целей, как оповещение о вредных организмах (МСФМ 17), установление фитосанитарного статуса страны (МСФМ 8) и свободных зон (МСФМ 4).

Если образец или препарат обладает хорошей диагностической справочной ценностью, его можно сохранить в лаборатории или в другой коллекции в качестве вспомогательного материала для будущей диагностики или обучения. Критерии выбора дополнительных референтных образцов включают в себя, но не ограничиваются следующими критериями:

- новый вид в коллекции;
- образец в лучшем состоянии, чем образцы, уже находящиеся в коллекции;
- он является новым обнаружением по стране происхождения;
- для учебного материала, например, из проектов;
- для библиотеки фотоизображений.

Больше подробной информации о сохранении образцов и препаратов для этих целей можно найти в Главе 8.



РАЗДЕЛ 3

Другие источники информации

11. Библиография

Введение

Интернет обеспечивает доступ к обширному объему информации, укрепляющей фундамент диагностики и содействующей расширению знаний. В разделе 5.5 приводится информация о ключевых справочных материалах по вредным для растений организмам, а также по центрам передового опыта и экспертным базам данных.

Список библиографических названий

Барнет Х.Л. и Хантер Б.Б. 1972 г. «Иллюстрированный журнал родов несовершенных грибов», 3-е издание, Миннеаполис, Миннесота. Издательство «Burgess» / **Barnet, H.L. & Hunter, B.B.** 1972. Illustrated genera of imperfect fungi, 3rd edn. Minneapolis, MN, Burgess.

Бунхэм Н., Глоувер Р., Томлинсон Дж. и Мамфорд Р. 2008 г. «Использование стандартных платформенных технологий для выявления и идентификации патогенов растений». «Европейский журнал фитопатологии», 121: 355-363 / **Boonham, N., Glover, R., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 355–363. DOI: 10.1007/978-1-4020-8780-6_15.

Бунхэм Н., Томлинсон Дж. и Мамфорд Р. 2007 г. «Микрокомплексы для быстрой идентификации вирусов растений» Журнал «Ежегодный обзор фитопатологии», 45: 307–328 / **Boonham, N., Tomlinson, J. & Mumford, R.** 2007. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 307–328. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094349.

Брэдбери Дж.Ф. 1985 г. «Руководство по фитопатогенным бактериям».

Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 332 / **Bradbury, J.F.** 1985. Guide to plant pathogenic bacteria. Wallingford, UK, CAB International. 332 pp.

CABI и ЕОКЗР. 1997 г. «Карантинные для Европы вредные организмы», 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований и Париж, Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений. С. 1425 / **CABI & EPPO.** 1997. Quarantine pests for Europe, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International and Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1425 pp.

Кэннон Р.Дж.К., Пембертон А.В. и Барлет П.В. 1999 г. «Надлежащие меры по ликвидации вредных организмов, не входящих в перечень». Бюллетень ЕОКЗР, 29: 29-36 / **Cannon, R.J.P.J.C., Pemberton, A.W. & Bartlett, P.W.** 1999. Appropriate measures for the eradication of unlisted pests. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, 29: 29–36.

Кулен В.А. и Д'Эрде К.Дж. 1972 г. «Метод количественного выделения нематод из ткани растений». Гент, Бельгия, Министерство сельского хозяйства, Государственный сельскохозяйственный исследовательский центр. С. 77 / **Coolen, W.A. & D'Herde, C.J.** 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.

Декрэмер В. и Хант Д.Дж. 2006 г. «Структура и классификация» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. 2013 г. «Фитонематология». 1-е издание. стр. 3-32. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. / **Decraemer, W. & Hunt, D.J.** 2006. Structure

11. Библиография

& classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 3–32. Wallingford, UK, CAB International.

Эллис М.Б. и Эллис Дж.П. 1997 г. «Микрогрибы на наземных растениях: справочник по идентификации». Слау, СК. Издательство «Richmond Publishing». С. 868 / **Ellis, M.B. & Ellis, J.P.** 1997 г. *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough, UK, Richmond Publishing. 868 pp.

ЕОКЗР. 2013а. Диагностика: PM 7/119 (1) «Выделение нематод» / Diagnostic: PM 7/119 (1) *Nematode extraction*. Бюллетень ЕОКЗР, 43: 471–495.

ЕОКЗР. 2013б. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов: иллюстрированный глоссарий морфологических терминов в нематологии / *Diagnostic protocols for regulated pests: pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Технический документ ЕОКЗР No. 1056 (rev. 4). Париж, Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений. Доступно по ссылке: http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Эрвин Д.К. и Рибейро О.К. 1996 г. «Болезни, вызываемые по всему миру». Сен-Пол, Миннесота. Издательство «APS Press», Американское фитопатологическое общество. С.592 / **Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K.** 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul, MN, APS Press, American Phytopathological Society. 592 pp.

Фенвик Д.В. 1940 г. «Методы извлечения из почвы и подсчета цист *Heterodera schachtii*». «Журнал по гельминтологии», 18: 155–172 / **Fenwick, D.W.** 1940. *Methods for the recovery and counting of cysts of Heterodera schachtii from soil*. *Journal of Helminthology*, 18: 155–172.

Флегг Дж.Дж.М. и Хупер Д.Дж. 1970 г. «Выделение свободноживущих

стадий из почвы» в Саузи Дж.Ф., под ред. «Лабораторные методы работы с растительными и почвенными нематодами». стр. 5–22. Технический бюллетень 2. Лондон, Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продовольствия / **Flegg, J.J.M & Hooper, D.J.** 1970. *Extraction of free-living stages from soil*. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, pp. 5–22. Technical Bulletin 2. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Хокланд С., Инсерра Р.Н., Миллар Л. и Леман П.С. 2006 г. «Международное здоровье растений – применение законодательства на практике» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. 2013 г. «Фитонематология». 1-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. с. 327–345 / **Hockland, S., Inserra, R.N., Millar, L. & Lehman, P.S.** 2006. *International plant health – putting legislation into practice*. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 1st edn, pp. 327–345. Wallingford, UK, CAB International.

Хупер Д.Дж. и Эванс К. 1993 г. «Выделение, идентификация и борьба с фитопаразитическими нематодами» в Эванс К., Траджилл Д.М. и Вебстер Дж.М., под ред. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве умеренных широт», с. 1–60. Валлингфорд, Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Hooper, D.J. & Evans, K.** 1993. *Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes*. In K. Evans, D.M. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 1–60. Wallingford, UK, CAB International.

Хупер Д.Дж. 1986 г. «Выделение нематод из растительной ткани» в Саузи Дж.Ф., под ред. «Лабораторные методы работы с растительными и почвенными нематодами». Справочник 402, 6-е изд., стр. 51–58, Лондон, Министерство сельского хозяйства, рыболовства и продо-

вольствия / **Hooper, D. J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, ed. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Хупер Д.Дж., Халлманн Дж. и Субботин С.А. 2005 г. «Методы выделения, обработки и выявления растительных и почвенных нематод» в Люк М., Сикора Р.А. и Бридж Дж, под ред. 2005 г. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве субтропиков и тропиков». 2-е издание, с. 53-86. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / **Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CAB International.

Международный микологический институт «Описание грибов и бактерий». Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований / IMI descriptions of fungi and bacteria. Wallingford, UK, CAB International: <http://www.cabi.org/dfb/> (последний доступ осуществлен 16 сентября 2015 г.).

Янсе Дж.Д. 2010 г. «Фитобактериология: принципы и практика». Валлингфорд, СК, Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 368 / **Janse, J.D.** 2010. Phytobacteriology: principles and practice. Wallingford, UK, CAB International. 368 pp.

Леллиот Р.А. и Стед Д.Е. «Методы диагностики бактериальных болезней растений». Оксфорд, Издательство «Wiley». С. 224 / **Lelliot, R.P.A. & Stead, D.E.** 1991. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford, Wiley. 224 pp.

Лесли Дж.Ф. и Саммерелл Б.А. 2006 г. «Руководство для лаборато-

рий по *Fusarium*». Оксфорд. Издательство «Blackwell». С. 388 / **Leslie, J.F. & Summerell, B.A.** 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Oxford, Blackwell. 388 pp.

Люк М., Сикора Р.А. и Бридж Дж, под ред. 2005 г. «Фитопаразитические нематоды в сельском хозяйстве субтропиков и тропиков». 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 896 / **Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J.,** eds. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 896 pp.

Манзанийа-Лопес Р.Х. и Марбан-Мандоза Н., под ред. 2012 г. «Практическая фитонематология». Мехико, Главная сельскохозяйственная библиотека, издательство «Grupo Mundi-Prensa». С. 883 / **Manzanilla-López, R.H. & Marbán-Mendoza, N.,** eds. 2012. Practical plant nematology. Mexico City, Biblioteca Básica de Agricultura, Grupo Mundi-Prensa. 883 pp.

Монгер В.А., Аликай Т., Ндунгуру Дж., Кинюа З.М., Поттс М., Ридер Р.Х., Миано Д.В., Адамс И.П., Бунхэм Н., Гловувер Р.Х. и Смит Дж. 2010 г. «Полная последовательность генома танзанийского штамма вируса коричневой полосатости маниоки и сравнение с последовательностью угандийского штамма». Журнал «Архивы вирусологии», 155: 429-433 / **Monger, W.A., Alicai, T., Ndunguru, J., Kinyua, Z. M., Potts, M., Reeder, R.H., Miano, D.W., Adams, I.P., Boonham, N., Glover, R.H. & Smith, J.** 2010. The complete genome sequence of the Tanzanian strain of Cassava brown streak virus and comparison with the Ugandan strain sequence. Archives of Virology, 155: 429–433. DOI:10.1007/s00705-009-0581-8.

Сейнхорст Дж.В. 1962 г. «Об умерщвлении, фиксации и переносе нематод в глицерин». Журнал «Нематология», 8: 29–32 / **Seinhorst, J.W.** 1962. On the killing, fixing and transferring to glycerin of nematodes. Nematologica, 8: 29–32.

11. Библиография

Сиддики М.Р. 2000 г. «Паразиты растений и насекомых, принадлежащие к отряду Tylenchida». 2-е издание. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. С. 864 / **Siddiqi, M.R.** 2000. Tylenchida parasites of plants and insects, 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International. 864 pp.

Смит Дж.Дж., Вааге Дж., Вудхолл Дж.В., Бишоп С.Дж. и Спенс Н.Дж. 2008 г. «Трудности предоставления фитосанитарных диагностических услуг в Африке». «Европейский журнал фитопатологии», 121: 365–375 / **Smith, J.J., Waage, J., Woodhall, J.W., Bishop, S.J. & Spence, N.J.** 2008. The challenge of providing plant pest diagnostic services for Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 365–375.

Сноудон А.Л. 2010а. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 1 «Общее введение и фрукты». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 320 / **Snowdon, A.L.** 2010а. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1 General introduction and fruits. Boca Raton, CRC Press. 320 pp.

Сноудон А.Л. 2010б. «Цветной атлас болезней и патологий фруктов и овощей после сбора урожая». Том 2 «Овощи». Бока Ратон, Издательство «CRC Press». С. 416 / **Snowdon, A.L.** 2010б. A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 2 Vegetables. Boca Raton, CRC Press. 416 pp.

Тарджан А.К. 1967 г. «Влияние температуры и перекиси водорода на выделение роющих нематод из корней цитрусовых». Журнал «Вестник болезней растений», 51: 1024–1028 / **Tarjan, A.C.** 1967. Influence of temperature and hydrogen peroxide on the extraction of burrowing nematodes from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 51: 1024–1028.

Тарджан А.К. 1972 г. «Исследования по выделению цитрусовой нематоды

Tylenchulus semipenetrans из корней цитрусовых». Журнал «Вестник болезней растений», 56: 186–188 / **Tarjan, A.C.** 1972. Observations on extracting citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, from citrus roots. *Plant Disease Reporter*, 56: 186–188.

Томлинсон Дж. и Бунхэм Н. 2008 г. «Потенциал использования LAMP для выявления фитопатогенов». Журнал «Обзоры Международного центра сельскохозяйственных исследований: Перспективы в сельском хозяйстве, ветеринарии, диетологии и природных ресурсах», 3: 1–7 / **Tomlinson, J. & Boonham, N.** 2008. Potential of LAMP for detection of plant pathogens. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3: 1–7.

Веллер С.А., Аспин А. и Стед Д.Е. 2008 г. «Классификация и идентификация бактерий, связанных с растениями, посредством анализа профиля жирных кислот». Бюллетень ЕОКЗР, 06/2008; 30 (3–4): с. 375–380 / **Weller, S.A., Aspin, A. & Stead, D.E.** 2008. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *EPPO Bulletin*, 06/2008; 30(3–4): 375–380. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00914.x.

Вейгерс А.Л. 2003 г. «Достоверные методы: обеспечение качества разработки аналитических методов, валидация, утверждение и передача ветеринарным испытательным лабораториям». Журнал «Исследования по ветеринарной диагностике», 15(4): 303–310 / **Weigers, A.L.** 2003. Valid methods: the quality assurance of test method development, validation, approval, and transfer for veterinary testing laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15(4): 303–310.

Винфильд А.Л., Энфильд М.А. и Форманн Дж.Х. 1987 г. «Использование аппарата для отмучивания для извлечения цистообразующих нематод и других

мелких беспозвоночных из почвенных образцов». Журнал «Анналы прикладной биологии», 111: 223–231 / **Winfield, A.L., Enfield, M.A. & Foremann, J.H.** 1987. A column elutriator for extracting cyst

nematodes and other small invertebrates from soil samples. *Annals of Applied Biology*, 111: 223–231. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1987.tb01449.x.

Благодарности

Рисунки, диаграммы и фотографии, использованные в данном руководстве, были созданы или предоставлены Лабораторией здоровья растений и окружающей среды (ЛЗРОС), Новая Зеландия, и Компанией «Fera Science Ltd» (Fera), Соединенное Королевство, если не указано иное.

Рисунки

Страница xii: Оливер Джеффри / Oliver Jeffrey, Международный институт тропического сельского хозяйства (IITA) (Лицензия компании «Creative Commons» для некоммерческого использования – NonCommercial 2.0)

Страница 96: Институт им. Ю. Кюна (JKI), Германия.

Страница 124, рисунок 30: Марк Стэнвей / Mark Stanaway

Страница 125: (слева) Скайд Ванг / Skyid Wang; (в центре) Компания «Green Ink».

Страница 135, оба изображения: Форест и Ким Старр / Forest and Kim Starr, Компания «Starr Environmental», Bugwood.org (Лицензия компании «Creative Commons» – Attribution 2.0).

Страница 136, рисунок 35: автор Notafly, онлайн-ресурс «Wikimedia Commons» (Лицензия компании «Creative Commons» - Share Alike 3.0 Unported).

Страница 136, рисунок 36, оба изображения: Форест и Ким Старр / Forest and Kim Starr, Компания «Starr Environmental», Bugwood.org (Лицензия компании «Creative Commons» – Attribution 2.0).

Страница 136, рисунок 37: автор Notafly, онлайн-ресурс «Wikimedia Commons» (Лицензия компании «Creative Commons» - Share Alike 3.0 Unported).

Страница 137, оба изображения: Библиотека изображений вредителей и болезней, Bugwood.org (Лицензия компании «Creative Commons» для некоммерческого использования в США – Attribution-Noncommercial 3.0 United States License).

Иллюстрации

Страница 99: репродукция из работы Декрэмера В. и Ханта Д.Дж. 2013 г. «Таксономия, систематика и основные роды: структура и классификация» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. «Фитонематология». 2-е издание, стр. 3-39. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. Опубликовано с разрешения авторов [А. из работы Куманса (1985 г.), В. адаптировано из работы Эндо (1980 г.), С. из работы Маафи и Декрэмера (2002 г.)] / Decraemer, W. & Hunt, D.J. 2013. Taxonomy, systematics and principal genera: structure and classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. Plant nematology, 2nd edn, 3–39. Wallingford, UK: CAB International, with permission. [A. From Coomans (1985), B. Adapted from Endo (1980), C. From Maafi and Decraemer (2002).]

Страница 100: репродукция из работы Декрэмера В. и Ханта Д.Дж. 2013 г. «Таксономия, систематика и основные роды: структура и классификация» в Перри Р.Н. и Моенс М., под ред. «Фитонематология». 2-е издание, стр. 3-39. Валлингфорд, СК. Международный центр сельскохозяйственных исследований. Опубликовано с разрешения авторов [А: из работы Декрэмера и др (1998 г.). В: из работы Декрэмера и Дэ Вэле (1981 г.). С: из

работы Сиддики (1986 г.). D: из работы Шеперда и др. (1980 г.)] / Decraemer, W. & Hunt, D.J. 2013. Taxonomy, systematics and principal genera: structure and classification. In R.N. Perry & M. Moens, eds. *Plant nematology*, 2nd edn, 3–39. Wallingford, UK: CAB International, with permission. [A: From Decraemer et al. (1998). B: From Decraemer and De Waele (1981). C: From Siddiqi (1986). D: From Shepherd et al. (1980).]



РУКОВОДСТВО
по оказанию фитосанитарных диагностических услуг

Корректор:
Татьяна Семенова

Верстка и дизайн:
Тимур Мадibaев

Формат 210x297 мм.
Гарнитура «Muglad Pro».
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 500
Заказ №018-2016



МККЗР

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР) – это международное соглашение по здоровью растений. Цель МККЗР – защита культивируемых и дикорастущих растений путем предотвращения интродукции и распространения вредных организмов. Масштаб международных поездок и торговли велик, как никогда ранее. Вместе с людьми и товарами по миру перемещаются организмы, представляющие риски для растений.

Организация по карантину и защите растений

Число договаривающихся сторон, подписавших Конвенцию, превышает 181. Каждая договаривающаяся сторона имеет свою Национальную организацию по карантину и защите растений (НОКЗР) и официальный контактный пункт МККЗР. Для координации НОКЗР в различных регионах было создано десять Региональных организаций по карантину и защите растений (РОКЗР). МККЗР поддерживает связи с соответствующими международными организациями с целью развития регионального и национального потенциала. Секретариат финансируется Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединённых Наций (ФАО).



Международная конвенция по карантину и защите растений

Viale delle Terme di Caracalla, 00153, Рим, Италия
Тел.: +39 06 5705 4812 – Факс: +39 06 5705 4819
Эл. почта: ippc@fao.org – Сайт: <http://www.ippc.int>

Секретариат МККЗР финансируется ФАО и расположен в ее штаб-квартире



Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединённых Наций