



**МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
СТАНДАРТ**

**ГОСТ**  
*(проект,  
RU,  
первая  
редакция)*

---

**КАРАНТИН РАСТЕНИЙ**  
**Методы выявления и идентификации**  
**возбудителя ожога плодовых деревьев**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия*

## Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и в настоящем стандарте.

1 РАЗРАБОТАН федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Госпотребстандарт Украины

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным органам по стандартизации этих государств.

## Содержание

- 1 Область применения
- 2 Нормативные ссылки
- 3 Термины и определения
- 4 Требования к аппаратуре и материалам
- 5 Правила отбора проб и подготовки образцов
  - 5.1 Общие правила
  - 5.2 Правила отбора образцов от растений с симптомами
  - 5.3 Пробоподготовка образцов с симптомами
  - 5.4 Правила отбора бессимптомных образцов
  - 5.5 Пробоподготовка бессимптомных образцов
  - 5.6 Экстракция бактерий методом встряхивания в буфере
  - 5.7 Экстракция бактерий методом гомогенизации образца
  - 5.8 Обогащение образца
    - 5.8.1 Обогащение на средах
    - 5.8.2 Обогащение на незрелых плодах
- 6 Методы выявления с использованием отборочных тестов
  - 6.1 Иммунофлуоресцентный анализ
    - 6.1.1 Общие положения
    - 6.1.2 Иммунофлуоресцентный анализ с разведением сыворотки
    - 6.1.3 Иммунофлуоресцентный анализ с разведением экстракта образца
    - 6.1.4 Интерпретация результатов иммунофлуоресцентного анализа
  - 6.2 Анализ на основе полимеразной цепной реакции
    - 6.2.1 Общие положения
    - 6.2.2 Выделение ДНК
    - 6.2.3 Классический анализ на основе полимеразной цепной реакции
    - 6.2.4 Гнездовой анализ на основе полимеразной цепной реакции
    - 6.2.5 Анализ ПЦР-продукта методом электрофореза
    - 6.2.6 Интерпретация результатов анализа на основе полимеразной цепной реакции с детекцией методом электрофореза
    - 6.2.7 Анализ на основе полимеразной цепной реакции с использованием меченых зондов
      - 6.2.7.1 Флуоресцентный анализ на основе полимеразной цепной реакции с детекцией по конечной точке

6.2.7.2 Флуоресцентный анализ на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени

6.2.8 Анализ на основе полимеразной цепной реакции с предварительным подрачиванием на твердой питательной среде

6.3 Иммуноферментный анализ

6.3.1 Иммуноферментный анализ прямого отпечатка ткани

6.3.2 Интерпретация результатов иммуноферментного анализа прямого отпечатка ткани

6.3.3 Иммуноферментный анализ с обогащенным образцом

6.3.4 Интерпретация результатов иммуноферментного анализа с обогащенным образцом

6.3.5 Непрямой иммуноферментный анализ

6.4 Биологический анализ

7 Методы изоляции патогена

7.1 Прямая изоляция

7.2 Изоляция с обогащением

8 Методы идентификации

8.1 Биохимическая идентификация

8.1.1 Общие положения

8.1.2 Классические биохимические тесты

8.1.3 Биохимические характеристики по системе API

8.1.4 Автоматическая идентификационная система Biolog

8.2 Серологическая идентификация

8.2.1 Иммунофлуоресцентный анализ

8.2.2 Иммуноферментный анализ

8.3 Молекулярная идентификация

8.3.1 Пробоподготовка образцов для анализов на основе полимеразной цепной реакции

8.3.2 Анализы на основе полимеразной цепной реакции с детекцией методом электрофореза

8.3.3 Анализы на основе полимеразной цепной реакции с использованием меченых зондов

8.3.4 Секвенирование последовательностей ДНК

8.4 Анализ жирных кислот

8.5 Тесты на растениях

ГОСТ (проект RU, первая редакция)

8.5.1 Реакция гиперчувствительности на табаке

8.5.2 Тест на патогенность

8.6 Условия хранения

Приложение А (справочное) Общие сведения о возбудителе бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*

Приложение Б (рекомендуемое) Порядок проведения обследований поражаемых культур

Приложение В (справочное) Симптомы поражения возбудителем бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*

Приложение Г (справочное) Иллюстрации к симптомам заражения возбудителем бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*

Приложение Д (справочное) Буферные растворы, используемые при анализах

Приложение Е (рекомендуемое) Схема выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora* в образцах растений с симптомами

Приложение Ж (рекомендуемое) Схема выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora* в бессимптомных образцах

Приложение И (справочное) Питательные среды

Приложение К (справочное) Приготовление разведений антител для иммунофлуоресцентного анализа

# МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

---

## КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

### Методы выявления и идентификации возбудителя ожога плодовых деревьев

---

#### 1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (далее – возбудитель бактериального ожога) в плодовых и декоративных культурах семейства розоцветных.

**Примечание** – Общие сведения о возбудителе бактериального ожога плодовых деревьев приведены в приложении А.

#### 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте организации использованы ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2768–84 Ацетон технический. Технические условия

ГОСТ 6259–75 Реактивы. Глицерин. Технические условия

ГОСТ 6672–75 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9285–78 Калия гидрат окиси технический. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 20562–75 Карантин растений. Термины и определения

ГОСТ 21240–89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и

ГОСТ (проект RU, первая редакция)

методы испытаний

ГОСТ 21241–89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21507–81 Защита растений. Термины и определения

ГОСТ 23932–90 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

Часть 1. Общие требования

**П р и м е ч а н и е** – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт изменен, то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться измененным стандартом, а при замене на другой стандарт – стандартом, действующим вместо настоящего стандарта. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Термины и определения

В настоящем стандарте организации применены термины по ГОСТ 20562 и ГОСТ 21507, а также следующие термины в соответствии с определениями:

**3.1 агглютинация:** Склеивание и выпадение в осадок из однородной взвеси бактерий, эритроцитов и других клеток, несущих антигены, под действием специфических антител агглютининов.

**3.2 ампликон:** Участок ДНК, копируемый в процессе амплификации.

**3.3 амплификация:** Избирательное копирование определенного участка ДНК.

**3.4 буфер:** Водный раствор специально подобранных химических веществ (в микробиологии чаще всего калиевых и/или натриевых солей ортофосфорной кислоты), значения pH которого не меняется при добавлении небольших количеств других веществ, а также при концентрировании или разбавлении.

**3.5 изолят:** Чистая культура микроорганизма, выделенная на питательную среду.

**3.6 изоляция:** Выделение чистой культуры микроорганизма на питательную среду.



**3.7 контаминация:** Загрязнение образца генетическим материалом из других образцов или ампликонами после проведения предыдущих анализов на основе полимеразной цепной реакции.

**3.8 конъюгат:** Применительно к серологическим методам диагностики – специфические антитела, химически связанные с определенным веществом, позволяющим непосредственно или при соответствующей обработке визуализировать факт взаимодействия антигена и антитела.

**3.9 кросс-контаминация:** Загрязнение образца генетическим материалом из других образцов.

**3.10 мацерация:** Вымачивание, разъедание, под влиянием которого растительная ткань распадается на отдельные клетки.

**3.11 мацерат:** Субстанция, образующаяся в результате мацерации.

**3.12 мембрана:** Тонкая пленка, главная функция которой – разделять различные субстанции и избирательно проводить их компоненты через себя.

**3.13 преципитат:** Твердая фаза (осадок), образовавшаяся в результате реакции преципитации.

**3.14 преципитация:** Осаждение, реакция осаждения комплекса антигена с антителом.

**3.15 сейф-пакет:** герметично заклеивающийся пакет, предназначенный для обеспечения сохранности образцов при их транспортировке.

**3.16 супернатант:** Жидкость, находящаяся над осадком.

**3.17 обогащение образца:** Увеличение концентрации бактериальных клеток.

**3.18 флуоресценция:** Способность вещества преобразовывать более коротковолновое излучение в более длинноволновое (например, ультрафиолетовое излучение в видимый свет).

**3.19 экссудат:** Жидкость, богатая белком и бактериальными клетками, просочившаяся на поверхность органа растения или во внутренние полости.

**3.20 экстракт:** Суспензия бактерий, выделенных из растительного материала в соответствующий раствор (буфер).

**3.21 экстракция:** Процесс приготовления экстракта.

## **4 Требования к аппаратуре и материалам**

**4.1** Для проведения анализов по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога применяют следующую аппаратуру и материалы:

ГОСТ (проект RU, первая редакция)

- микроскоп люминесцентный;
- микроскоп бинокулярный;
- пробирки по ГОСТ 1770 и ГОСТ 23932;
- чашки Петри по ГОСТ 25336;
- шпатель;
- скальпель медицинский по ГОСТ 21240;
- иглы препаровальные;
- пинцет медицинский по ГОСТ 21241;
- стекло покровное для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- глицерин по ГОСТ 6259;
- колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 25; 50; 100; 200; 1000 мл;
- пробирку для центрифугирования при 10000 g на 50 мл;
- шейкер ротационный;
- микроцентрифуга в функции встряхивания;
- ацетон технический по ГОСТ 2768;
- наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 200; 1000 мкл; 10 мл;
- амплификатор под микроцентрифужные пробирки со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1,5 °C/с;
- микропробирки пластиковые с крышкой типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 мл;
- масло минеральное;
- агарозу;
- этидий бромистый, х.ч.;
- дезинфицирующий раствор;
- смеси реакционные для амплификации согласно наборам производителя.

4.2 Допускается применение аналогичных средств измерения с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками не хуже, а реактивов по качеству не ниже указанных в 4.1.

## 5 Правила отбора проб и подготовки образцов

### 5.1 Общие правила

5.1.1 При проведении сплошных обследований в плодовых питомниках образцы для выявления возбудителя бактериального ожога отбирают согласно стандарту Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (далее – ЕОКЗР) РМ 3/40\*.

Примечание – Порядок проведения обследований поражаемых культур приведен в приложении Б.

5.1.1.1 Образец состоит из 100 веточек длиной 10 см.

5.1.1.2 В питомнике, имеющем только один сорт, для анализа берут по одной ветке длиной 10 см от каждого из 100 деревьев.

5.1.1.3 Если выращивают два сорта, то для образца берут соответственно по 50 веток на сорт.

5.1.1.4 Если выращивают три или более сортов, то берут по 30 веток на сорт.

5.1.2 Необходимо принимать меры против перезаражения образцов при отборе и в процессе экстракции возбудителя в лаборатории.

5.1.3 Образцы для диагностики ожога плодовых на растениях с симптомами должны содержать цветки, побеги, листья, завязи (если возможно, с некрозами и экссудатом) или красновато-коричневую подкоровую ткань после отделения коры в местах язв на ветвях различного порядка, штамба или корневой шейки.

5.1.4 Пробоподготовку (отбор лабораторной пробы и экстракцию возбудителя) проводят непосредственно после отбора образцов или хранят при температуре от 4 °С до 8 °С.

5.1.5 После отбора лабораторной пробы образцы хранят в холодильной камере на протяжении нескольких недель для повторного выделения в случае необходимости.

5.1.6 Для пересылки образцов используют фильтровальную бумагу.

Примечание – Такие материалы как пергамент, кальку или полиэтилен не используют, так как при транспортировке в них создается повышенная влажность, что ведет к быстрому развитию сапрофитных грибов и загниванию растений.

### 5.2 Правила отбора образцов от растений с симптомами

5.2.1 Для анализа берут образцы растений, имеющих наиболее типичные признаки заболевания (см. приложения В и Г) и отражающие общую картину болезни. Предпочтительнее брать образцы с заболеванием в ранней стадии, так как на более

---

\* РМ 3/40 (1) Phytosanitary procedures. *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods.

поздних стадиях развитие болезни сопровождается разрушением тканей, в которых накапливается сапрофитная микрофлора. С одного дерева может быть взято, в зависимости от характера поражения, несколько образцов.

5.2.2 При отборе образца для анализа вырезают пораженные части растения с обязательным захватом здоровой ткани, чтобы была хорошо заметна граница между здоровой и пораженной тканью.

5.2.3 Один образец может состоять из разных частей растения, отобранных с одного дерева. Каждый образец должен содержать не менее пяти экземпляров частей растений с симптомами заболевания (пораженные соцветия, пораженные завязи, молодые побеги, срезы пораженной ткани веток и штамбов), которые помещают в сейф-пакет вместе с этикеткой с наименованием культуры, сорта, возраста, места, времени сбора и указанием типа поражения.

### **5.3 Пробоподготовка образцов с симптомами**

5.3.1 Пробы берут со здоровой на вид ткани на границе видимого поражения с минимальным (до 1 мм) захватом некротизированной ткани, чтобы избежать попадания в экстракт большого количества сопутствующих микроорганизмов. Необходимо выбирать листья с поражением жилок, но не сильно некротизированные, свежие пораженные цветки с цветоножками, плоды, побеги, а также пораженную кору с более старых ветвей или ствола.

5.3.2 Части растения с хорошо заметными свежими симптомами отбирают, если возможно, с экссудатом.

5.3.3 Скальпелем или ножницами отрезают небольшие кусочки ткани с каждого органа. Экстракцию проводят методами, изложенными в 5.6 и 5.7.

5.3.4 Экссудат отбирают отдельно, суспендируя его в небольшом количестве стерильной воды или буферного раствора, пригодного для проведения соответствующего анализа.

**Примечание** – Информация о буферных растворах, используемых при анализах, приведена в приложении Д.

5.3.5 Выявление и идентификацию возбудителя бактериального ожога в образцах растений с симптомами заражения проводят по схеме, приведенной в приложении Е.

### **5.4 Правила отбора бессимптомных образцов**

5.4.1 В период благоприятных для развития ожога погодных условий, с конца весны до начала осени, отбирают цветки, листья, побеги, завязи, фрагменты ветвей. Особое внимание уделяют побегам с плодовыми веточками, а также одно-двухлетним побегам с признаками усыхания вершины (остатки усохшего побега, рост молодого побега из

боковой почки). При проведении обследований следует производить статистически репрезентативную выборку.

5.4.2 Образцы от партий посадочного материала отбирают случайным образом, тогда как сады и питомники обследуют по схеме, указанной в приложении Б.

5.4.3 Выявление и идентификацию возбудителя бактериального ожога в бессимптомных образцах проводят по схеме, приведенной в приложении Ж.

### **5.5 Пробоподготовка бессимптомных образцов**

Пробоподготовку бессимптомных образцов, содержащих листья, побеги, цветки, почки, проводят методами, изложенными в 5.6 и 5.7.

### **5.6 Экстракция бактерий методом встряхивания в буфере**

5.6.1 Пробы помещают в подходящий контейнер (например, пластиковый пакет 10 × 15 или 15 × 20 см, или одноразовый пластиковый стакан с крышкой на 150 мл, или колбу Эрленмейера на 200 мл), добавляют 30 мл фосфатного буфера (далее – РВ) или фосфатно-солевого буфера (далее – PBS). В случае, если не предполагается использовать центрифугирование, объем буфера может быть уменьшен, если количество растительной ткани невелико.

5.6.2 Контейнер помещают на ротационный шейкер, затем инкубируют со скоростью 200 об/мин от 1,0 до 1,5 ч. Для образцов с симптомами можно сразу отобрать соответствующее количество мацерата для проведения отборочного анализа на основе полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР-анализа) (см. 6.2) или обогащения (см.5.8). Для бессимптомных образцов использовать суспензию, концентрированную методом центрифугирования.

**П р и м е ч а н и е** – Пробу также можно заморозить при минус 18 °С или при минус 80 °С с добавлением одной-двух капель глицерина на 1 мл пробы.

5.6.3 Мацерат аккуратно сливают либо непосредственно в центрифужную пробирку на 50 мл, оставив мякоть в контейнере или пакете, либо предварительно профильтровывают через фильтровальную бумагу, затем центрифугируют 10 мин с ускорением 8000 g или 15 мин с ускорением 7000 g при температуре ниже 10 °С.

5.6.4 Супернатант сливают, не повреждая осадка. Осадок ресуспендируют в 1 мл РВ или PBS (см. Д.1 и Д.2, приложение Д), и переносят в стерильную микропробирку.

5.6.5 Экстракт используют сразу же для отборочных тестов: иммунофлуоресцентного анализа (далее – ИФ-анализа) (см. 6.1), ПЦР-анализа (см. 6.2), а также для прямой изоляции (см. 7.1) и биологического анализа (заражения незрелых плодов) (см. 6.4).

5.6.6 На протяжении тестирования осадок хранят в течение дня при температуре 4 °С или после достоверно проведенного ИФ-анализа замораживают, добавив одну-две капли глицерина, при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С.

5.6.7 Если невозможно начать анализ в день приготовления, экстракт наносят на стекла для ИФ-анализа (см. 6.1), фиксируют согласно инструкции производителя сыворотки и хранят стекла до начала анализа. Если в качестве первого отборочного теста используют один из методов на основе ПЦР (см. 6.2), рекомендуется отобрать необходимое количество экстракта в отдельную пробирку и хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С до начала анализа. Остаток экстракта замораживают с добавлением глицерина согласно 5.6.6.

5.6.8 Для длительного хранения образцы с глицерином помещают в морозильную камеру при температуре минус 80 °С.

### **5.7 Экстракция бактерий методом гомогенизации образца**

5.7.1 Измельченный образец помещают в пластиковый пакет (рекомендуется использовать специальные пакеты для гомогенизации с фильтром), добавляют 4,5 мл антиоксидантного мацерирующего буфера (см. Д.3, приложение Д), РВ или PBS, выдерживают не менее 5 мин.

5.7.2 Растительный материал разбивают в пакете с помощью молотка с гладкой ударной поверхностью, гомогенизатора лопаточного типа или аналогичного приспособления, предотвращающего разбрызгивание, и охлаждают образцы на льду в течение нескольких минут.

5.7.3 В стерильные микропробирки отбирают три пробы. Два образца экстракта, объемом 1 мл каждый, замораживают, добавив одну-две капли глицерина (один при минус 20 °С, для последующих анализов или подтверждения, второй – при минус 80 °С, для длительного хранения). Третью часть экстракта объемом 2 мл используют для анализа и хранят на льду не более суток.

### **5.8 Обогащение образца**

Обогащение используют для увеличения в образце концентрации жизнеспособных клеток возбудителя бактериального ожога. Оно необходимо для выявления возбудителя методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА) (см. 6.3) из-за невысокой чувствительности этого метода при использовании моноклональных антител. Также обогащение может быть применено в случае, если образцы обработаны медьсодержащими препаратами, симптомы старые, образцы несвежие, в случае неблагоприятных для развития ожога погодных условий, зимой и т.д. Однако надо учитывать, что в случае, когда целевые бактерии ослаблены или в образце содержится большое количество

сапрофитной микрофлоры, инкубация в жидких питательных средах может привести к снижению концентрации или полному уничтожению целевого организма. Поэтому, рекомендуется сочетать прямые отборочные тесты и тесты с предварительным обогащением.

### **5.8.1 Обогащение на средах**

Для обогащения на средах используют две жидкие питательные среды: неселективную (Кинга Б) и полуселективную (ССТ) (см. И.1 и И.2, приложение И), если состав микрофлоры неизвестен.

Непосредственно после мацерации помещают по 1 мл суспензии в две стерильные пробирки на 3 – 5 мл и добавляют равное количество каждой среды. В качестве отрицательного контроля используют две пробирки, содержащие по 1 мл буфера, использовавшегося для экстракции, и 1 мл каждой из сред для обогащения. Инкубируют 48 ч при температуре 25 °С без встряхивания.

*Примечание* – Если концентрация все еще остается низкой, инкубацию продолжают до 72 ч.

### **5.8.2 Обогащение на незрелых плодах**

Если при положительных результатах отборочных тестов изоляция с обогащением на средах или прямая изоляция не удастся, проводят обогащение на незрелых плодах. Незрелые плоды являются идеальной средой для возбудителя бактериального ожога, одновременно сдерживая рост сопутствующей микрофлоры. Поэтому обогащение на биологическом материале может быть более эффективным, чем на средах.

Для обогащения на незрелых плодах проводят процедуру, идентичную биологическому анализу (см. 6.4), используя для инокуляции экстракт растительного образца. По результатам биологического теста проводят изоляцию, как для образца с симптомами, или как с бессимптомного образца соответственно.

## **6 Методы выявления с использованием отборочных тестов**

### **6.1 Иммунофлуоресцентный анализ**

#### **6.1.1 Общие положения**

6.1.1.1 ИФ-анализ рекомендуется использовать в качестве первого отборочного теста. Проводят его со свежеприготовленным экстрактом. Если экстракт был заморожен с добавлением глицерина, необходимо предварительно удалить глицерин. Для этого к экстракту добавляют 1 мл PBS, тщательно перемешивают на микроцентрифуге с функцией встряхивания, центрифугируют в течение 10 мин с ускорением 8000 g или 15

мин с ускорением 7000 g, осторожно удаляют супернатант и ресуспендируют осадок в 1 мл PBS. Для проведения анализа рекомендуется использовать восьми-десятилуночные предметные стекла с диаметром лунки от 5 до 6 мм.

6.1.1.2 Для возбудителя бактериального ожога используют поликлональные или моноклональные антитела.

**П р и м е ч а н и е** – Для проведения ИФ-анализа в качестве отборочного теста рекомендуется использовать поликлональные антитела. Моноклональные антитела рекомендуется применять для идентификации.

6.1.1.3 Перед началом работы каждую новую партию сыворотки тестируют следующим образом:

- наносят по 20 мкл суспензии референтного штамма возбудителя бактериального ожога концентрацией  $10^6$  клеток/мл на пять-семь лунок предметного стекла, подсушивают, фиксируют согласно инструкции производителя сыворотки.

- приготавливают соответствующее количество двукратных разведений сыворотки (см. приложение К), учитывая рекомендации производителя (например, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 и т.д.). Последовательно наносят разведения на лунки в порядке возрастания концентрации антител, начиная с последней лунки. Объем сыворотки, нанесенной на лунки, должен быть равен объему нанесенного экстракта. Затем стекла инкубируют и промывают согласно инструкции производителя.

- наносят флуоресцирующий изотиоцианатный конъюгат (далее – FITC) согласно рекомендации производителя. Объем конъюгата, нанесенного на лунки, должен быть равен объему нанесенной сыворотки. Инкубируют, промывают, готовят препарат для микроскопирования.

- препарат просматривают под люминесцентным микроскопом. Клетки целевого организма должны быть ярко окрашены флуоресцирующим зеленоватым красителем, клеточные стенки окрашены более ярко. Определяют разведение, на котором уровень флуоресценции начинает снижаться. Предыдущее разведение, на котором клетки еще ярко флуоресцируют, есть рабочее разведение данной сыворотки (далее – титр).

6.1.1.4 Для каждой серии образцов в качестве положительного контроля, используют суспензию  $10^6$  кл/мл референтного штамма возбудителя бактериального ожога. Положительный контроль готовят на отдельном стекле одновременно с каждой серией образцов, или заранее подготавливают стекла с положительным контролем, фиксируя способом, рекомендованным производителем сыворотки. Стекла хранят в темном прохладном месте в течение месяца или дольше (после тестирования качества препарата).

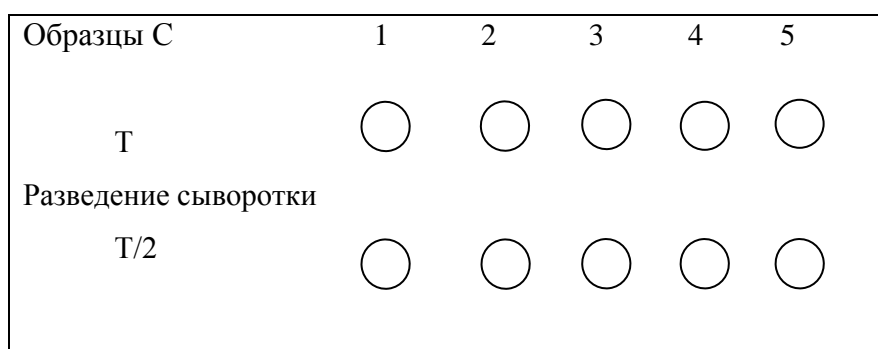


**6.1.2 Иммунофлуоресцентный анализ с разведением сыворотки\***

6.1.2.1 Наносят 20 мкл центрифугированной суспензии каждого образца на одну-две лунки стекла. При использовании двух лунок на каждый образец удобно использовать две вертикально расположенные лунки, как показано на рисунке 1. На одно стекло можно наносить нескольких образцов.

6.1.2.2 Образцы фиксируют согласно рекомендациям производителя сыворотки. Проводят процедуру ИФ-анализа согласно инструкции производителя.

**П р и м е ч а н и е** – Стекла с нанесенной суспензией могут храниться несколько дней в сухом прохладном месте (например, суспензию можно нанести вечером и оставить подсыхать на ночь, избегая попадания прямых солнечных лучей).



**П р и м е ч а н и е** – С – неразбавленная суспензия образца, Т – титр сыворотки.

Рисунок 1 – Подготовка предметных стекол для ИФ-анализа с разведением сыворотки

**6.1.3 Иммунофлуоресцентный анализ с разведением экстракта образца\*\***

6.1.3.1 Приготавливают не менее трех десятикратных разведений экстракта образца 1/10, 1/100, 1/1000 в РВ, как показано на рисунке 2.

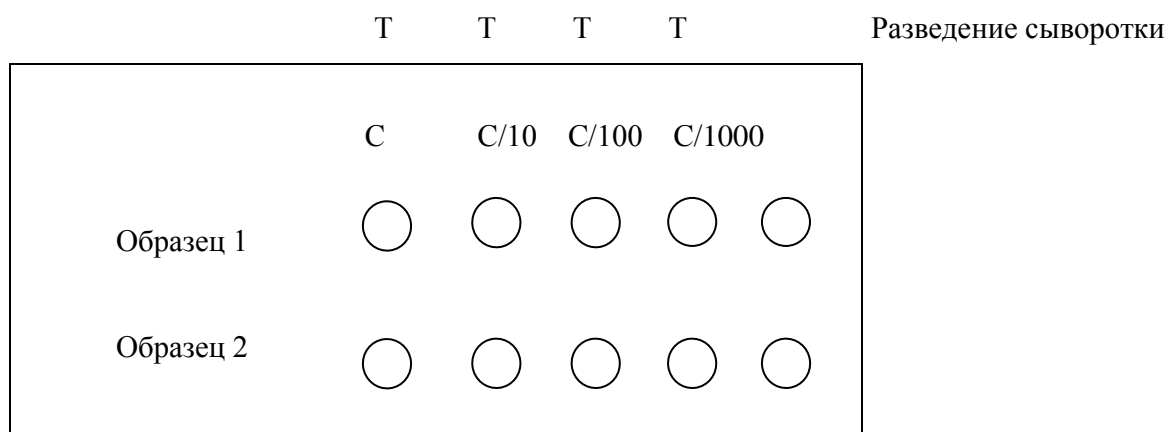
6.1.3.2 Наносят по 20 мкл экстракта и последовательных разведений на стекло, фиксируют согласно инструкции производителя сыворотки.

6.1.3.3 Наносят 20 мкл антител. Используют разведение сыворотки, равное титру. Далее анализ проводят согласно инструкции производителя сыворотки.

6.1.3.4 На стекло наносят фосфатно-глицериновый буфер (см, Д.4, приложение Д), плотно накрывают покровным стеклом, удаляя излишки буфера с помощью фильтровальной бумаги.

\* Данный метод можно использовать только при работе с поликлональными антителами.

\*\* Данный метод применяется при использовании моноклональных антител, а также для идентификации (см.8.2.1).



Пр и м е ч а н и е – С – неразбавленная суспензия образца, Т – титр сыворотки.

Рисунок 2 – Подготовка предметных стекол для ИФ-анализа с разведением образцов

6.1.3.4 Стекла просматривают под люминесцентным микроскопом с фильтрами, подходящими для излучения FITC, с масляной иммерсией и увеличением от 500 до 1000 раз.

6.1.3.5 В первую очередь просматривают положительный контроль. Клетки должны быть ярко-флуоресцирующими с более яркими клеточными стенками.

Пр и м е ч а н и е – Если окрашивание положительного контроля отклоняется от нормы, процедуру анализа необходимо повторить.

6.1.3.6 Далее лунки просматривают на наличие или отсутствие флуоресцирующих клеток с характерной для возбудителя бактериального ожога морфологией. Лунки с образцами просматривают по двум взаимно-перпендикулярным диаметрам и по окружности. Если характерные клетки не обнаруживаются, необходимо просмотреть не менее 40 полей зрения. Интенсивность флуоресценции должна быть эквивалентной соответствующему разведению положительного контроля. Клетки с неполным прокрашиванием или со слабой флуоресценцией должны быть проигнорированы.

#### 6.1.4 Интерпретация результатов иммунофлуоресцентного анализа

6.1.4.1 Результат ИФ-анализа отрицателен, если ярко-флуоресцирующие клетки с характерной для возбудителя бактериального ожога морфологией присутствуют в положительном контроле, но отсутствуют в образце.

6.1.4.2 Результат ИФ-анализа положителен, если в положительном контроле и в образце присутствуют клетки с характерной морфологией, уровень флуоресценции которых эквивалентен положительному контролю (с учетом концентрации клеток). Пределом чувствительности для ИФ-анализа считается  $10^3$  кл/мл. Если концентрация

флуоресцирующих клеток с типичной морфологией в образце больше  $10^3$  кл/мл, то образец считается положительным.

6.1.4.3 Результат считается недостоверным, если:

- в образце наблюдается большое количество не полностью прокрашенных или слабофлуоресцирующих клеток. В этом случае проводят либо анализ, основанный на другом биологическом принципе, либо повторяют ИФ-анализ с разведением экстракта образца в 100 и 1000 раз;

- в образце наблюдаются единичные ярко-флуоресцирующие клетки с характерной морфологией. В этом случае необходимо провести ПЦР-анализ и/или обогащение образца.

**П р и м е ч а н и е** – Если такая картина наблюдается в нескольких образцах, возможна контаминация растворов, сывороток или образцов.

## **6.2 Анализ на основе полимеразной цепной реакции**

### **6.2.1 Общие положения**

6.2.1.1 На протяжении всего анализа необходимо использовать одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования, стерилизовать поверхности и инструменты хлорными растворами или специальными дезинфицирующими растворами для ПЦР, разрушающими ДНК.

6.2.1.2 Рекомендуется использовать готовые наборы для выделения ДНК и амплификации. Перед началом работы с готовыми наборами или отдельными компонентами необходимо провести испытание диагностической системы как минимум на предмет чувствительности, проведя ПЦР-анализ с серией суспензий  $10^2$ - $10^6$  кое/мл чистой культуры референтного штамма возбудителя бактериального ожога. В дальнейшем рекомендуется использовать испытанные тест-системы.

6.2.1.3 Приготавливают суспензию с концентрацией  $10^6$  кл/мл референтного штамма возбудителя бактериального ожога в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля берут растворы, используемые для приготовления суспензии образцов. Если количество образцов в серии велико, необходимо включить несколько отрицательных контролей из расчета один отрицательный контроль на 10 образцов. Контроли анализируют вместе с образцами.

6.2.1.4 В случае использования ПЦР-анализов для отборочных тестов, необходимо использовать внутренний контроль амплификации для исключения ложноотрицательного результата вследствие ингибирования реакции.

## 6.2.2 Выделение ДНК

6.2.2.1 В тканях растений содержится большое количество веществ, способных подавлять (ингибировать) полимеразную цепную реакцию. Поэтому, перед постановкой реакции амплификации необходимо выделить и очистить тотальную ДНК из суспензии образца.

6.2.2.2 Рекомендуется использовать сорбционный метод выделения ДНК с готовыми наборами.

6.2.2.3 Суспензию образца в количестве 200 мкл вносят в микропробирку объемом 1,6 мл. Проводят выделение и очистку ДНК, следуя инструкции производителя набора. Очищенный препарат ДНК может быть использован для постановки ПЦР согласно любым из приведенных ниже методов.

## 6.2.3 Классический анализ на основе полимеразной цепной реакции

6.2.3.1 В стерильном флаконе приготавливают реакционную смесь для амплификации (ПЦР-микс № 1), добавляя компоненты в порядке, указанном в таблице 1.

Таблица 1– Состав реакционной смеси для амплификации № 1

Компоненты	Концентрация	Объем (V), мкл
Ультрачистая вода		20
10хПЦР-буфер	10х	5
MgCl <sub>2</sub>	50 мМ	1,5
d-NTP	10 мМ	1
2-меркаптоэтанол		1,4
Бычий сывороточный альбумин	1 мкг/мкл	8
DMSO		2,5
Твин 20		0,5
Праймер А	10 пМ/мкл	2,5
Праймер В	10 пМ/мкл	2,5
Тақ-полимераза	5U/мкл	0,1
Примечание –		
Праймер А: 5'- CGG TTT TTA ACG CTG GC -3'		
Праймер В: 5'- GGG CAA ATA CTC GGA TT -3'*		

6.2.3.2 Рассчитывают необходимое количество каждого компонента V (N+1), где N – число образцов (включая контроли).

\* По данным, приведенным Bereswill S., Bugert P., Bruchmuller I. & Geider K. Identification of the fireblight pathogen, *Erwinia amylovora* by PCR assays with chromosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology 61, 1995.

Примечание – Если количество образцов велико, для расчета объема реакционной смеси пользуются формулой  $V(N+2)$  или  $V(N+3)$ .

6.2.3.3 Компоненты смешивают и вносят по 45 мкл смеси в стерильные микропробирки для ПЦР. Микропробирки держат на льду или помещают в специальный охладитель проб. Добавляют по 5 мкл ДНК образцов и контролей. Если термоциклер не имеет подогреваемой крышки, то в каждую пробирку вносят одну-две капли минерального масла (из наконечника на 200 мкл). Стряхивают смесь на дно, центрифугируя микропробирки в течение нескольких секунд при скорости вращения 1500 об/мин. Микропробирки просматривают на отсутствие пузырьков воздуха под маслом (при их наличии центрифугирование повторяют), затем микропробирки устанавливают в термоциклер.

6.2.3.4 Условия амплификации зависят от модели термоциклера и должны быть заранее оптимизированы. Примерные условия представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия амплификации реакционной смеси № 1

Температура, °С	Время	Количество циклов
93	2 мин	1
93	1 мин	37
52	2 мин	
72	2 мин	
72	10 мин	1

Размер ампликона – 900 bp\*.

Примечание – Могут встречаться и другие вариации размера ампликона от 900 до 1100 bp, т.к. внутри ампликона может несколько раз повторяться последовательность размером 8 bp\*\*.

6.2.3.5 Также можно использовать более простой ПЦР-микс № 2, работающий с такой же эффективностью и приготовленный в соответствии с таблицей 3.

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

\*\* По данным, приведенным Jones A. & Geider K. II Gram negative bacteria. В. *Erwinia* and *Pantoea*. In: Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Ed. Schaad N.W., Jones J.B. & Chum W.), 2nd edn. APS Press, St Paul (US), 2001.

Таблица 3 – Состав реакционной смеси для амплификации № 2

Компоненты	Концентрация	Объем (V), мкл
Ультрачистая вода		33,1
10хПЦР-буфер	10 х	5
MgCl <sub>2</sub>	50 мМ	3
Формаимид	4%	2
d-NTP	10 мМ	0,5
Праймер А	10 пМ/мкл	0,5
Праймер В	10 пМ/мкл	0,5
Тақ-полимераза	5U/мкл	0,4

6.2.3.6 Добавляют по 5 мкл ДНК образцов и контролей. Условия амплификации представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Условия амплификации реакционной смеси № 2

Температура, °С	Время	Количество циклов
93	5 мин	1
93	30 с	40
52	30 с	
72	75 с	
72	10 мин	

#### Примечания

1 Классический ПЦР-анализ с детекцией методом электрофореза не рекомендуется использовать для отборочных тестов из-за большой трудоемкости и вероятности контаминации образцов.

2 В настоящий момент описано много праймеров и протоколов постановки ПЦР для возбудителя бактериального ожога\*. Также, возможно использование наборов для ПЦР-амплификации согласно инструкции производителя.

#### 6.2.4 Гнездовой анализ на основе полимеразной цепной реакции

Для гнездового ПЦР-анализа в одной пробирке используют две пары праймеров, вносимых одновременно. Проводят последовательно две реакции при разных условиях. Используют следующие внутренние праймеры\*\*:

\* Примером описания рекомендованных праймеров и процедур является работа Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W. & Geider K. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Applied and Environmental Microbiology 58, 1992.

\*\* По данным, приведенным Llop P., Bonaterra A., Peñalver J. & López M.M. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology 66, 2000.

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

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

А также следующие внешние праймеры\* :

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

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

Состав ПЦР-микса № 3 представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Состав реакционной смеси для амплификации № 3

Компоненты	Концентрация	Объем (V), мкл
Ультрачистая вода		34,76
10хПЦР-буфер	10х	5
MgCl <sub>2</sub>	50 мМ	3
Формамид		2
d-NTP	10 мМ	1
Праймер AJ75	0,1 пМ/мкл	0,32
Праймер AJ76	0,1 пМ/мкл	0,32
PEANT1	10 пМ/мкл	1
PEANT2	10 пМ/мкл	1
Taq-полимераза	5U/мкл	0,6

Вносят 1 мкл ДНК образцов и контролей. Условия амплификации представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Условия амплификации реакционной смеси № 3

Температура, °С	Время	Количество циклов
94	4 мин	1
94	30 с	
72	1 мин	25
94	4 мин	1
94	30 с	
56	30 с	40
72	45 с	
72	10 мин	

Размер ампликона 391 bp.

Примечание — Могут встречаться другие вариации размера ампликона.

\* По данным, приведенным McManus P.S. & Jones A.L. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. Phytopathology 85, 1995.

Условия амплификации должны быть оптимизированы для каждой модели термоциклеров. Для подтверждения культуры рекомендуется использовать Taq-полимеразу 1U для протокола Bereswill et al.\* или 2U для Llop et al.\*\* (вместо 2U и 3U для растительного материала).

### 6.2.5 Анализ ПЦР-продукта методом электрофореза

6.2.5.1 ПЦР-продукт (ампликоны) визуализируют методом электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Если это невозможно сделать немедленно, реакционные микропробирки хранят в течение одного дня при температуре 4 °С или замораживают при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С для более длительного хранения.

Примечание – Бромистый этидий является сильным мутагеном, необходимо работать в специальных перчатках.

6.2.5.2 Приготавливают 1,5%-2%-й агарозный гель, аккуратно расплавляя агарозу в трис-ацетатном электрофорезном буфере (далее – ТАЕ-буфер) (см. Д.5, приложение Д).

6.2.5.3 Гель охлаждают до температуры от 50 °С до 60 °С, затем его заливают толщиной от 5 до 7 мм в плашку для электрофореза и устанавливают гребенку. Остужают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 20 – 40 мин до полного застывания.

6.2.5.4 Осторожно покачивая, убирают гребенку. Плашку с гелем погружают в ванночку для электрофореза с ТАЕ-буфером так, чтобы гель был покрыт буфером на 3 мм.

6.2.5.5 Затем наносят необходимое количество капель загрузочного буфера (см. Д.6, приложение Д), каждая объемом 3 мкл, на парафильм или чистое предметное стекло. Добавляют 20 мкл ПЦР-продукта каждого образца и контролей, аккуратно перемешивают пипетированием перед загрузкой на гель.

Примечание – Полученные объемы могут быть изменены в зависимости от размера лунок.

6.2.5.6 Аккуратно вносят подготовленные образцы в лунки геля. ДНК-маркер вносят как минимум в одну лунку.

---

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

\*\* По данным, приведенным Llop P., Bonaterra A., Peñalver J. & López M.M. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology 66, 2000.



6.2.5.7 Ванночку подключают к источнику тока, устанавливают напряжение от 120 до 160 В и время таким образом, чтобы передний край маркера не доходил до края геля ближе чем на 1 см.

6.2.5.8 По окончании электрофореза напряжение отключают, контакты отсоединяют. С помощью специальной лопатки осторожно удаляют гель из плашек и помещают его на период от 20 до 30 мин в раствор бромистого этидия.

6.2.5.9 Затем гель просматривают под ультрафиолетовым светом, определяют наличие амплифицированных ДНК-фрагментов образцов и в случае их наличия сравнивают их расположение на геле с ДНК-маркером и положительным контролем.

**Примечание** – Все отрицательные контроли должны быть отрицательными. Если хотя бы один из них положителен, то положительный результат образцов считается недостоверным и анализ необходимо повторить.

6.2.5.10 Гель фотографируют. Изображение хранят в электронном и/или распечатанном виде.

**Примечание** – Ампликоны, полученные по Bereswill et al. и методом гнездового ПЦР-анализа по Llor et al., могут быть обработаны эндонуклеазами Dra I и Sma I, и спектры рестрицированных участков могут быть использованы для подтверждения результатов ПЦР-анализа.

## **6.2.6 Интерпретация результатов анализа на основе полимеразной цепной реакции с детекцией методом электрофореза**

6.2.6.1 Результат отрицателен, если характерный фрагмент в образце и отрицательных контролях не обнаружен, но обнаружен в положительных контролях.

6.2.6.2 Результат положителен, если обнаружен характерный фрагмент в образце и положительных контролях, а в отрицательных – нет.

## **6.2.7 Анализ на основе полимеразной цепной реакции с использованием меченых зондов**

### **6.2.7.1 Флуоресцентный анализ на основе полимеразной цепной реакции с детекцией по конечной точке**

Для проведения флуоресцентного ПЦР-анализа с детекцией по конечной точке (далее – flash-ПЦР-анализ) рекомендуется использовать наборы, содержащие микропробирки с готовой реакционной смесью, запечатанной парафином, раствор Taq-полимеразы, ПЦР-буфер, минеральное масло и положительный контроль амплификации. Для постановки ПЦР используют очищенную ДНК (см. 6.2.2). Проводят подготовку реакционных пробирок и устанавливают программу амплификации в соответствии с инструкцией по применению набора.

Детекцию результатов проводят с помощью детектора флуоресценции согласно компьютерной программе прибора.

#### **6.2.7.2 Флуоресцентный анализ на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени**

Флуоресцентный анализ на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени (далее – ПЦР-анализ в формате «Real-time») отличается от flash-ПЦР-анализа способом детекции результата, для этого используется специальный термоциклер с функцией детекции уровня флуоресценции в процессе амплификации (в реальном времени). ПЦР-анализ в формате «Real-time» имеет преимущество перед методом flash-ПЦР-анализа, т.к. позволяет следить за ходом реакции, оценивать причины увеличения флуоресценции, а также определять концентрацию целевой ДНК в образце.

Анализ проводят с тест-наборами или используя опубликованные методики. Перед началом работы с новыми компонентами необходимо провести процедуру валидации или верификации (если имеется отчет о валидации данного метода, проведенный ранее другой лабораторией).

#### **6.2.8 Анализ на основе полимеразной цепной реакции с предварительным подращиванием на твердой питательной среде**

Анализ на основе полимеразной цепной реакции с предварительным подращиванием на твердой питательной среде (далее – Био-ПЦР-анализ) проводят следующим образом:

- высевают 50 мкл суспензии образца на плотные питательные и/или селективные среды и инкубируют до 2 сут при температуре 27 °С;
- приготавливают смыв бактериальной массы дистиллированной водой, отбирают 200 мкл полученной суспензии в микропробирку;
- микропробирки нагревают в течение 10 мин при температуре 95 °С, затем быстро охлаждают на льду. Центрифугируют 1 мин при скорости вращения 7000 об/мин и проводят амплификацию согласно 6.2.2, 6.2.3, 6.2.6 и 6.2.7, используя необходимое количество надосадочной жидкости.

### **6.3 Иммуноферментный анализ**

Рекомендуется использовать проверенные тест-наборы или заранее апробированные реагенты. Необходимо тестировать каждый новый лот сывороток, используя референтный штамм возбудителя бактериального ожога или положительные и отрицательные контроли.

#### **6.3.1 Иммуноферментный анализ прямого отпечатка ткани**

6.3.1.1 Этот метод облегчает предварительный диагноз в образцах с симптомами, но нуждается в последующем подтверждении. Также метод применяют для тестирования отдельных колоний или экссудата как дополнительный серологический анализ. Решающее

значение имеет использование проверенных специфических антител.

6.3.1.2 Для подготовки прямых отпечатков растительной ткани на мембране в саду или в лаборатории делают чистые срезы побегов, цветков, листьев или плодов с симптомами. Делают отпечатки свежих срезов на нитроцеллюлозной мембране. Также можно нанести на мембрану бактериальную культуру или экссудат. Для предотвращения кросс-контаминации образцов режущий инструмент дезинфицируют после каждого среза. В качестве положительного контроля используют отпечаток среза зараженного растения-хозяина с симптомами ожога, в качестве отрицательного – отпечаток среза здорового растения того же вида. Следы или отпечатки подсушивают несколько минут. При работе с мембранами необходимо соблюдать осторожность, чтобы не повредить образцы. Отпечатки на мембранах хранятся в сухом месте при температуре от 20 °С до 25 °С на протяжении нескольких месяцев.

6.3.1.3 Приготавливают 1%-ю суспензию бычьего сывороточного альбумина (далее – BSA) в дистиллированной воде (размешивают с помощью палочки). Помещают мембраны в подходящий контейнер (лоток, герметичный контейнер, пластиковый пакет), покрывают их альбуминами, инкубируют в течение 1 ч при температуре от 20 °С до 25 °С или оставляют на ночь в холодильной камере при температуре 4 °С. Рекомендуется периодически слегка покачивать контейнер. Раствор альбуминов сливают, оставляя мембраны в этом же контейнере.

6.3.1.4 Разводят в PBS специфические для возбудителя бактериального ожога моноклональные антитела (щелочно-фосфатазный конъюгат) до подходящей концентрации и покрывают мембраны раствором. Инкубируют в течение 2-3 ч на шейкере при температуре от 20 °С до 25 °С и удаляют раствор.

6.3.1.5 Затем приготавливают промывочный буфер (далее – PBS с Твином) (см. Д.7, приложение Д), ополаскивают контейнер и мембраны. Мембраны промывают в PBS с Твином 5 мин, используя ручное или механическое шейкирование. Удаляют буфер и повторяют процедуру дважды.

6.3.1.6 Приготавливают быстрый субстратный буфер для щелочной фосфатазы, (см. Д.8, приложение Д) наносят его на мембраны и инкубируют до появления пурпурно-фиолетовой окраски в положительном контроле (около 10 мин). Реакцию останавливают, промыв мембраны дистиллированной водой, подсушивают их, разложив на фильтровальной бумаге. Отпечатки просматривают при небольшом увеличении (от 10 до 20 раз).

**6.3.2 Интерпретация результатов иммуноферментного анализа прямого отпечатка ткани**

6.3.2.1 Анализ считается положительным, если в положительном контроле и в образце обнаруживается пурпурно-фиолетовый преципитат, а в отрицательном контроле – нет.

Экссудат или культура должны давать окраску, сопоставимую по интенсивности с окраской положительного контроля.

6.3.2.2 Анализ считается отрицательным, если в положительном контроле обнаруживается пурпурно-фиолетовый преципитат, а в отрицательном контроле и в образце – нет.

### **6.3.3 Иммуноферментный анализ с обогащенным образцом**

6.3.3.1 Для проведения ИФА с обогащенным образцом рекомендуется использовать моноклональные антитела или готовые наборы на их основе\*.

6.3.3.2 В качестве положительного контроля используют экстракт заранее протестированного здорового образца, добавляя в него культуру возбудителя бактериального ожога в концентрации  $10^8$  кл/мл. В качестве отрицательного контроля используют суспензию заранее протестированного отрицательного образца и штамм, не относящийся к возбудителю бактериального ожога, в PBS.

6.3.3.3 Перед началом анализа необходимое количество суспензии обогащенных на двух средах образцов и контролей нагревают на водяной бане или в термоблоке 10 мин при температуре 100 °С. Для предотвращения открывания крышек используют или специальные микропробирки с замком, или термоблок с крышкой, или кладут небольшой груз на установленные в термоблок микропробирки. Остатки обогащенной суспензии сохраняют для проведения изоляции и/или ПЦР-анализа. Проводят ИФА сразу после кипячения или сохраняют образцы при минус 20 °С для последующего анализа. Согласно данным Gorris et al.\*\* , термическая обработка необходима для оптимальной чувствительности и специфичности при использовании моноклональных антител.

---

\* По данным, приведенным Gorris M.T., Cambra E., López M.M., Paulin J.P., Chartier R. & Cambra M. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Horticulturae no. 411, 1996a и Gorris M.T., Cambra M., Llop P., López M.M., Lecomte P., Chartier R. & Paulin J.P. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. Acta Horticulturae no. 411, 1996b.

\*\* По данным, приведенным Gorris M.T., Cambra E., López M.M., Paulin J.P., Chartier R. & Cambra M. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Horticulturae no. 411, 1996a.

6.3.3.4 Приготавливают подходящее разведение поликлональных иммуноглобулинов, специфичных к возбудителю бактериального ожога в карбонатном буфере, рН 9,6 (см. Д.9, приложение Д), вносят по 200 мкл в лунки плашки для ИФА. Затем инкубируют в течение 4 ч при температуре 37 °С или 16 ч при температуре 4 °С. Трижды промывают PBS с Твином.

6.3.3.5 Вносят в лунки плашки по 200 мкл суспензии каждого образца, подготовленного согласно 6.3.3.3. Используют по две лунки для каждого образца и контролей. Кроме того, в качестве отрицательных контролей используют экстракционный буфер (см. Д.10, приложение Д) и среды, использовавшиеся для обогащения. Плашки инкубируют 16 ч при температуре 4 °С, затем трижды промывают лунки PBS с Твином.

6.3.3.6 Приготавливают подходящее разведение специфичных к возбудителю бактериального ожога моноклональных антител в PBS с добавлением 0,5% BSA. Вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют в течение 2 ч при температуре 37 °С и трижды промывают лунки PBS с Твином.

6.3.3.7 Приготавливают подходящее разведение в PBS козьих антимышинных иммуноглобулинов, конъюгированных со щелочной фосфатазой. Вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют 2 ч при температуре 37 °С и трижды промывают лунки согласно 6.3.3.4.

6.3.3.8 Приготавливают раствор субстрата для щелочной фосфатазы (р-нитрофенилфосфат) в субстратном буфере в концентрации 1 мг/мл. Вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С и считывают результаты через 30, 45 и 60 мин.

*Примечание* – При медленном протекании реакции планшеты инкубируют при температуре от 2 °С до 4 °С в течение ночи.

#### **6.3.4 Интерпретация результатов иммуноферментного анализа с обогащенным образцом**

6.3.4.1 Анализ отрицателен, если средняя величина абсорбции, оптическая плотность (далее – ОП) двух повторностей образца меньше удвоенной ОП отрицательного контроля (экстракта отрицательного образца) (при условии, что ОП положительных контролей после 60 мин инкубации выше 1,0 и более чем вдвое превышают ОП отрицательных контролей).

6.3.4.2 Анализ положителен, если среднее значение ОП образца более чем вдвое превышает среднее значение ОП отрицательного контроля (при условии, что средние значения ОП положительного контроля не менее чем вдвое превышает ОП всех отрицательных контролей).

6.3.4.3 Отрицательный результат в лунках положительного контроля означает, что тест был проведен некорректно и/или были неправильно приготовлены реагенты.

6.3.4.4 Положительный результат в лунках отрицательного контроля указывает на кросс-контаминацию или неспецифичность антител. В обоих случаях анализ необходимо повторить или провести тест, основанный на другом биологическом принципе.

### **6.3.5 Непрямой иммуноферментный анализ**

6.3.5.1 В 200 мкл суспензии чистой культуры подозрительного изолята (после нагревания в течение 10 мин при 100 °С для снижения вероятности неспецифической реакции) добавляют равный объем карбонатного буфера. Вносят по 200 мкл разведенной суспензии в две лунки планшеты.

*Примечание* – Необходимо использовать только сертифицированные планшеты.

6.3.5.2 В качестве положительного контроля используют подготовленную вместе с образцами чистую культуру возбудителя бактериального ожога в концентрации 10<sup>9</sup> кл/мл, в качестве отрицательного контроля – аналогичную суспензию другого вида бактерий.

6.3.5.3 Плашки инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С (или в течение одной ночи при температуре 4 °С), экстракты сливают. Трижды промывают лунки PBS с Твином, оставляя последний раствор на 5 мин.

6.3.5.4 Приготавливают подходящее разведение специфичных к возбудителю бактериального ожога антител, пользуясь инструкцией к набору. Вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С, сливают раствор антител. Трижды промывают лунки согласно 6.3.3.4.

6.3.5.5 Приготавливают подходящее разведение конъюгата щелочной фосфатазы с вторичными антителами в PBS с добавлением 0,5% BSA, вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют в течение 1 ч при температуре 37 °С и сливают раствор конъюгата, трижды промывают лунки согласно 6.3.3.4.

6.3.5.6 Приготавливают раствор субстрата для щелочной фосфатазы (р-нитрофенилфосфат) в субстратном буфере в концентрации 1 мг/мл, вносят по 200 мкл в каждую лунку, инкубируют в темноте при температуре от 20 °С до 25 °С и считывают результаты при длине волны 405 нм через равные интервалы в пределах 90 мин.

*Примечание* – При медленном протекании реакции планшеты инкубируют при температуре от 2 °С до 4 °С в течение одной ночи. Результаты считывают согласно 6.3.5.6.

### **6.4 Биологический анализ**

6.4.1 Биологический анализ используют как дополнительный отборочный тест.

6.4.2 Для каждого образца используют от трех до пяти незрелых плодов (или 1/4 – 1/2 плода) яблони и/или груши восприимчивых сортов. По возможности используют

разные виды и сорта. Одноразовым шприцем с тонкой иглой распределяют 100 мкл суспензии образца между плодами, делая несколько уколов через кожицу на глубину около 5 мм.

6.4.3 В качестве положительного контроля инокулируют плоды тех же сортов суспензией чистой культуры возбудителя бактериального ожога с концентрацией  $10^6$  клеток/мл.

6.4.4 В качестве отрицательного контроля инокулируют плоды тех же сортов буфером, в котором проводилась мацерация. Инкубируют во влажной камере при температуре от 25 °С до 27 °С от пяти до семи дней. Наблюдают на предмет некроза и выделения белого бактериального экссудата (иногда на разрезанных плодах экссудат выделяется из среза с нижней стороны). При развитии типичных симптомов проводят изоляцию и идентификацию чистой культуры.

**Примечание** – Если симптомы не проявились, из инокулированных плодов приготавливают мацерат одним из способов, рекомендованных для бессимптомных образцов, затем проводят ИФ-анализ и/или ПЦР-анализ.

## **7 Методы изоляции патогена**

### **7.1 Прямая изоляция**

7.1.1 Для прямой изоляции используют следующие среды: питательные левановую (см. И.3, приложение И), Кинга Б, питательный агар с сахарозой и/или селективную среду ССТ. Обычно возбудитель ожога плодовых хорошо выделяется на обычные среды. Хорошие результаты дает изоляция на левановую среду, которую можно использовать, как единственную в случае, если отборочные тесты указывают на достаточно высокую концентрацию возбудителя бактериального ожога в экстракте.

7.1.2 Проводят посев экстракта одним из следующих способов:

7.1.2.1 Вносят 30-50 мкл суспензии на чашку Петри. Последовательно распределяют суспензию по поверхности среды на трех чашках с помощью шпателя.

7.1.2.2 Проводят посев методом штриха.

7.1.2.3 Приготавливают четыре десятикратных разведения экстракта в одном из буферов для экстракции, высевают по 50 – 100 мкл неразбавленного экстракта и каждого из разведений на каждую из сред штрихом или используя стерильный шпатель.

7.1.2.4 Для контроля качества сред высевают референтный штамм возбудителя бактериального ожога.

7.1.2.5 Инкубируют чашки от 48 до 72 ч при температуре 27 °С. Последнее считывание результатов проводят через 96 ч.

7.1.3 Особенности роста и морфология колоний возбудителя бактериального ожога на различных средах.

7.1.3.1 На среде ССТ ингибируется рост большинства псевдомонад, но не *Pantoea agglomerans*. Колонии возбудителя бактериального ожога появляются через 48 ч, они палево-фиолетовые, округлые, приподнятые до куполообразных, гладкие и мукоидные после 72 ч инкубации, рост более медленный, чем на других средах.

7.1.3.2 На среде Кинга Б колонии возбудителя бактериального ожога видны уже через 24 ч. Они беловато-кремового цвета, округлые, от плосковатых до слегка выпуклых, не флуоресцируют в ультрафиолетовом свете при 366 нм после 48 ч инкубации (это отличительный признак от флуоресцирующих псевдомонад). В зависимости от качества пептона, колонии возбудителя бактериального ожога на среде Кинга Б могут быть более или менее жидкие, вплоть до растекающихся. Для получения отдельных колоний рекомендуется использовать подходящий пептон.

7.1.3.3 На левановой среде, а также на питательном агаре с сахарозой, колонии возбудителя бактериального ожога видны также через 24 ч. Они сероватые, округлые, куполообразные, гладкие и мукоидные после 48 ч инкубации. Встречаются также леван-негативные колонии возбудителя бактериального ожога\*.

7.1.4 Из подозрительных колоний со сред ССТ, левановой и питательного агара с сахарозой выделяют чистую культуру возбудителя бактериального ожога на среду Кинга Б. Со среды Кинга Б культуру выделяют на левановую среду или питательный агар с сахарозой.

Примечание – Для получения чистой культуры возбудителя бактериального ожога необходимо суспендировать от одной до трех типичных колоний в стерильном буфере (РВ или PBS) и высеять суспензию на питательную среду одним из способов, изложенных в 7.1.2.1-7.1.2.5). Если на питательной среде наблюдается примесь нетипичных колоний, процедуру необходимо повторить.

#### 7.1.5 Интерпретация результатов изоляции

7.1.5.1 Изоляция имеет положительный результат, если, по крайней мере, на одной из сред обнаруживают типичные колонии, идентифицированные как возбудитель бактериального ожога.

---

\* По данным, приведенным Bereswill S., Jock S., Aldridge P., Janse J.D. & Geider K. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levansynthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 1997.



7.1.5.2 Изоляция имеет отрицательный результат, если через 96 ч инкубации ни на одной из сред не обнаружены колонии с типичной для возбудителя бактериального ожога морфологией, а в положительном контроле наблюдается нормальный рост типичных колоний.

## **7.2 Изоляция с обогащением**

7.2.1 Обогащенный экстракт и его десятикратные разведения в стерильном антиоксидантном мацерирующем буфере (в соотношении 1:10, 1:100, 1:1000) в количестве 50 мкл высевают на чашки с полуселективной средой ССТ с помощью шпателя или штрихом для получения отдельных колоний. Используют только полуселективную среду, так как на этапе обогащения увеличивается концентрация сопутствующей микрофлоры.

7.2.2 Инкубируют при температуре от 27°C до 96 ч. Считывание результатов начинают через 48 ч.

7.2.3 Выделение чистой культуры из подозрительных колоний проводят согласно 7.1.4, интерпретируют результаты согласно 7.1.5.

## **8 Методы идентификации**

В современной диагностике бактериальных болезней применяется схема, включающая три этапа: выявление возбудителя в растительном материале, изоляция возбудителя на питательные среды, идентификация чистой культуры возбудителя заболевания. Для выявления возбудителя бактериального ожога в растительном материале используют отборочные тесты, время выполнения которых, включая пробоподготовку, от одного до двух дней. В случае положительных результатов отборочных тестов проводят изоляцию патогена на питательные среды. В случае положительной изоляции, чистая культура возбудителя подтверждается несколькими методами и проводится тест на патогенность.

Для всех анализов, используемых при проведении лабораторной экспертизы, следует провести процедуру валидации или верификации, если метод был валидирован ранее. Для обеспечения максимальной стабильности проведения бактериологической экспертизы, рекомендуется использовать готовые коммерческие наборы. Если это невозможно, следует провести предварительные испытания реагентов, которые предполагается использовать для проведения данного теста. Необходимо учитывать, что замена хотя бы одного компонента в комплекте реагентов может изменить параметры всей тест-системы. Поэтому, при замене хотя бы одного из ключевых реагентов (полимеразы, сывороток, антибиотиков и т.п.), тест должен быть повторно валидирован.

Кроме того, каждая новая партия наборов или отдельных реагентов должна быть протестирована с референтным штаммом возбудителя бактериального ожога. Если реагенты долго не использовались, их также необходимо протестировать перед началом экспертизы.

В каждую серию образцов следует включать положительный и отрицательный контроль, а также внутренний контроль для некоторых тестов. При отсутствии контрольных образцов результаты тестирования не могут быть признаны достоверными.

Возбудитель бактериального ожога идентифицируют, используя не менее трех тестов, основанных на различных биологических принципах: ИФ-анализа (см. 8.2.1), ИФА (см. 8.2.2), ПЦР-анализа (см. 8.3), биохимических тестов (см. 8.1), анализа жирных кислот (см. 8.4) и т.д., а также тестов на растениях (см. 8.5). В критических случаях (экспорт-импорт), первое выявление на данной территории, рекомендуется проводить секвенированием (см. 8.3.4).

## **8.1 Биохимическая идентификация**

### **8.1.1 Общие положения**

Для каждого биохимического теста необходимо использовать референтный штамм возбудителя бактериального ожога в качестве положительного контроля.

**Примечание** – Если результаты биохимических тестов противоречат результатам других методов идентификации, не соответствующая характеристикам возбудителя бактериального ожога, необходимо провести дополнительное выделение чистой культуры (см. 7.1.4).

### **8.1.2 Классические биохимические тесты**

8.1.2.1 Фенотипические свойства, приведенные в таблице 8 по данным Paulin\* обязательны для возбудителя бактериального ожога.

---

\* По данным, приведенным Paulin J.P. *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Fireblight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora* (Ed. Vanneste J.). CAB International, Wallingford (GB), 2000.

Таблица 8 – Питательные и ферментные подтверждающие тесты

Наименование теста	Результат
Окраска по Граму	—
Образование левана	+
Флуоресцентный пигмент на среде Кинга Б (под ультрафиолетом)	—
Оксидативный/Ферментативный (О/Ф) тест	О+/F+
Каталаза	+
Тест Ковача на оксидазу	—
Редукция нитратов	—
Утилизация цитратов	+
Рост при 39 °С	—
Разжижение желатина	+
Уреаза	—
Индол	—
Редукция производных сахарозы	+
Ацетоин	+

8.1.2.1 Среды и методика приведены в протоколе Lelliot & Stead\*.

8.1.2.1 Тестирование проводят согласно методике Jones & Geider\*\*. В таблице 9 приведены различия между *Erwinia amylovora*, возбудителем азиатского ожога груши (Asian pear blight) *Erwinia pyrifolia* и изолированным в Испании из некротизированных цветков груши новым видом *Erwinia* sp.\*\*\*.

П р и м е ч а н и е – Физиологические и биохимические характеристики у некоторых штаммов могут варьировать.

\* По данным, приведенным Lelliot R.A. & Stead D.E. Epidemiological studies of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Spain Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, 1987.

\*\* По данным, приведенным Jones A. & Geider K. II Gram negative bacteria. В. *Erwinia* and *Pantoea*. In: Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Ed. Schaad N.W., Jones J.B. & Chum W.), 2nd edn. APS Press, St Paul (US), 2001.

\*\*\* По данным, приведенным Kim W.S., Gardan L., Rhim S.L. & Geider K. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia*). International Journal of Systematic Bacteriology 49, 1999, Kim W.S., Jock S., Rhim S.L. & Geider K. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. Plant Disease 85, 2001. и Roselló M., García-Vidal S., Tarín A., Llop P., Gorrís M.T., Donat V., Peñalver J., Chartier R., Paulin J.P., Gardan L. & López M.M. Characterization of an *Erwinia* sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. Acta Horticulturae no. 590, 2002.

Таблица 9 – Различия между *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifolia* и *Erwinia* sp.,  
изолированных из некротизированных цветков груши

Микробиологический тест	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia pyrifolia</i>	<i>Erwinia</i> sp.
Гидролиз желатина	+	—	—
Инозит <sup>1</sup>	—	не определено	+
Сорбит <sup>1</sup>	+	+	—
Эскулин <sup>1</sup>	вариабельно	—	+
Мелибиоза <sup>1</sup>	—	—	+
D-раффиноза <sup>1</sup>	—	—	+
β-гентибиоза <sup>1</sup>	+	—	+
Амплификация EP16A/EP162CCPS1/CPS2C <sup>2</sup>	—	+	не определено
<p>1 Окисление субстратов в API 50 CH с модифицированным протоколом*</p> <p>2 По данным Kim et al**</p>			

### 8.1.3 Биохимические характеристики по системе API

8.1.3.1 Биохимическую идентификацию возбудителя бактериального ожога проводят на стрипах API 20 E и API 50 CH.

8.1.3.2 Для системы API 20 E проводят процедуру согласно инструкции, инкубируют при температуре от 25 °С до 26 °С, считывают результаты через 24 и 48 ч, используя таблицу 10.

8.1.3.3 Для системы API 50 CH приготавливают суспензию OD = 1,0 в PBS и добавляют 1 мл к 20 мл среды Эйерса (см. И.4, приложение И). Процедуру проводят согласно инструкции.

8.1.3.4 Инкубируют при температуре от 25 °С до 26 °С, считывают результаты через 24 и 48 ч. Утилизацию углеводов определяют по желтому окрашиванию лунок.

\* По данным, приведенным Roselló M., Peñalver J., Llop P., Gorris M.T., Charter R., Cambra M. & López M.M. Identification of an *Erwinia* sp., different from *Erwinia amylovora* which is responsible for necrosis on pear blossoms. Authors to be contacted (submitted), 2003.

\*\* По данным, приведенным Kim W.S., Jock S., Rhim S.L. & Geider K. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. Plant Disease 85, 2001.

Таблица 10 – Типичные характеристики *Erwinia amylovora*  
в API 20 E тестах через 48 ч

Наименование теста	Реакция (48 ч)
ONPG	В
ADH	– (или через неделю +)
LDC	–
ODC	–
CIT	–
SH <sub>2</sub>	–
URE	–
TDA	–
IND	–
VP	+ (или В)
GEL	В
GLU	+
MAN	В
INO	В
SOR	В
RHA	–
SAC	+
MEL	– (или через неделю +)
AMY	–
ARA	+ (иногда –)

#### 8.1.4 Автоматическая идентификационная система Biolog

Идентификационная система Biolog основана на утилизации 95 органических субстратов, фиксированных на плашке. Для автоматической идентификации подозрительных штаммов необходимо следовать инструкции.

#### 8.2 Серологическая идентификация

##### 8.2.1 Иммунофлуоресцентный анализ

8.2.1.1 Наносят 15 мкл суспензии леван-положительной, нефлуоресцирующей культуры с концентрацией  $10^6$  клеток/мл в PBS на три-четыре лунки восьмидесятилуночного предметного стекла.

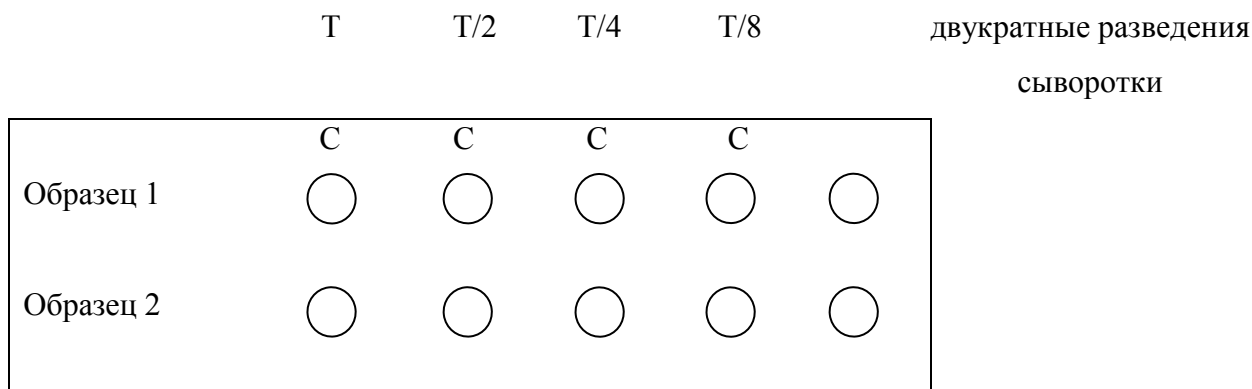
8.2.1.2 На отдельном стекле аналогичным образом готовят положительный контроль, используя суспензию референтного штамма возбудителя бактериального ожога.

8.2.1.3 Готовят серию двукратных разведений сыворотки как показано на рисунке 3.

**Примечание** – Для идентификации рекомендуется использовать моноклональные антитела, как более чувствительные.

8.2.1.4 Проводят процедуру ИФ-анализа согласно инструкции производителя сыворотки.

8.2.1.5 Форма, размер и интенсивность окрашивания клеток исследуемой культуры и референтного штамма в каждом разведении должны быть идентичными.



Примечание – С – неразбавленная суспензия образца.

Рисунок 3 – Подготовка предметных стекол с разведением сыворотки

## 8.2.2 Иммуноферментный анализ

Для идентификации культуры используют одну из модификаций иммуноферментного анализа со специфическими моноклональными антителами. Готовят суспензию подозрительной культуры  $10^8$  клеток/мл в PBS. Проводят процедуру анализа согласно 6.3.3 и 6.3.5, исключая этап обогащения культуры, или согласно инструкции производителя диагностической системы.

## 8.3 Молекулярная идентификация

### 8.3.1 Пробоподготовка образцов для анализов на основе полимеразной цепной реакции

8.3.1.1 Приготавливают суспензию леван-положительной, нефлуоресцирующей культуры с концентрацией  $10^6$  кл/мл в стерильной дистиллированной воде.

8.3.1.2 Выделяют ДНК без очистки методом кипячения (см. 6.2.8.3).

8.3.1.3 Выделенную ДНК используют немедленно, или хранят при температуре минус  $18^{\circ}\text{C}$  до постановки ПЦР.

### 8.3.2 Анализы на основе полимеразной цепной реакции с детекцией методом электрофореза

Постановку ПЦР проводят согласно процедурам, приведенным в 6.2.3 и 6.2.4.

Примечание – Для постановки ПЦР с чистой бактериальной культурой использование внутреннего контроля амплификации не обязательно.

### 8.3.3 Анализы на основе полимеразной цепной реакции с использованием меченых зондов.

Постановку ПЦР проводят согласно процедуре, приведенной в 6.2.7.

### 8.3.4 Секвенирование последовательностей ДНК

Рекомендуется проводить прямое секвенирование гена 16S rRNA, амплифицируемого стандартными праймерами 8UA\_519B:

8UA forward: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

519B reverse: 5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'

## 8.4 Анализ жирных кислот

Анализ позволяет не только подтвердить или опровергнуть принадлежность штамма к искомому возбудителю, но и указать (с той или иной долей вероятности) его конкретный вид/род (в зависимости от возбудителя и базы данных).

Леван-положительные, нефлуоресцирующие колонии культивируют на триптоново-соевом агаре (см. И.5, приложение И) в течение 48 ч при температуре 28 °С. Результат теста положителен, если профиль жирных кислот соответствует таковому положительного контроля\*.

**Примечание** – Если результаты анализа жирных кислот противоречат результатам других методов идентификации, не соответствуя характеристикам возбудителя бактериального ожога, необходимо провести дополнительное выделение чистой культуры (см. 7.1.4).

## 8.5 Тесты на растениях

### 8.5.1 Реакция гиперчувствительности на табаке

Реакция гиперчувствительности на табаке выявляет наличие генов *hpr*, но дает положительный результат для многих фитопатогенных бактерий. Используют растения табака сортов *Xanthi* или *Samsun* в фазе пяти-шести листьев. Бактериальная суспензия  $10^9$  кл/мл (ОП при 620 нм = 1,0) вводится в межклеточное пространство листа у какой-либо крупной жилки с помощью шприца и тонкой иглы (удобно использовать инсулиновые шприцы). Через 24 ч инкубации при температуре от 20 °С до 25 °С отмечают отмирание инокулированной ткани.

### 8.5.2 Тест на патогенность

8.5.2.1 Инокулируют незрелые плоды восприимчивых сортов груши, яблони или локвы (мушмулы японской *Eriobotrya japonica*). Отбирают здоровые, не поврежденные насекомыми плоды, промывают их под проточной водой с мылом. Рекомендуется

---

\* По данным, приведенным Sasser M. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Methods in Phytobacteriology (Ed. Klement F., Rudolf K. & Sands D.C.), Budapest: Akademiai Kiadó (HU), 1990.

стерилизовать плоды с поверхности, прополоскав их в 70%-м спирте, а затем в стерильной воде.

8.5.2.2 Помещают в зависимости от размера в стерильную чашку Петри или другую подходящую прозрачную емкость с вложенной стерильной влажной фильтровальной бумагой. Можно использовать целые плоды или их части с кожурой, толщиной около 1 см или больше (в зависимости от высоты влажной камеры). Инокулируют плоды суспензией  $10^9$  кл/мл в стерильном PBS или PB при помощи одноразовых шприцев с тонкой иглой, прокалывая кожицу перпендикулярно поверхности и вводя около 10 мкл суспензии на глубину около 5 мм. Для каждого образца используют отдельный шприц.

П р и м е ч а н и е – Можно нанести подозрительную культуру на поверхность плода и сделать несколько уколов тонкой стерильной препаровальной иглой через бактериальную массу и, не стерилизуя иглу, сделать еще несколько уколов в другом месте плода. Также, можно использовать деревянную зубочистку.

8.5.2.3 В качестве положительного контроля используют референтный штамм возбудителя бактериального ожога, в качестве отрицательного – буфер, в котором были приготовлены суспензии образцов. Влажную камеру закрывают и инкубируют при температуре от 25 °С до 27 °С до пяти дней.

8.5.2.4 Тест положителен, если через два-семь дней на поверхности выступают капли бактериального экссудата. При этом плоды могут побуреть. В отрицательном контроле при этом должны наблюдаться только некротические повреждения в месте уколов или повреждений не наблюдается вовсе).

8.5.2.5 Для инокуляции используют срезанные молодые побеги или горшечные растения восприимчивых сортов груши, яблони, локвы или восприимчивых видов боярышника, кизильника или пираканты. Ножницами, смоченными в суспензии бактерий, срезают половину листовой пластинки нескольких молодых листьев на молодых побегах. Помещают растения в теплицу или климатическую камеру, инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С и влажности от 80% до 100%. Просматривают через три, семь и 15 дней.

8.5.2.6 Из инокулированных растений, завязей или побегов, проявивших симптомы ожога, изолируют амилвороподобные колонии.

## **8.6 Условия хранения**

8.6.1. Культура *Erwinia amylovora* хорошо сохраняет жизнеспособность на плотной питательной среде до шести месяцев и дольше при температуре 4 °С.

8.6.2 Можно хранить культуру на скошенном питательном агаре под минеральным маслом при температуре 10 °С.



8.6.3 Для длительного хранения одно-двухсуточную бактериальную массу помещают с одной из питательных сред в стерильную микропробирку и замораживают при температуре минус 80 °С.

8.6.4 В жидкую питательную среду с добавлением одной-двух капель глицерина на 1 мл среды добавляют одно-двухсуточную бактериальную культуру и замораживают при температуре минус 20 °С (для хранения до года) или от минус 70 °С до минус 80 °С для более длительного хранения.

8.6.5 Лиофилизированные бактерии могут сохраняться при температуре 4 °С в течение несколько лет. При необходимости их помещают в жидкую питательную среду и инкубируют в течение от 24 до 48 ч на качалке или ресуспендируют в стерильном РВ или PBS. Используют как положительный контроль либо непосредственно суспензию, либо высевают ее на селективный или питательный агар.

## Приложение А

### (справочное)

#### Общие сведения о возбудителе бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*

**Таксономическое положение:** *Bacteria: Gracilicutes*

**Наименование:** *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.

**Синонимы:** *Micrococcus amylovorus* Burrilla

*Bacillus amylovorus* (Burrill) Trevisan

*Bacterium amylovorus* (Burrill) Chester

*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. f. sp. *rubi* Starr et al.

**Компьютерный код Байера:** ERWIAM

**Карантинный статус:** ЕОКЗР А2 № 52

#### А.1 Общие сведения

Бактериальный ожог плодовых деревьев, вызываемый бактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., является одним из наиболее опасных карантинных бактериозов плодовых и декоративных культур семейства розоцветных. Он широко распространен во многих странах мира и включен в список А2 ЕОКЗР.

#### А.2 Морфологические, культуральные и биохимические свойства

Возбудитель ожога плодовых – бактерии *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. – подвижные, мелкие палочки размером от 0,6 до 0,9 × от 1,2 до 1,6 м. Они не образуют спор, располагаются одиночно, парами и короткими цепочками, с расположенными перитрихально жгутиками в количестве от пяти до восьми, не имеют капсулы, грамотрицательные, факультативные анаэробы. Оптимальная температура роста от 26 °С до 28 °С, минимальная температура от минус 6 до минус 8 °С, погибают при температуре от 43 °С до 50 °С\*.

Бактерии хорошо растут на большинстве общих сред. На мясо-пептонном агаре и на картофельном агаре с добавлением дрожжевого экстракта через сутки образуются колонии серовато-белого или слегка кремового цвета, круглые, с ровными краями, блестящие, полупрозрачные с более плотным центром, с зернистой структурой, которая видна при косом освещении. Встречаются мукоидные колонии. В чистых культурах бактерии могут иметь S- и R-формы, из которых S – гладкая авирулентная форма, а R – складчатая вирулентная форма.

На мясо-пептонном бульоне бактерии образуют небольшую зернистую пленку, при этом бульон мутнеет. На средах с небольшим количеством стимуляторов роста бактерии через 2 сут используют арабинозу, галактозу, глюкозу, сахарозу, фруктозу, глицерин, маннит; вариабельно – мальтозу, рамнозу; не используют лактозу, рафинозу, крахмал, дульцит, инулин, декстрин; газ не

---

\* По данным, приведенным Van der Zwet T. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae no. 590, 2002 и Воронковой Л.В. Бактериальный ожог плодовых. Карантинные и другие опасные болезни растений. М., вып. 5, 1981.

образуется ни в одном случае. Бактерии не образуют оксидазы, уреазы, не мацерируют ломтики картофеля. Желатин разжижают кратерообразно. Молоко не створаживают и не пептонизируют, лакмусовое молоко обесцвечивают.

### **А.3 Биологические особенности**

Возбудитель бактериального ожога плодовых деревьев сохраняется в зимний период в зараженных растениях-хозяевах. Сохранение бактериальной массы внутри и на поверхности язв является наиболее важным источником для заражения растений весной. Бактерии проникают в растения через цветки, естественные отверстия (устьица, чечевички, гидатоды) или повреждения, вызванные насекомыми.

Развитие бактериоза связано с сезонным развитием растения-хозяина. Цикл развития заболевания начинается весной с попадания инфекции на цветки здорового растения, продолжается летом инфицированием веточек и плодов и заканчивается поздним летом или ранней осенью образованием язв на крупных ветвях и стволах\*.

Возбудитель бактериального ожога плодовых в виде экссудата сохраняется в зимний период в старых язвах на стволах и ветвях зараженных растений. При сокодвижении ранней весной бактерии из язвы могут попасть на цветки здоровых растений. Частицы экссудата, пыльца, зараженная возбудителем ожога плодовых деревьев, попадают на цветки здоровых растений с помощью ветра, дождя, насекомых-опылителей. Отдельные цветки или вся кисть при заражении сморщиваются, чернеют и гибнут. Если погодные условия неблагоприятны для развития болезни, инфекция не идет дальше заражения цветков.

При благоприятных для развития бактерий условиях они быстро размножаются в цветках, продвигаются через цветоножку к основанию кисти и затем в другие цветы, молодые побеги, ветви, листья, плоды.

На крупных ветвях и штамбе происходит растрескивание и отслаивание коры, позже в этих местах образуются клиновидные язвы с вытекающим экссудатом белого цвета. Из них происходит вторичное заражение молодых веточек. Зимой бактерии сохраняются в старых язвах.

### **А.4 Источники инфекции, способы переноса и распространения**

Все органы пораженного растения, кроме семян, считаются возможными источниками для распространения возбудителя болезни. Наиболее вероятные пути инфицирования растений бактериальным ожогом во время вегетационного периода – через цветки (частичками экссудата, зараженной пылью), ветви (через раны при обрезках и механических повреждениях) или некротические язвы, в которых сохраняется инфекция в неблагоприятные для развития заболевания периоды.

---

\* По данным, приведенным Van der Zwet T. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae no. 590, 2002 и Beer S.V. Fireblight inoculums: sources and dissemination. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 9, 1979.

Ожог плодовых деревьев распространяется с посадочным и прививочным материалом, инструментами при обрезке, переносится насекомыми-опылителями: пчелами, осами, мухами, сосущими насекомыми – тлями. Инфекция может распространяться птицами, дождем, ветром и поливными водами. Известны случаи, когда заболевание было завезено инфицированными плодами и тарой. Однако в настоящее время существует мнение, что этот путь создает практически незначительную опасность для распространения бактериоза.

Очаги инфекции чаще всего возникают в портовых городах, по долинам рек, в условиях повышенной влажности. Было замечено, что распространение и накопление инфекции происходит по течению рек и преимущественному направлению ветра.

На дальние расстояния возбудитель бактериального ожога может переноситься главным образом растениями-хозяевами, если они имеют скрытое (латентное) заражение или необнаруженные язвы.

#### **А.5 Влияние климатических условий на развитие болезни**

Климатические условия оказывают большое влияние на развитие бактериального ожога. Высокая температура в течение вегетационного периода в сочетании с высокой относительной влажностью, обилие влаги в виде дождя оказывают воздействие на развитие заболевания и чувствительность к нему растения-хозяина.

Наиболее благоприятными условиями для размножения бактерий являются температура от 24 °С до 29 °С и относительная влажность 70%. Однако, патоген может расти и при температуре от 4 °С до 32 °С.

Отмечалась большая вредоносность ожога плодовых в тех регионах, где наблюдалось выпадение дождей в начале вегетационного периода, а вскоре после этого было жарко и влажно. В областях с более сухим вегетационным периодом ожог наносил меньший вред.

Особый вред вызывают такие явления, как град. Повреждения, вызванные градом, создают идеальные условия для выхода патогена из растения. Сильные ветры также могут вызвать повреждение листьев и выход бактерий.

#### **А.6 Географическое распространение**

Бактериальный ожог плодовых деревьев впервые был обнаружен в США в 1780 году. Этиология болезни в то время была неизвестна. Лишь к концу XIX века Томас Берилл определил бактериальную природу ожога плодовых и выделил возбудителя бактериоза. Болезнь вызывала большие потери в промышленных садах груш и яблонь на западе США. В настоящее время ожог распространен в Северной Америке, включая Канаду и Мексику.

В Северную Европу заболевание было завезено в 1950-1960-х годах. После появления болезни в Англии в 1957 году и Нидерландах в 1965 году бактериоз распространился во всех странах северо-западной Европы. С середины 80-х до конца 90-х годов XX века бактериальный

ожог занял территории центральной, южной и восточной Европы. В настоящее время по данным ЕОКЗР заболевание распространено в следующих странах мира\*:

Регион ЕОКЗР: Австрия, Албания, Армения, Бельгия, Болгария, Босния и Герцеговина, Великобритания, Венгрия, Германия, Греция, Дания, Израиль, Ирландия, Испания, Италия, Люксембург, Македония, Молдавия, Нидерланды, Норвегия, Польша, Россия, Сербия, Словакия, Словения, Турция, Украина, Франция, Хорватия, Черногория, Чехия, Швейцария, Швеция.

Азия: Израиль, Кипр, Ливан.

Африка: Египет.

Северная Америка: Канада, Мексика, США.

Океания: Новая Зеландия.

#### **A.7 Поражаемые растения**

Основными и наиболее восприимчивыми хозяевами к бактериальному ожогу являются растения из семейства Rosaceae. Среди них кизильник (*Cotoneaster*) – самое восприимчивое декоративное растение. Из плодовых деревьев больше всего от ожога страдает груша (*Pyrus*). Кроме того, болезнь поражает *Crataegus* (боярышник), *Cydonia* (айву), *Malus* (яблоню), *Sorbus* (рябину), *Amelanchier* (иргу), *Chaenomeles japonica* (айву японскую), *Mespilus* (мушмулу), *Pyracantha* (пираканту), *Stranvaesia* (странвезию), дикую грушу, *Prunus* (сливу), *Armeniaca vulgaris* (абрикос)\*\*. Есть публикации о поражении бактериозом *Rubus* (малины)\*\*\* и *Rose* (розы). Некоторые виды боярышника и кизильника, выращиваемые на обочинах дорог и как живая изгородь, являются резервуарами инфекции.

#### **A.8 Вредоносность**

Вредоносность ожога плодовых деревьев весьма велика вследствие очень быстрого его распространения.

В сильно зараженных садах возбудитель заболевания может поражать от 20% до 50% насаждений, из которых до 10% полностью погибают. В некоторых садах бактериальным ожогом поражается до 90% плодовых деревьев. Большие площади декоративных растений, служащих в качестве живых изгородей, также сильно страдают от данного заболевания и служат источником инфекции для здоровых растений.

---

\* По данным, приведенным EPPO/CABI Quarantine Pests for Europe (Ed. by Smith I.M. et al.), 1997, CABI/EPPO Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe, 1998, а также EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System (PQR), 2007.

\*\* По данным, приведенным Van der Zwet T. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae no. 590, 2002 и Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International, Wallingford (GB), 1986.

\*\*\* По данным, приведенным Ries S.M. & Otterbacher A.G. Occurrence of fireblight on thornless blackberry in Illinois. Plant Disease Reporter 61, 1977.

Бактериальный ожог плодовых создает значительную опасность заражения восприимчивых хозяев. Он не только губит урожай текущего года, но и чрезвычайно опасен для самих растений. При благоприятных для возбудителя условиях во время цветения урожай значительно снижается, а иногда и полностью отсутствует. На чувствительных растениях-хозяевах бактериальная инфекция распространяется настолько быстро по дереву, что пораженные растения не могут быть спасены даже сильной и немедленной обрезкой и погибают через очень короткое время после обнаружения первого визуального проявления болезни (иногда в течение трех месяцев).

Оценить экономический ущерб от ожога плодовых бывает достаточно сложно. Потери особенно велики для региона Средиземноморья, где благоприятны климатические условия для развития болезни и в изобилии присутствуют дикорастущие растения-хозяева. Ущерб выражается как в потерях урожая и гибели плодовых деревьев, так и в затратах на выкорчевку и уничтожение больных растений.

**Приложение Б**  
**(рекомендуемое)**

**Порядок проведения обследований поражаемых культур**

Б.1 Для своевременного выявления бактериального ожога необходимо проводить регулярные обследования плодовых и декоративных поражаемых культур.

Б.2 Особое внимание уделяют обследованию поражаемых культур в пограничных зонах со странами, где распространен ожог.

Б.3 Необходимо проводить обследования как импортной, так и отечественной продукции.

В первую очередь обследуют плодовые и декоративные питомники, питомники научно-исследовательских учреждений и хозяйства, в которые поступает импортный посадочный материал. Обследование проводят не менее двух раз в течение вегетационного периода: конец мая – июнь (в период массового цветения и образования завязей) и июль – август (по побегам).

Особо важное значение имеет обследование питомников, где выращивают посадочный и прививочный материал. Их обследование следует заканчивать до начала реализации материала. При обследовании питомников плодовых семечковых культур, занимающихся выращиванием посадочного и прививочного материала, питомников научно-исследовательских учреждений и садов частного пользования проводят сплошной визуальный осмотр растений.

Б.4 На остальных насаждениях растений-хозяев (в промышленных садах, крупных фермерских хозяйствах, на госсортоучастках, в парках, на декоративных и дикорастущих насаждениях, по краям дорог и в лесополосах) обследование проводят один раз в течение вегетации (в период с мая по июль).

Б.5 При обследовании производственных садов, крупных фермерских хозяйств, госсортоучастков, декоративных растений-хозяев осматривают не менее 10% всех растений, проходя по двум диагоналям и четырем сторонам.

Проведению обследовательских мероприятий предшествует подготовительная работа: составляется список хозяйств, учреждений, территорий, где планируется проведение обследований.

Б.6 Для проведения обследовательских мероприятий необходимо иметь полевой журнал, сопроводительные документы, соответствующую экипировку и инструментарий. Записи в полевом журнале можно проводить по произвольной или рекомендованной схеме. Необходимо наличие сейф-пакетов и стандартных этикеток, чистых бланков актов обследования и отбора образцов. Обследователь должен иметь: лупу, скальпель или нож, секатор, дезинфицирующее средство для обработки инструментов после отбора очередного образца, фотоаппарат, яркую краску для пометки зараженных растений, сапоги, халат, полотенце и мыло.

Б.7 Перед выездом старший в обследовательской группе проводит инструктаж, на котором знакомит инспекторов (специалистов) с целями и задачами работы, маршрутом следования, методами обследований и отбора образцов, правилами работы с сейф-пакетами и оформлением этикеток, правилами фитосанитарной профилактики.

Б.8 Проходя по ряду, обследователь отбирает части зараженных растений для проведения лабораторной экспертизы с наиболее типичными признаками заболевания (образец). Рекомендуется фотографировать симптомы бактериального ожога на больных растениях.

Б.9 Для образца берут побеги, пораженные завязи, ветки, части коры с хорошо выраженными признаками заболевания. На одном растении могут быть взяты образцы с нескольких пораженных частей. Пораженное дерево помечают яркой краской.

Б.10 При переходе от одного дерева к другому инструменты и руки тщательно обрабатывают имеющимся дезинфицирующим средством.

Б.11 После завершения работы оформляют акт обследования подкарантинного объекта на установление карантинного фитосанитарного состояния и акт отбора образцов. После этого образцы в кратчайшие сроки должны быть доставлены в карантинную лабораторию для проведения бактериологического анализа и получения свидетельства карантинной экспертизы.

Б.12. Образцы, упакованные в сейф-пакеты с вложенной внутрь фильтровальной бумагой, можно хранить при температуре не выше 27 °С в течение не более суток (в случае транспортировки), или при температуре не выше 10°С в течение 10 дней.



## Приложение В (справочное)

### Симптомы поражения возбудителем бактериального ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora*

В.1 Симптомы ожога плодовых деревьев на основных растениях-хозяевах схожи и легко определяемы. Название заболевания отражает основную характеристику поражения различных частей растений, сходного с повреждениями пламенем.

В.2 Типичные симптомы на плодовых деревьях – некроз цветков, листьев и молодых побегов, приобретающих бурую или черную окраску, выделение экссудата и типичное изгибание верхушки молодых побегов – «пастуший посох». В зависимости от пораженного органа выделяют ожог цветков, ожог побегов, листовой ожог, ожог плодов, ожог скелетных ветвей и штамба, ожог корневой шейки и корней подвоя\*. Первые симптомы на растениях обычно проявляются ранней весной, когда устанавливается теплая и влажная погода. Наиболее общими и характерными симптомами являются:

- увядание и гибель цветов и завязей. В зависимости от чувствительности растения, вирулентности бактерий и погодных условий несколько или все цветы в кисти начинают увядать, становятся сухими, темно-коричневого или черного цвета. Они обычно остаются прикрепленными к растению в течение достаточно длительного времени, особенно в сухую погоду. Иногда происходит приостановка развития заражения на стадии поражения лишь нескольких цветов в кисти. Зараженные завязи также приобретают темно-коричневую окраску, а затем сморщиваются и, как и цветы, остаются прикрепленными к копыцу, оставаясь мумифицированными на растении. При высокой влажности в весенний период на цветах и завязях могут появиться капельки экссудата белого цвета;

- усыхание и гибель почек и побегов. Зараженные молодые почки и побеги либо становятся коричневыми, либо в большинстве случаев кончик побега изгибается с характерной особенностью, образуя симптом, названный «пастуший посох». Веточки начинают чернеть с кончиков, скручиваясь;

- листовые поражения. Зараженные листья имеют либо некротические пятна, которые начинаются от края листовой пластинки, либо наблюдается изменение цвета черешка и центральной жилки листа, что зависит от пути заражения. У яблони листья и черешки становятся бурными, у груши – от темно-бурых до черных, у боярышника рыжевато-бурыми, но остаются прикрепленными к растению;

---

\* По данным, приведенным Van der Zwet T. & Keil H.L. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. USDA Handbook no. 510. Washington (US), 1979 и Van der Zwet T. & Beer S. Fire blight – its nature, prevention and control. A Practical Guide to Integrated Disease Management. USDA Agricultural Information Bulletin no. 631. Washington (US), 1995.

- повреждение плода. На незрелых плодах (или реже на зрелых плодах) появляются маслянистые или водянистые зоны, которые позже буреют или чернеют. Плоды остаются прикрепленными к копыцу в мумифицированном состоянии. На них часто наблюдается выделение бактериального экссудата;

- повреждение ветвей и ствола. От зараженных цветов, почек и плодов заболевание распространяется к более крупным веткам и ветвям кроны, а затем может перейти на ветви первого порядка, ствол и штамп, вызывая язвы. На пораженных участках коры появляются темно-коричневые водянистые пятна, с нечеткой границей между пораженной и здоровой тканью. Язвы распознают внешне по их поверхности, являющейся слабо погруженной; они различны по размеру и окружены неправильными трещинами в коре. Пораженная ткань под корой бывает красно-бурого или коричневого цвета, имеет характерное «мраморное» окрашивание, вокруг язвы происходит обесцвечивание здоровых тканей; они часто имеют вид пропитанных водой, форма язв – клиновидная, Язвы могут вызывать быструю гибель ветвей и всего дерева\*.

В.3 В теплых влажных условиях беловатые мукоидные бактериальные выделения (экссудат) могут вытекать из зараженных почек, черешков, трещин коры и зараженных плодов и цветов. Выделения из зараженных яблоневых почек бывают золотистого цвета\*\*.

В.4 Иллюстрации типичных симптомов проявления заболевания приведены в приложении Г.

В.5 Симптомы ожога плодовых можно спутать с симптомами другого бактериального заболевания, вызываемого *Pseudomonas syringae*, возможно скрытое заражение в одревесневших тканях (в посадочном и прививочном материале). Зимой на растениях, находящихся в стадии покоя, диагностика также затруднена. Поэтому для выявления и подтверждения инфекции используют лабораторные методы, которые позволяют быстро и надежно провести диагностику на наличие вредного организма.

---

\* По данным, приведенным Dye D.W. *Erwinia: the 'amylovora' and 'herbicola' groups*. In: Plant Bacterial Diseases, a Diagnosis Guide (Ed. Fahy P.C. & Persley G.J.). Academic Press, Sydney (AU), 1983.

\*\* По данным, приведенным Van der Zwet T. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae no. 590, 2002.

Приложение Г  
(справочное)

Иллюстрации к симптомам заражения возбудителем бактериального ожога  
плодовых деревьев *Erwinia amylovora*



Рисунок Г.1 – Бактериальный ожог плодовых деревьев:  
сад яблони, пораженный ожогом



Рисунок Г.2 – Ожог молодого побега с завязью,  
растрескивание коры многолетней ветви яблони



Рисунок Г.3 – Капли белого (свежего) экссудата на завязи яблони



Рисунок Г.4 – Пораженный побег  
с соцветием



Рисунок Г.5 – Нити  
бактериального экссудата



Рисунок Г.6 – Пораженный цветок и незрелый плод яблони



Рисунок Г.7 – Окрашенный (старый) бактериальный экссудат на молодом побеге яблони



Рисунок Г.8 – «Пастуший посох»

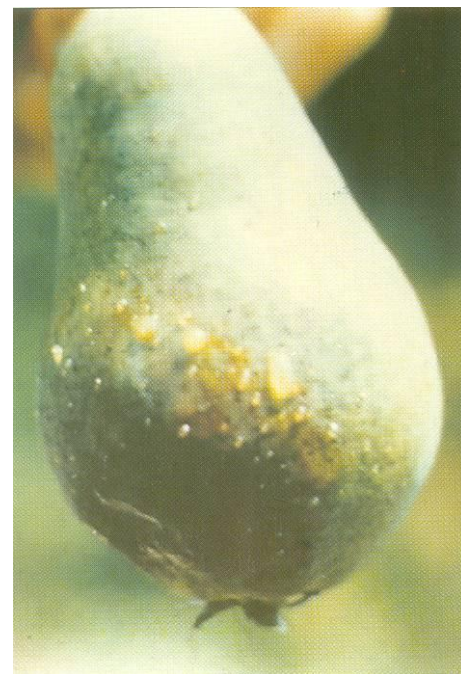


Рисунок Г.9 – Экссудат на плоде груши



Рисунок Г.10 – Срез коры корневой шейки пораженной яблони



Рисунок Г.11 – Пораженный побег боярышника



Рисунок Г.12 – Культура *Erwinia amylovora* на левановой среде



Рисунок Г.13 – Куполообразные «левановые» колонии

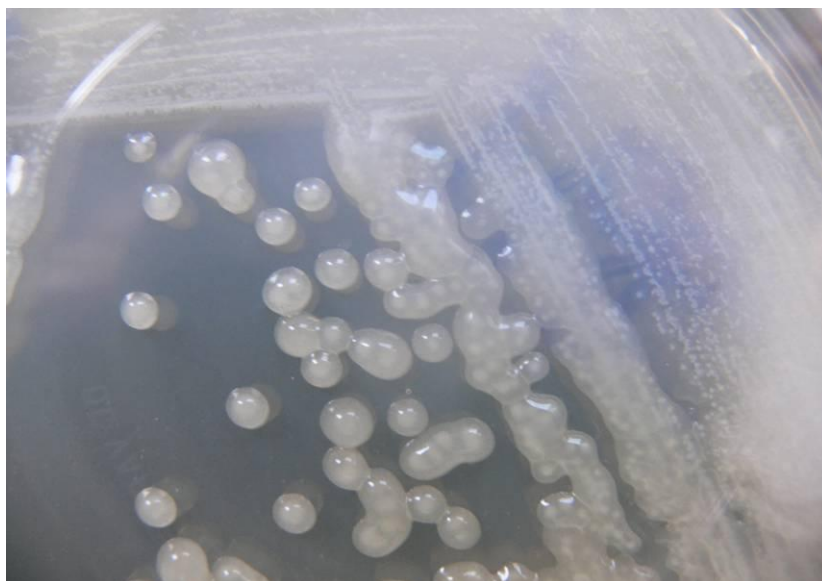


Рисунок Г.14 – Структура колоний под микроскопом с увеличением в 20 раз

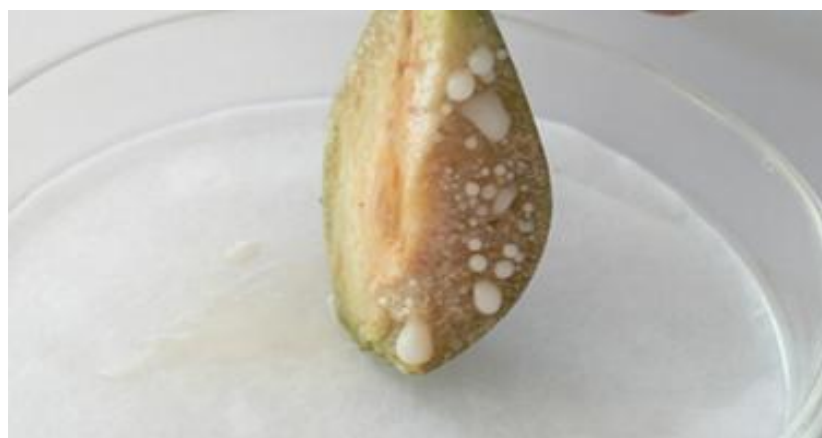


Рисунок Г.15 – Образование капель бактериального экссудата на незрелых плодах груши при искусственном заражении

Примечание – Авторы фотографий: Г.1 – Г.11 – Р. Sobiczewski и др.\*

Г.12 – Г.15 – Е.Ю. Шнейдер.

---

\* По данным, приведенным Sobiczewski P., Deckers T. & Pulawska J. Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control (review of recent literature). Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland, 1997.

**Приложение Д**  
**(справочное)**

**Буферные растворы, используемые при анализах**

Д.1 Фосфатный буфер 50 мМ (PB), pH 7,0 используют для мацерации образца, ресуспендирования осадка при центрифугировании, приготовления бактериальной суспензии.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,26 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 г
Дистиллированная вода	1 л

Для приготовления фосфатного буфера ингредиенты растворяют, доводят до pH 7,0 и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Д.2 Фосфатно-солевой буфер 10 мМ (PBS), pH 7,2 используют для мацерации образца, ресуспендирования осадка при центрифугировании, приготовления бактериальной суспензии, промывки, разведения антител.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	2,9 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,2 г
NaCl	8,0 г
KCl	0,2 г
Дистиллированная вода	до 1 л

Для приготовления фосфатно-солевого буфера ингредиенты растворяют, доводят до pH 7,2 и стерилизуют при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Д.3 Антиоксидантный мацерирующий буфер \*

Поливинилпирролидон (PVP-10)	20 г
Маннит	10 г
Аскорбиновая кислота	1,76 г
Редуцированный глутатион	3 г
PBS 10 мМ pH 7,2	до 1 л

Для приготовления антиоксидантного мацерирующего буфера ингредиенты растворяют, доводят до pH 7,0 и стерилизуют фильтрованием.

Д.4 Фосфатно-глицериновый буфер 0,1 М, pH 7,6 используют как наполнитель под покрывное стекло при микроскопировании для усиления флуоресценции.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O	3,2 г
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,15 г
Глицерин	50 мл
Дистиллированная вода	100 мл

---

\* По данным, приведенным Gorris M.T., Cambra E., López M.M., Paulin J.P., Chartier R. & Cambra M. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Horticulturae no. 411, 1996a.



## Д.5 50X TAE-буфер

Трис	242 г
0,5 м Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0	100 мл
Ледяная уксусная кислота	57,1 мл
Дистиллированная вода	до 1 л

## Д.6 Загрузочный буфер

Бромфеноловый синий	0,025 г
Глицерин	3 г
Дистиллированная вода	10 мл

## Д.7 Промывочный буфер (PBS с Твином), pH 7,2-7,4 (перед добавлением Твина)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,9 г
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 г
NaCl	8,0 г
KCl	0,2 г
Твин 20	0,5 мл
Дистиллированная вода	до 1 л

## Д.8 Субстратный буфер для щелочной фосфатазы

Диэтаноламин	97 мл
Дистиллированная вода	0,8 л

Для приготовления субстратного буфера доводят pH до 9,8 концентрированной HCl, доводят дистиллированной водой до 1 л.

## Д.9 Карбонатный буфер, pH 9,6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 г
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 г
Дистиллированная вода	до 1 л.

## Д.10 Экстракционный буфер \*

Трис HCl, pH 7,5	24,2 г
NaCl	14,6 г
EDTA	9,3 г
SDS	5 г
Поливинилпирролидон (PVP-10)	20 г
Дистиллированная вода	до 1 л

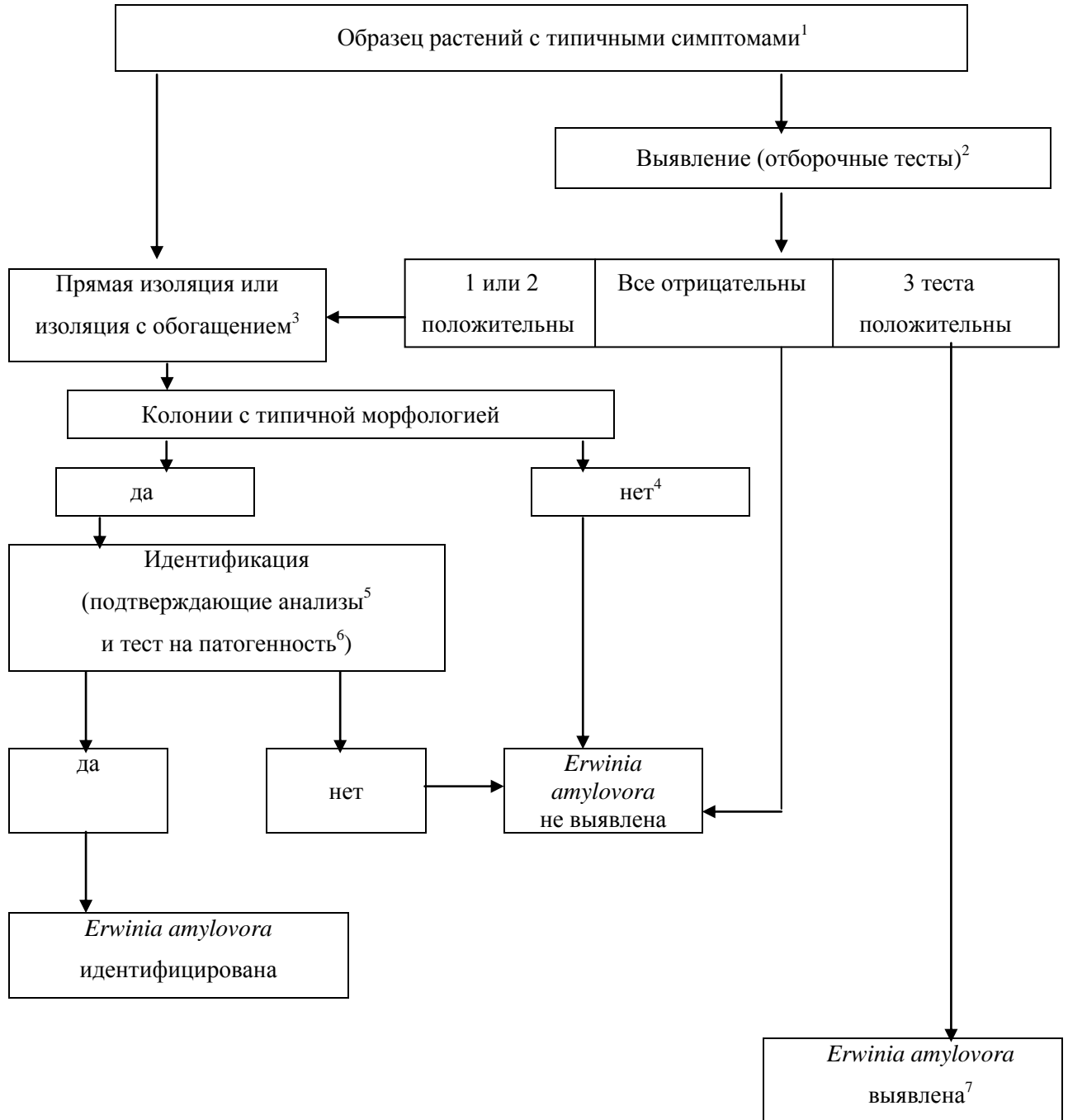
Стерилизовать фильтрованием.

---

\* По данным, приведенным Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C. & López M.M. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. Journal of Microbiological Methods 37, 1999.

Приложение Е  
(рекомендуемое)

Схема выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога  
плодовых деревьев *Erwinia amylovora*  
в образцах растений с симптомами\*



\* По данным, приведенным в Bulletin OEPP/EPPO, v. 34, Diagnostic protocol for regulated pests. *Erwinia amylovora*, PM 7/20 (1), 2004.

Сноски:

1 Описание симптомов приводится в приложении В.

2 Отборочные тесты (см. раздел 6). С их помощью устанавливают предварительный диагноз.

При проведении каждого теста для каждой серии образцов необходимо использовать положительные и отрицательные контроли и тестировать их так же, как образцы.

В качестве отборочных рекомендуется использовать один или два теста, основанных на различных биологических принципах:

- серологические анализы: ИФ-анализ (см. 6.1) и/или ИФА (см. 6.3);

- анализы на основе ПЦР (см. 6.2);

- биологический анализ (см. 6.4) может быть эффективен и достаточно быстр для образцов с активной инфекцией, доступен в условиях недостаточно оснащенной лаборатории, одновременно служит для обогащения образца, в случае образования экссудата (через два-три дня) получают практически чистую культуру возбудителя. Однако надо учитывать, что в случае ослабленности или гибели возбудителя во время вегетации или транспортировки образца, биологический метод даст ложноотрицательный результат. Поэтому, рекомендуется использовать его совместно с методами, позволяющими выявить нежизнеспособного возбудителя (ИФ-анализ (см. 6.1), анализы на основе ПЦР (см. 6.2).

3 Для успешной изоляции (выделения чистой культуры) возбудителя следует использовать свежеприготовленный экстракт образца. Изоляция возбудителя бактериального ожога из образца с симптомами, как правило, не вызывает затруднений, т.к. количество жизнеспособных бактериальных клеток в таком образце обычно велико. Однако, если поражение слишком сильное или, наоборот, условия внешней среды не способствуют активному развитию симптомов ожога, количество живых клеток может быть очень небольшим. В таких случаях, если посеы слишком густые или если высевается много бактерий-антагонистов, следует провести повторное тестирование и/или обогатить образец перед повторной изоляцией (см. 5.6).

Посев на три среды обеспечивает более надежную изоляцию патогена из сложных образцов. В зависимости от количества и состава микроорганизмов в образце, каждая из сред может быть более или менее эффективной. Круговым тестом в нескольких лабораториях были проверены три среды (ССТ, левановая и Кинга Б). Лучшей для изоляции возбудителя бактериального ожога признана левановая среда.

4 Если симптомы типичны, а изоляция не удалась, необходимо ее повторить. В случае повторной неудачной изоляции, если два и более отборочных теста дают положительный результат, следует указать в протоколе лабораторной экспертизы результаты анализов и запросить проведения повторного отбора образцов.

5 Идентификацию чистой культуры проводят не менее чем тремя методами, основанными на различных биологических принципах:

- биохимический анализ (см. 8.1);

- серологические анализы (ИФ-анализ (см. 8.2.1) и/или ИФА-анализ (см. 8.2.2);

ГОСТ (проект RU, первая редакция)

- молекулярные анализы (см. 8.3)
- анализ жирных кислот (см. 8.4).

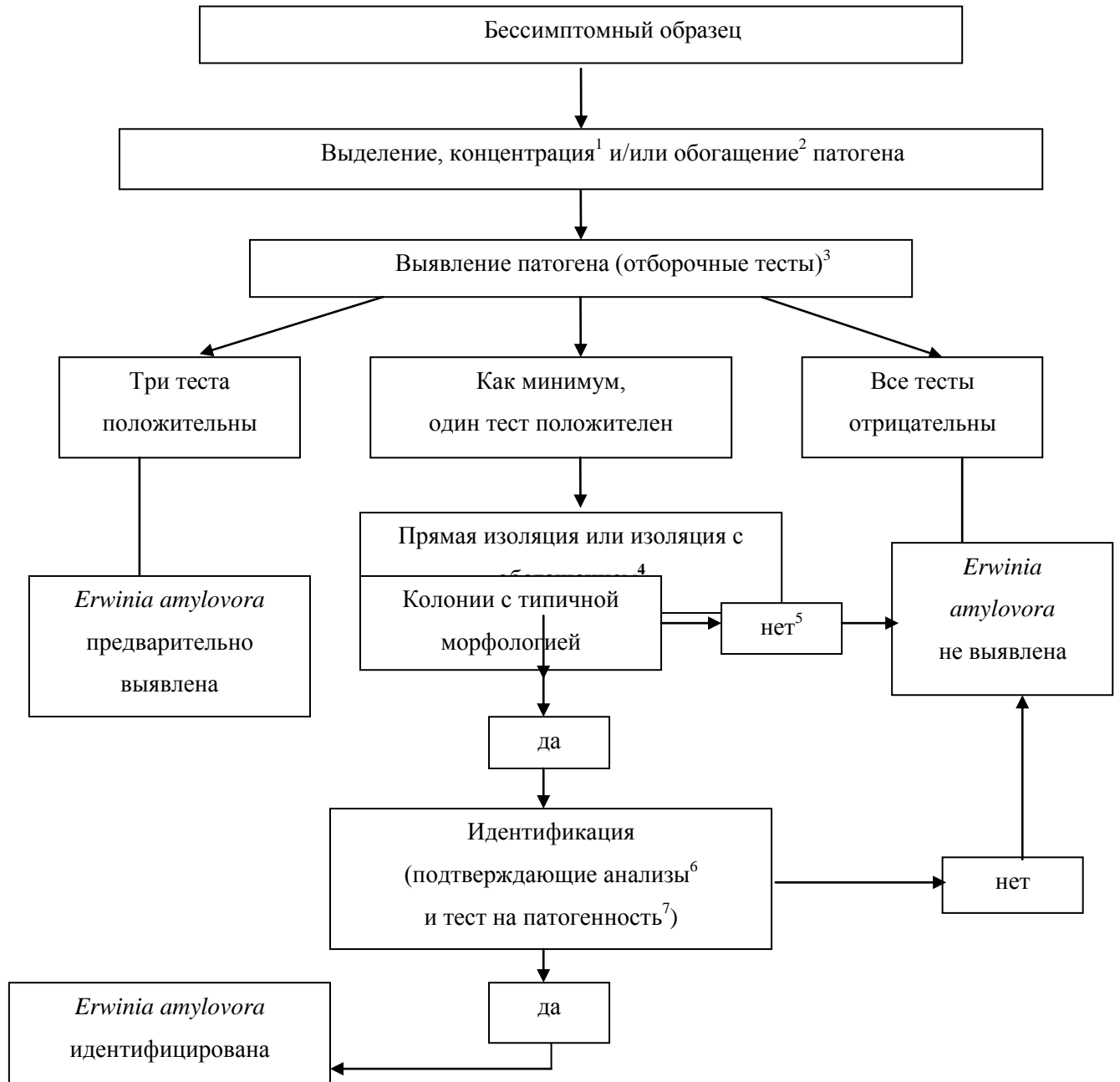
Если имеется несколько образцов из одного места происхождения, допускается проведение полной процедуры идентификации для одного-двух образцов, остальные могут быть идентифицированы двумя-тремя методами без дальнейшего проведения теста на патогенность и секвенирования.

6 Для подтверждения патогенности инокулируют восприимчивые к ожогу плодовых растения подозрительной культурой (см. 8.5).

7 Для положительного выявления возбудителя бактериального ожога в образце необходимы положительные результаты как минимум трех методов, основанных на различных биологических принципах. Использование разных праймеров или поли- и моноклональных антител для одного и того же метода может рассматриваться в качестве отдельных методов. Например, можно использовать ИФ-анализ и два ПЦР-анализа с разными праймерами или ИФ-анализ с моно- и поликлональными антителами и ПЦР-анализ. Выявление с помощью быстрых отборочных тестов без изоляции патогена может применяться при проведении обследований территорий, на которых ранее были выявлены очаги заболевания. Однако рекомендуется провести изоляцию и идентификацию хотя бы для одного образца. В случае выявления нового очага или тестирования образцов, отобранных от партий подкарантинной продукции, необходимо провести изоляцию и идентификацию возбудителя.

**Приложение Ж**  
**(рекомендуемое)**

**Схема выявления и идентификации возбудителя бактериального ожога  
плодовых деревьев *Erwinia amylovora*  
в бессимптомных образцах\***



\* По данным, приведенным в Bulletin OEPP/EPPO, v. 34, Diagnostic protocol for regulated pests. *Erwinia amylovora*, PM 7/20 (1), 2004.

Сноски:

1 Концентрацию патогена проводят методом центрифугирования. Для бессимптомных образцов подкарантинных грузов следует проводить обязательное центрифугирование экстрактов перед проведением прямых отборочных анализов (см. раздел 6) и последующей изоляции (см. раздел 7).

2 В бессимптомных образцах популяция бактерий *Erwinia amylovora* обычно мала. Поэтому в некоторых случаях рекомендуется проводить обогащение образцов (см. 5.6), приготовленных в антиоксидантном буфере\*. Однако в случае экспертизы образцов подкарантинных грузов, ограниченной временными рамками, процедуру обогащения проводить нецелесообразно.

3 Выявление (предварительная диагностика с помощью отборочных анализов). Отборочные тесты ускоряют предварительный диагноз. Это особенно важно для экспертизы образцов ввозимой подкарантинной продукции, что связано с простым транспортом. В качестве отборочных тестов рекомендуется использовать ИФ-анализ и/или flash-ПЦР-анализ, или ПЦР-анализ в формате «Real-time», так как они обладают достаточно высокой чувствительностью, вследствие чего могут быть использованы без обогащения. ПЦР-анализ с детекцией методом электрофореза не рекомендуется использовать в качестве отборочного теста, т.к. велика вероятность получения ложноположительных реакций вследствие контаминации.

ИФ-анализ (см. 6.1) признан надежным отборочным методом. Он более предпочтителен, чем другие серологические тесты вследствие более высокой чувствительности, скорости исполнения и преимуществ визуальной интерпретации морфологии и интенсивности флуоресценции, что дает информацию о специфичности реакции.

ПЦР-анализ (см. 6.2) потенциально очень чувствителен, хотя содержащиеся в экстракте растения вещества могут ингибировать процесс, приводя к ложноотрицательному результату. Поэтому необходимо избавляться от ингибиторов путем выделения и очистки ДНК перед постановкой амплификации. Также для предотвращения ложноотрицательного результата необходимо использовать внутренний контроль амплификации. Для предотвращения контаминации, являющейся причиной ложноположительных результатов, необходима особая аккуратность на каждом этапе подготовки образцов и проведения анализа. При отборе образцов для стерилизации столов, ножей, рук и т.д. необходимо использовать хлорсодержащие растворы, ежедневно облучать помещение ультрафиолетовым светом. Также причиной ложноположительного результата может быть использование неспецифичных праймеров.

Анализы на основе ПЦР с использованием флуоресцентной метки: ПЦР-анализ в формате «Real-time» и flash-ПЦР-анализ (Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая флуоресцентная гибридизация в процессе амплификации) – флуоресцентный ПЦР-

---

\* По данным, приведенным Gorris M.T., Cambra E., López M.M., Paulin J.P., Chartier R. & Cambra M. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. Acta Horticulturae no. 411, 1996a.

анализ с регистрацией результатов по конечной точке реакции. Флуоресцентные ПЦР-анализы имеют преимущество перед электрофорезным, т.к.:

- считывание результатов проводят без открывания пробирок и переноса ампликонов на гель, что решает проблему контаминации ампликонами;
- менее продолжительны и трудоемки;
- позволяют избежать работы с канцерогенным веществом бромистым этидием.

Могут быть использованы как отборочные анализы.

ИФА (см. 6.3) для бессимптомных образцов можно использовать в качестве отборочного только при условии предварительного обогащения образца (см. 5.6).

В случае плохого состояния образца одиночный тест может быть недостаточно чувствителен или надежен для выявления патогена. Поэтому рекомендуется проводить несколько отборочных тестов, основанных на различных биологических принципах. В этом случае рекомендуется проведение изоляции возбудителя из экстракта (см. раздел 7) или обогащение образца (см. 5.6).

В случае экспертизы образцов подкарантинной продукции проводят сначала один отборочный тест (рекомендуется ИФ-анализ). В случае положительного результата ИФ-анализа рекомендуется сначала провести еще один-два отборочных теста (ПЦР-анализ в формате «Real-time» и flash-ПЦР-анализ с различными праймерами).

Если два отборочных теста положительны, проводят изоляцию возбудителя из экстракта (см. раздел 7) или обогащение образца (в случае предположительно низкой концентрации патогена по результатам отборочных тестов) (см. 5.6).

Если положительны два-три и более отборочных теста, а изоляция не удалась или не была проведена, *Erwinia amylovora* считается предварительно выявленной в данном образце, но подтверждение требует изоляции и идентификации патогена. В случае неудачной изоляции, если два и более отборочных теста дают положительный результат, следует указать в протоколе лабораторной экспертизы результаты анализов и запросить проведения повторного отбора образцов.

4 Изоляция может быть затруднена из-за конкуренции или подавления патогена сапрофитными микроорганизмами. Для наилучших результатов изоляцию проводят на трех средах (ССТ, левановой и Кинга Б).

5 В случае положительных результатов отборочных тестов и неудачной изоляции ее необходимо повторить, используя биологический метод или обогащение образца (см.5.6).

6 Чистая культура, предварительно определенная как *Erwinia amylovora*, должна быть подтверждена как минимум тремя методами, основанными на различных характеристиках патогена:

- биохимический анализ (см. 8.1);
- серологические анализы (ИФ-анализ (см. 8.2.1) и/или ИФА-анализ (см. 8.2.2));
- молекулярные методы (см. 8.3);
- анализ жирных кислот (см. 8.4).

**ГОСТ** (проект RU, первая редакция)

7 Необходимо провести заражение восприимчивого растения для подтверждения патогенности культуры (см. 8.5).



## Приложение И (справочное)

### Питательные среды

#### И.1 Среда Кинга Б\*

И.1.1 В состав среды Кинга Б входят:

Пептон	20 г
Глицерин	10 мл
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 г
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,5 г
Агар	15-20 г
Дистиллированная вода	до 1 л

И.1.2 pH среды Кинга Б должен быть в пределах от 7,0 до 7,2.

И.1.3 Среду Кинга Б стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин.

#### И.2 Среда ССТ\*\*

И.2.1 В состав основы среды ССТ входят:

Сахароза	100 г
Сорбит	10 г
Niaproof	1,2 мл
Кристаллвиолет (0,1% спиртовой р-р)	2 мл
Питательный агар	23 г
Дистиллированная вода	до 1 л

И.2.2 pH основы должен быть в пределах от 7,0 до 7,2.

И.2.3 Основу стерилизуют автоклавированием при температуре 115 °С в течение 10 мин, затем остужают до 45 °С, добавляют 2 мл 1% водного раствора нитрата таллия и 0,05 г циклогексида, который является высокотоксичным реагентом. Растворы стерилизуют фильтрованием, используя фильтры с порами от 0,20 до 0,45 мкм.

#### И.3 Левановая среда

И.3.1 В состав левановой среды входят:

Дрожжевой экстракт	2 г
Бактопептон	5 г
NaCl	5 г
Сахароза	50 г

---

\* По данным, приведенным King E.O., Ward M. & Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44, 1954.

\*\* По данным, приведенным Ishimaru E.S. & Klos E.J. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74, 1984.

ГОСТ (проект RU, первая редакция)

Агар 20 г

Дистиллированная вода до 1 л

И.3.2 pH левановой среды должен быть в пределах от 7,0 до 7,2.

И.3.3 Левановую среду стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин.

**И.4 Среда Эйерса\***

И.4.1 В состав среды Эйерса входят:

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1 г

KCl 0,2 г

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 г

Бромтимоловый синий (0,2% раствор) 75 мл

Дистиллированная вода до 1 л

И.4.2 pH среды Эйерса должен быть 7,0.

И.4.3 Среда Эйерса стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин.

**И.5 Соево-триптоновый агар\*\***

И.5.1 В состав среды соево-триптонового агара входят:

Триптон (Difco) 15 г

Соевый пептон 5 г

NaCl 5 г

Агар (Difco) 15 -20 г

Дистиллированная деионизированная вода 1 л

И.5.2 pH соево-триптонового агара должен быть 7,3.

И.5.3 Соево-триптоновый агар стерилизуют автоклавированием при температуре 120 °С в течение 15 мин.

---

\* По данным, приведенным Ayers S.H., Rupp P. & Johnson W.T. A Study of Alkali Forming in Milk. USDA Bulletin no. 782. Washington (US), 1919.

\*\* По данным, приведенным Sasser, M. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In Methods in Phytobacteriology, pp. 199–204. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C., 1990.

**Приложение К**  
**(справочное)**

**Приготовление разведений антител для**  
**иммунофлуоресцентного анализа**

К.1 Для приготовления разведений сыворотки используют PBS. Приготавливают серию последовательных двукратных разведений антител. Для этого вычисляют необходимый объем разведений ( $V$ ), равный  $(N+1) \times 20$  мкл, где  $N$  – количество образцов (включая контроли). Если количество образцов велико, применяют формулу  $(N+2) \times 20$  мкл или округляют объем до большего целого числа для удобства подсчетов.

К.2 Приготавливают ряд двукратных разведений сыворотки одним из следующих способов:

К.2.1 Приготовление двух разведений сыворотки:

- вносят во флакон № 1 PBS в объеме, равном  $1,5V$ ;

- вносят во флакон № 2 PBS в объеме, равном  $V/2$ ;

- приготавливают во флаконе № 1 разведение антител, равное  $T$ , где  $T$  – титр сыворотки, тщательно перемешивают пипетированием (несколько раз набирая и сливая суспензию с помощью автоматической пипетки) или на микроцентрифуге с функцией встряхивания;

- отбирают из флакона № 1 объем, равный  $V/2$ , переносят во флакон № 2, получив таким образом разведение, равное  $T/2$  объемом  $V$ ;

Такой способ позволяет сэкономить 25 % сыворотки.

К.2.2 Приготовление более двух разведений сыворотки:

- вносят во флакон № 1 PBS в объеме, равном  $2V$ ;

- вносят во флаконы № 2, № 3 и т.д. PBS в объеме, равном  $V$ ;

- приготавливают во флаконе № 1 разведение антител, равное  $T$ , где  $T$  – титр сыворотки, тщательно перемешивают;

- отбирают из флакона № 1 объем, равный  $V$ , переносят во флакон № 2, получив таким образом разведение, равное  $T/2$  объемом  $2V$ , тщательно перемешивают;

- отбирают из флакона № 2 объем, равный  $V$ , переносят во флакон № 3, получив разведение, равное  $T/4$  объемом  $2V$  и т.д.

В результате получаем ряд двукратных разведений с концентрациями  $T$ ,  $T/2$ ,  $T/4$  и т.д., объемом  $V$  (последнее объемом  $2V$ )

Ключевые слова: возбудитель бактериального ожога плодовых деревьев, отборочные тесты, молекулярная идентификация, серологическая идентификация, биохимическая идентификация, анализы на основе полимеразной цепной реакции, иммунофлуоресцентный анализ, иммуноферментный анализ, изоляция, тест на патогенность, секвенирование

**Руководитель организации - разработчика:**

Директор ФГБУ «Всероссийский центр  
карантина растений», к.с.-х.н.

У.Ш. Магомедов

**Руководитель разработки:**

Заместитель директора, д.б.н.

М.М. Абасов

**Ответственный исполнитель:**

Начальник отдела стандартизации,  
эксперт по стандартизации

Л.В. Калинина

**Исполнители:**

Заместитель директора

Н.А. Шероколава

Начальник отдела диагностики

Ю.Н. Приходько

Заведующая лабораторией бактериологии

Н.В. Дренова

Заведующий лабораторией молекулярных методов

Е.С. Мазурин

Заместитель начальника отдела стандартизации,  
эксперт по стандартизации

Е.П. Сорокин

Старший научный сотрудник отдела фитосанитарной биологии

Е.Ю. Шнейдер

Инженер-метролог отдела стандартизации,  
эксперт по стандартизации

О.Н. Осауленко

Редактор отдела научно-технической информации

Т.В. Артемьева