
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
202_
(проект, первая
редакция)

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы вирусологического исследования

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения

Москва

Российский институт стандартизации

202_

Предисловие

- 1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)
- 2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 042 «Карантин и защита растений»
- 3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от №
- 4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.rst.gov.ru)

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 202_

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

Подготовка лабораторных проб и методы вирусологического исследования

Plant quarantine. Guidelines of sample preparation for virological diagnostics

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пробы (образцы) подкарантинной продукции и устанавливает методы подготовки лабораторных проб и методы вирусологического исследования.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 34198-2017 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. Общие требования»

ГОСТ 12430-2019 «Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях»

ГОСТ 20562-2013 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Термины и определения»

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный

стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения, сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **проба (образец):** Часть подкарантинной продукции, отобранная для проведения лабораторного исследования;

3.1.2

лабораторное исследование: Исследование образца, отобранного при карантинном фитосанитарном обследовании подкарантинного объекта или досмотре подкарантинной продукции, с целью установления карантинного фитосанитарного состояния

[ГОСТ 34198-2017, пункт 3.2]

3.1.3 **вирусологическое исследование:** лабораторное исследование пробы (образца), направленное на выявление и идентификацию вирусов и/или вирионов;

3.1.4 **навеска:** Количество пробы (образца), отобранное для получения лабораторной пробы требуемых параметров;

3.1.5 **гомогенизация:** Механическое измельчение навески, в ходе которого достигается однородная структура;

3.1.6 **дробление:** Механическое измельчение навески на более мелкие части;

3.1.7 **лабораторная проба:** Навеска, подготовленная соответствующим образом и являющаяся достаточной для проведения лабораторного исследования;

3.1.8 **аналитическая проба:** Суспензия, полученная в результате подготовки лабораторной пробы, и предназначенная для проведения анализа.

3.1.9 **контаминация:** загрязнение пробы (образца) или рабочих поверхностей посторонними микроорганизмами, генетическим материалом из других проб (образцов) (кросс-контаминация) или ПЦР-продуктами;

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ГОСТ Р–

(проект, первая редакция)

ИФА - иммуноферментный анализ;

ИХА - иммунохроматографический анализ;

об/мин – обороты в минуту;

кДНК - комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, конечный продукт реакции обратной транскрипции;

ПЦР - полимеразная цепная реакция;

РНК - рибонуклеиновая кислота.

4 Общие положения

4.1 Объектами вирусологического исследования являются: вегетативные и генеративные части растения, растительная продукция, гербарные экземпляры, прочие пробы (образцы) (почва и грунты, торф, удобрения животного и растительного происхождения, пробирки с растительным экстрактом, смывы с конструкций, дренажная вода, насекомые-переносчики)*.

Примечание

Данный перечень объектов исследования не является исчерпывающим.

4.2 Вирусологическое исследование проводят с целью выявления и идентификации вирусов и вирионов, которые являются определяемым показателем вирусологического исследования и составляют предмет исследования.

4.3 Формирование навесок, метод подготовки лабораторных проб и выбор методов вирусологического исследования осуществляют исходя из вида объекта исследования и предмета исследования.

4.4 Подготовка лабораторной пробы включает формирование навески, подготовку лабораторной пробы, подготовку аналитической пробы с дальнейшим проведением вирусологического исследования.

5 Требования к безопасности, персоналу, пробам (образцам), оборудованию

5.1 Требования к безопасности

5.1.1 Выполнять лабораторные исследования необходимо, соблюдая требования техники безопасности при работе с химическими реактивами и лабораторным оборудованием.

5.1.2 Очистку использованного оборудования и материалов проводят

химическими или физическими методами в соответствии с установленными в лаборатории требованиями.

5.1.3 Обеззараживание и утилизацию использованной посуды, материалов, жидкостей и зараженных проб (образцов) проводят химическими или физическими методами в соответствии с установленными в лаборатории требованиями.

5.2 Требования к персоналу

Персонал, участвующий в вирусологическом исследовании, должен владеть методами подготовки лабораторных проб к вирусологическому исследованию, быть обучен технике обращения с лабораторным оборудованием и допущен к работе на нем.

5.3 Требования к образцам

5.3.1 Перед началом работы с пробой (образцом) проводят проверку соответствия сопроводительным документам.

5.3.2 Поступивший на исследование пробу (образец) осматривают на предмет пригодности к проведению исследования.

Растительный материал должен быть свежим, без признаков гниения, усыхания, наличия плесени. Сгнившие или заплесневевшие пробы (образцы) непригодны для исследования.

5.3.3 Непригодную для исследования пробу (образец) подвергают действиям, предусмотренным внутренней документацией лаборатории.

Пригодную для исследования пробу (образец) осматривают на наличие симптомов (согласно определяемому показателю) и формируют навеску.

5.4 Требования к оборудованию

Оборудование, необходимое для проведения пробоподготовки проб (образцов) для вирусологических исследований, описано в таблице 1.

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

Таблица 1

№ п/п	Необходимое оборудование	Требуемые характеристики оборудования для выполнения теста	Сведения об оборудовании	Назначение	Допускаемые аналоги
Приготовление буфера					
1	Анализатор жидкости	pH 0-14; °C 0-100, погрешность $\pm 0,1$ pH; ± 1 °C	Средство измерения	Измерение pH растворов, сред. буферов	Индикаторные полоски для определения кислотности среды
2	Весы лабораторные электронные	КТ II (0,5-500) г ПГ $\pm (0,1)$ г; (500-2000) г ПГ $\pm (0,2)$ г; (2000-4200) г ПГ $\pm (0,3)$ г	Средство измерения	Измерение массы навески	-
3	Магнитная мешалка	-	Вспомогательное оборудование	Смешивание жидкостей	-
4	Дистиллятор	-	Вспомогательное оборудование	Получение дистиллированной воды	-
5	Дозатор механический одноканальный	V=(100-1000) мкл, погрешность 0,6-3,00 %	Средство измерения	Измерение объема	-
Основное оборудование					
6	Весы лабораторные электронные	КТ II (0,5-500) г ПГ $\pm (0,1)$ г; (500-2000) г ПГ $\pm (0,2)$ г; (2000-4200) г ПГ $\pm (0,3)$ г	Средство измерения	Измерение массы навески	-
7	Микроцентрифуга с охлаждением	От -10 до +40 °C до 5 тыс. об/мин	Испытательное оборудование	Центрифугирование проб	-
8	Мельница с порционной загрузкой	-	Вспомогательное оборудование	Измельчение семенного материала для подготовки проб	Фарфоровые ступки с пестиками

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

9	Гомогенизатор	-	Вспомогательное оборудование	Измельчение растительного материала для подготовки проб	Фарфоровые ступки с пестиками
10	Дозатор механический одноканальный	V=(500-5000) мкл, погрешность, 0,15-0,6 %	Средство измерения	Измерение объема	-
11	Дозатор механический одноканальный	V=(100-1000) мкл, погрешность 0,6-3,00 %	Средство измерения	Измерение объема	-
12	Дозатор механический одноканальный	V=(20-200) мкл, погрешность 0,6-2,5 %	Средство измерения	Измерение объема	-
13	Дозатор механический одноканальный	V=(0,5-10) мкл, погрешность 1,0-2,5 %	Средство измерения	Измерение объема	-
14	Микроцентрифуга Вортекс	-	Вспомогательное оборудование	Встряхивание, центрифугирование и осаждение образцов и реактивов	-
Прочее оборудование					
15	Измеритель комбинированный	От минус 40 °С до +400 °С	Средство измерения	Измерение и хранение показаний температуры	-
16	Термогигрометр	(0-98) % ОВ; (от минус 20 °С до +50 °С); (700-1100) гПа	Средство измерения	Измерение температуры, влажности, давления	-
17	Очиститель обеззараживатель воздуха фотокаталитический-рециркулятор	-	Вспомогательное оборудование	Очищение и обеззараживание воздуха	-
18	Холодильник с морозильной камерой	-	Вспомогательное оборудование	Хранение биологического материала	-
19	Автоклав	-	Вспомогательное оборудование	Аппаратный способ обеззараживания отходов	Условия и методы обеззараживания определяют ИЛ

6 Формирование навески для пробы (образца)

6.1 Общие требования

Отбор навесок от проб (образцов) осуществляют вручную. Работы проводятся в медицинских перчатках.

Образец (пробу) полностью извлекают из пакета, раскладывают на листе чистой бумаги или на дезинфицированном столе и подвергают визуальной проверке.

В случае сильного загрязнения или присутствия следов химической обработки или документальных данных о факте обработки образец промывают под проточной водой и обсушивают бумажными салфетками.

Чтобы не допустить кросс-контаминации при формировании навески, пробы (образцы) открывают и исследуют по одному (по очереди).

В случае, если масса пробы (образца) не позволяет получить необходимую массу навески, то имеющуюся пробу (образец) используют целиком в качестве навески.

6.2 Формирование навески истинных (ботанических) семян

В случае, если обнаружены следы обработки семян химическими средствами, содержащими краситель, семена промывают под проточной водой до тех пор, пока вода не станет прозрачной. Для ускорения процесса промывания семян от продуктов химической обработки не исключено использование детергентов, таких как Твин 20. Инкрустированные семена необходимо предварительно замачивать в воде. В случае тестирования семян, приклеенных на ленту, перед началом анализа необходимо освободить их от побочного материала.

6.3 Формирование навески вегетативных и генеративных частей растений

Отбор осуществляют с помощью стерильного скальпеля, ножа или ножниц.

От симптомного материала отбирают ткани, расположенные на стыке здорового и пораженного участков: на границе пораженной ткани или язвы вырезают участки 0,5-1,0 см. С одревесневших частей перед отбором снимают верхний слой коры. Отмершие участки ткани не отбирают, чтобы избежать попадания в экстракт большого количества сопутствующих микроорганизмов.

Отбор от бессимптомного материала проводят из 5-10 разных участков пробы (образца) – у шейки корня, нижних частей побегов, плодоножки или тканей в непосредственной близости от нее.

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

От образцов вегетирующих растений отбирают участки черешков, основания центральных жилок и кусочки паренхимы листьев, цветки, завязи, плодоножки и сердцевину молодых плодиков, плодовые веточки, побеги, участки коры. Фрагменты растительных тканей нарезают поперек на пластины толщиной 2-3 мм.

Центральные жилки и черешки листьев крупнолистных растений вырезают и измельчают скальпелем. Для травянистых мелко- или узколистных растений листья или побеги нарезают целиком.

Части растения разрезают на небольшие фрагменты, побеги и жилки предварительно расщепляют.

У целых саженцев и подвоев также отбирают кору с корневой шейки и крупных корней, предварительно сняв тонкий поверхностный слой.

Если образец включает небольшое количество мелких растений, измельчают всю надземную часть.

У привитых растений следует отбирать пробы как с привоя (привоев), так и с подвоя, а также, при наличии, со вставок.

От образцов растений, находящихся в состоянии покоя, отбирают почки и участки коры.

Формируют навеску из фрагментов луковиц (верхняя часть и донца). Стерильным скальпелем луковицы разрезают крестообразно вдоль на 4 сегмента. Рекомендуется отделить сухие части. После очистки сочные чешуи раздвигают или отделяют друг от друга и осматривают их на наличие симптомов. При обнаружении характерных симптомов отбирают фрагменты ткани на границе поражения с захватом 1-2 мм больной ткани. От каждой луковицы отбирают сегмент, включающий часть донца. Для крупных луковиц можно использовать 1/8 часть. Мелкие луковицы разрезают вдоль на 2 части, очищают от сухих чешуй (при наличии), осматривают, отбирают 1 часть каждой луковицы. Сегменты луковиц нарезают поперек чешуй на пластины толщиной не более 2 мм. От мелких луковиц и деток отбирают до половины луковицы.

При работе с плодоовощной продукцией, поступившей на исследование, обращают внимание на состояние плода. При наличии яркой симптоматики, комбинация которой может варьироваться в зависимости от растения-хозяина, исследуемого показателя и периода сбора пробы (образца), навеска формируется из

пораженных участков. В случае отсутствия симптомов на плодах, навеску формируют из срезов с нескольких точек. При работе с мелкоплодными томатами срез делается с каждого плода, поступившего на исследование, за счет отсутствия симптоматики, связанной с устойчивостью к вирусу.

6.4 Формирование навески картофеля продовольственного и семенного

Стерильным скальпелем или ножом удаляют кожуру со столонной части клубня таким образом, чтобы стала видна сосудистая ткань. Аккуратно вырезают небольшой (от 3 до 5 мм в диаметре) конический фрагмент сосудистой ткани из области прикрепления stolона. Количество не сосудистой ткани должно быть минимальным.

6.5 Формирование навески из проб, отобранных для проведения мониторинговых работ по уточнению локализации вирусов и/или виридов

Пробы (образцы), предназначенные для уточнения инфекционной нагрузки/степени распространения патогена, не требуют дополнительных манипуляций (насекомые-переносчики, смывы, дренажная вода, субстраты для выращивания растений и почва).

7 Подготовка лабораторных и аналитических проб

7.1 Получение растительных экстрактов

7.1.1 Получение растительных экстрактов из навески истинных (ботанических) семян

Метод гомогенизации

При тестировании истинных (ботанических) семян из образца необходимо сформировать 4 субобразца* по 0,5 г и тестировать каждую навеску отдельно. Сформированная навеска помещается в пакет для гомогенизации или в фарфоровые ступки. К навескам добавляют 20 частей экстрагирующего буфера (Приложение А) и гомогенизируют вручную с помощью пестика или с использованием гомогенизатора.

Полученный гомогенизат переносят с помощью одноканального механического дозатора в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл с соблюдением правил предотвращения контаминации. Образцы центрифугируются при 2000 об/мин и 5 °С в центрифуге с охлаждением в течение 5 минут. Надосадочную жидкость используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

Примечание - Наличие и количество субобразцов зависит от определяемого показателя.

Метод замачивания

Исследуемый образец делят на 3 субобразца* по 10 г и тестируют каждый образец отдельно. Сформированные навески переносят в стаканы и заливают экстрагирующим буфером (Приложение А) по 200 мл. Оставляют на 60 минут, после чего гомогенизируют, используя гомогенизатор или в фарфоровые ступки с пестиком.

Полученный гомогенизат переносят с помощью одноканального механического дозатора в микроцентрифужные пробирки объёмом 2 мл с соблюдением правил предотвращения контаминации. Образцы центрифугируют при 2000 об/мин и 5 °С в центрифуге с охлаждением в течение 5 минут. Надосадочную жидкость используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

Примечание - Наличие и количество субобразцов зависит от определяемого показателя.

Метод дробления

При тестировании истинных (ботанических) семян злаковых и бобовых культур необходимо сформировать 3 субобразца по 5 г и исследовать их по отдельности. Полученные субобразцы измельчают в мельнице с порционной загрузкой (допускается использование иного оборудования для измельчения пробы (образца)), после чего переносят в пробирки по 50 мл. Из каждого гомогенизированного образца отбирают навеску 1 г в пробирку 15 мл и добавляют 10 мл экстрагирующего буфера (Приложение А). Измельченный образец перемешивают с буфером на микроцентрифуге вортексе, после чего инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа для осаждения осадка.

После инкубации пробы (образца) надосадочную жидкость отбирают при помощи одноканального механического дозатора и используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.1.2 Получение растительных экстрактов из навески вегетативных и генеративных частей растений

При тестировании вегетативных и генеративных частей растений формируют лабораторную пробу в диапазоне взвешивания от 0,5 до 1,0 г. Сформированную

навеску измельчают и помещают в пакет для гомогенизации или в фарфоровую ступку. К навеске добавляют 20 частей экстрагирующего буфера (Приложение А) и гомогенизируют вручную с помощью пестика или с использованием гомогенизатора.

Полученный гомогенизат переносят с помощью одноканального механического дозатора в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл с соблюдением правил предотвращения контаминации. Образцы центрифугируют при 2000 об/мин и 5 °С в центрифуге с охлаждением в течение 5 минут. Надосадочную жидкость используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.2 Подготовка аналитических проб, отобранных для проведения мониторинговых работ по уточнению локализации вирусов и/или вирионов

7.2.1 Метод подготовки аналитической пробы (образца) смывов

Перед началом работы на штатив расставляют пробирки объемом 1,5-2 мл, нумеруют пробирки. В каждую пробирку вносят по 500 мкл экстрагирующего буфера (см. Приложение А). Зонд-тампоны перемещают в подготовленные пробирки с буфером, в соответствии с нумерацией. Лишняя часть зонда срезают стерильными ножницами так, чтобы крышка пробирки свободно закрывалась.

Закрытые пробирки с зонд-тампонами инкубируют в холодильной камере в течение 30-40 минут, после используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.2.2 Метод подготовки проб (образцов) дренажной воды

Для проведения лабораторных исследований на наличие вирусов и/или вирионов в дренажной воде, проба (образец) воды отбирают в объеме, необходимом для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.2.3 Метод получения аналитической пробы от насекомых-переносчиков

Поступившего на лабораторные исследования насекомого-переносчика переносят в пробирку объемом 5 мл, после чего вносят 1 мл буфера (см. Приложение А) и инкубируют в течение 40 минут в холодильной камере.

Получившуюся суспензию отбирают одноканальным механическим дозатором в количестве, необходимом для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.2.4 Метод подготовки аналитической пробы (образца) субстрата для выращивания растений

Отобранный образец субстрата взвешивают и помещают в пробирку объемом 50 мл, в которую внесли экстрагирующий буфер в соотношении 20 мл экстрагирующего буфера на 1 г субстрата и инкубируют в течение 40 мин. Надосадочную жидкость отбирают одноканальным механическим дозатором в количестве, необходимом для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.2.5 Метод подготовки аналитической пробы (образца) почвы

Данный вид исследования характерен для почвообитающих вирусов. Исследуемый образец взвешивают и заливают буфером (см. Приложение А) в соотношении 1 г почвы на 20 мл экстрагирующего буфера, после чего инкубируют 40 минут в холодильной камере.

Надосадочную жидкость отбирают при помощи одноканального механического дозатора и используют для постановки ИФА, выделения РНК с последующим анализом молекулярно-генетическими методами.

7.3 Подготовка аналитических проб при тестировании молекулярно-генетическими методами

7.3.1 Выделение РНК

Выделение нуклеиновых кислот производят коммерческими наборами реактивов в соответствии с инструкциями производителя.

При выделении тотальной РНК должны быть использованы следующие контроли:

1. Отрицательный контроль выделения (для контроля контаминации при экстракции нуклеиновых кислот) – образец не зараженного растения анализируемого вида или стерильный экстрагирующий буфер.

2. Положительный контроль выделения (для контроля качества экстракции нуклеиновых кислот) – зараженное вирусом растение.

Получившиеся контроли тестируют наравне с исходными образцами.

Выделенную РНК хранят до окончания исследования при температуре от -18 до -22 °С. В случае необходимости повторного тестирования образец РНК размораживают при комнатной температуре. Перед внесением РНК в реакционную

ГОСТ Р–

(проект, первая редакция)

смесь пробирки с РНК встряхивают на вортексе, а затем осаждают капли кратковременным центрифугированием.

По окончании лабораторного исследования лабораторные пробы, в которых исследуемый показатель не выявлен, подлежат утилизации согласно внутренней документации лаборатории. Лабораторные пробы, в которых исследуемый показатель выявлен, подлежат хранению при температуре от -20 до -80 °С.

7.3.2 Синтез первой цепи комплементарной ДНК на матрице РНК (реакция обратной транскрипции)

Обратную транскрипцию проводят в виде отдельной операции при постановке ПЦР в двухэтапном формате.

Реакцию обратной транскрипции для синтеза первой цепи комплементарной кДНК проводят коммерческими наборами реактивов в соответствии с инструкциями производителя.

Методы вирусологических исследований

7.1 Серологические методы

Белок-ориентированные методы, сущность которых заключается в образовании комплекса «антиген-антитело».

7.1.1 Иммунохроматографический анализ (ИХА)

Метод, основанный на тонкослойной хроматографии, сущность которого заключается в быстром обнаружении вируса в биологическом материале (экстракте).

7.1.2 Иммуноферментный анализ (ИФА)

Высококчувствительный серологический анализ на твердом носителе, сущность которого заключается в качественном определении искомого объекта за счет специфической реакции, результат которой визуализируется и усиливается, при обнаружении, за счет ферментной активности.

7.2 Молекулярно-генетические методы исследования

Методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот.

7.2.1 ПЦР-анализ

Обнаружение генетического материала вирусов и/или вирионов, основанный на использовании ПЦР-анализа с тотальной РНК (кДНК), выделенной из аналитической пробы.

7.2.2 Секвенирование

ГОСТ Р–
(проект, первая редакция)

Метод позволяет проводить идентификацию вирусов и/или вирионов посредством секвенирования продуктов, полученных в результате ПЦР и сравнения полученных последовательностей с помощью баз данных генетических последовательностей.

7.3 Биологический метод

7.3.1 Тест на растениях-индикаторах

Метод основан на заражение вирусом растения-хозяина и отслеживание появления характерной для фитопатогена симптоматики.

7.4 Метод микроскопирования

7.4.1 Электронная микроскопия

Позволяет увидеть вирусные частицы при большом увеличении. Разделяется на прямой метод (окрашенная капля экстракта рассматривается в трансмиссионном электронном микроскопе) и метод негативного контрастирования (окрашивание тяжелыми металлами для изучения формы вируса).

Приготовление буфера для проведения пробоподготовки проб (образцов)

Приготовление натрий-фосфатного буфера (PBS)

В мерной колбе вместимостью 1000 см³ с 800 см³ дистиллированной воды растворяют 8 г натрия хлорида, 0,2 г калия хлорида, 2,9 г натрия гидрофосфат додекагидрата, 0,2 г калия дигидроортофосфата. Доводят дистиллированной водой до 1000 см³ и перемешивают. Проверяют, равен ли рН натрий-фосфатный буфер 7,3±0,1.

Срок хранения натрий-фосфатного буфера в холодильнике при температуре от 2 до 5 °С – не более 5 дней.

Приготовление стандартного экстрагирующего буфера (буфер для гомогенизации образцов)

В мерную колбу вместимостью 500 см³ наливают 400 см³ промывочного буфера, добавляют 10 г поливинилпирролидона (М.м. 40 тыс.) и 1 г бычьего сывороточного альбумина. Смесь перемешивают и доводят водой до объема 500 см³.

Срок хранения экстрагирующего буфера в колбе в холодильнике при температуре от 2 до 4 °С – не более 2 дней.

Библиография

1. ГОСТ Р 1.2-2020 «Стандарты национальные Российской Федерации. Правила разработки, утверждения, обновления, внесения поправок и отмены»;
2. ГОСТ Р 1.5-2012 «Стандарты национальные. Правила построения, изложения, оформления и обозначения»;
3. ГОСТ 1.5-2001 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению»;
4. ГОСТ 34198-2017 «Межгосударственный стандарт. Карантин растений. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. Общие требования»;
5. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 10.05.2016 № 41 «Об утверждении порядка лабораторного обеспечения карантинных фитосанитарных мер»;
6. Федеральный закон от 21.07.2014 № 206-ФЗ «О карантине растений»;
7. МСФМ № 27 «Диагностические протоколы», (ФАО, 2021);
8. EPPO/OEPP PM 7/113 (1) (2013) Pepino mosaic virus OEPP/EPPO Bulletin, 43, 2013 (1), 94-104;
9. EPPO/OEPP PM 7/30 (3) (2021) Beet necrotic yellow vein virus EPPO Bulletin, 52, 2022, 1-193.

Ключевые слова: карантин растений, проба (образец), лабораторная проба, аналитическая проба, вирусологическое исследование
