

ФИТОСКРИН - технология
молекулярно-генетической
диагностики возбудителей
заболеваний растений

Потенциальный экономический ущерб от карантинных вредных организмов в России (при условии заражения 50% культуры возбудителем)

Культура	Площадь посева, млн. Га	Ежегодный валовый сбор, млн. тонн	Возбудитель	Ущерб, млрд. руб.
Зерновые	45	85	Индийская головня пшеницы <i>Neovossia indica</i> (Mitra) Mundkur	14
			Бактериальное увядание кукурузы <i>Pantoea stewartii subs. stewartii</i> (Smith) Mergaert et al.	2,825
Картофель	2	20-30	Андийский латентный тимовирус картофеля Potato Andean latent tymovirus	25,9
			Андийская крапчатость картофеля Potato Andean mottle comovirus	22,9
			Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	25,9
Плодовые	0,5	2,5 – 3,0	Бактериальный ожог плодовых <i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.	16,7
			Шарка слив Plum pox potyvirus	1,05
			Фитофтороз корней малины и земляники <i>Phytophthora fragariae</i> Hickman	1,3

Сравнение экспресс-методов диагностики

Параметры/Методы	ИФА-ELISA	ПЦР	ПЦР-КТ	ПЦР-РВ
Время	3 часа	5 часов	3 часа	3 часа
Стоимость (без учета расходных материалов и рабочего времени), руб/тест	16 DSMZ	150 АгроДиагностика	147 АгроДиагностика	100 ВНИИСБ + Синтол
Чувствительность, КОЕ/мл	10000-100000	1000	1000	1000
Специфичность, %	60-70	99	99	99
Возможность одновременного выявления нескольких патогенов	нет	нет	нет	да
Возможность выявления любых патогенов	нет	да	да	да
Удобство	Не требует специального помещения, оборудования	Требуется помещение с 3 зонами и оборудованием, квалифицированный персонал	Требуется помещение с 2 зонами и оборудованием, квалифицированный персонал	Требуется помещение с 2 зонами и оборудованием

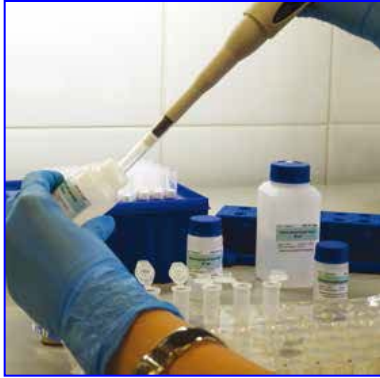
ФИТОСКРИН* - технология быстрой молекулярно-генетической диагностики возбудителей заболеваний растений

- высокая достоверность результатов
- полный цикл исследования
- испытанные наборы для выявления актуальных возбудителей
- удобное программное обеспечение
- экономичность
- автоматизация
- обучение на базе разработчика и на базе заказчика
- комплектация и запуск лаборатории «под ключ»



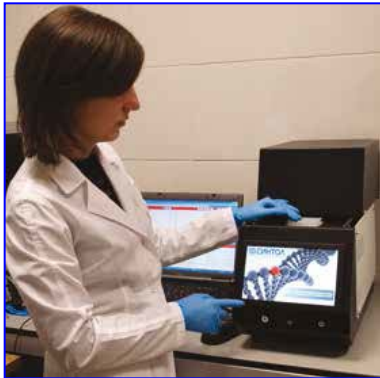
* Технология разработана совместно ВНИИСБ Россельхозакадемии и компанией Синтол

Технология «ФИТОСКРИН» состоит из 3-х основных этапов:



I этап

Выделение ДНК и РНК



II этап

ПЦР в реальном времени
ОТ – ПЦР в реальном времени

III этап

Автоматическая обработка
результатов анализа

РЕЗУЛЬТАТ											
№	Дат.	Объект	Результат	CFRMS	CFRMS	CFRMS	CFRMS	CFRMS	CFRMS	CFRMS	Действие
1	А1	1000	1000	СМ5	10,39	12,61	+	*	ДН	Результат ОТ (реальное время)	Анализ завершён
2	А2	1000	1000	СМ5	-	12,62	-	*	ВН	Результат ОТ (реальное время)	Анализ завершён
3	А3	1000	1000	СМ5	-	12,61	-	*	ВН	Результат ОТ (реальное время)	Анализ завершён
4	А4	100	1001	СМ5	14,51	12,72	+	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён
5	А5	100	1002	СМ5	-	12,68	-	*	ВН	ДНК СМ5 не обнаружена	Анализ завершён
6	А6	100	1003	СМ5	13,35	12,68	+	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён
7	А7	100	1004	СМ5	11,31	12,14	+	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён
8	А8	100	1005	СМ5	12,59	12,71	+	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён
9	В1	100	1006	СМ5	36	12,89	?	*	???	Обнаружены соматические клетки ДНК СМ5	Повторить исследование
10	В2	100	1007	СМ5	15,68	11,61	?	*	???	Обнаружены соматические клетки ДНК СМ5	Повторить исследование
11	В3	100	1008	СМ5	11,71	12,41	?	*	???	Обнаружены соматические клетки ДНК СМ5	Повторить исследование
12	В4	100	1009	СМ5	14,99	12,47	?	*	???	Обнаружены соматические клетки ДНК СМ5	Повторить исследование
13	В5	100	10010	СМ5	13,49	12,64	?	*	???	Обнаружены соматические клетки ДНК СМ5	Повторить исследование
14	В6	100	10011	СМ5	17,5	12,68	+	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён
15	В7	100	10012	СМ5	17,49	12,61	-	*	ДН	ДНК СМ5 обнаружена	Анализ завершён

I этап

Набор «ФИТОСОРБ»

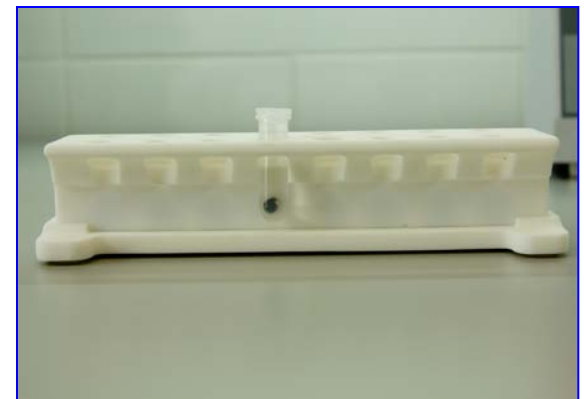
Использование оригинальных магнитных частиц, покрытых кремниевым олигомером и оптимизированных реагентов обеспечивает получение высокоочищенного препарата нуклеиновых кислот - ДНК и РНК.....

Выделение вирусной РНК на магнитных частицах



I этап

.... в ручном режиме с помощью магнитного штатива:



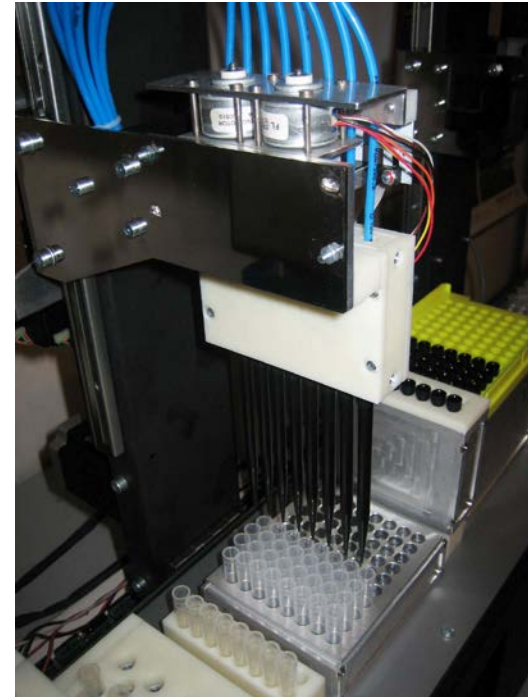
Рекомендуется при потоке анализов – не более 48 образцов в день

I этап

... в автоматическом режиме с помощью роботизированных станций:



Tecan Freedom EVO, Швейцария



**Система Автоматического Выделения
РАСКАпывания 8-ми канальная - САВРАСКА-08, Россия**

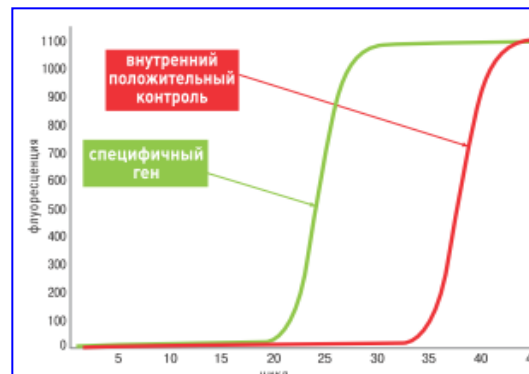
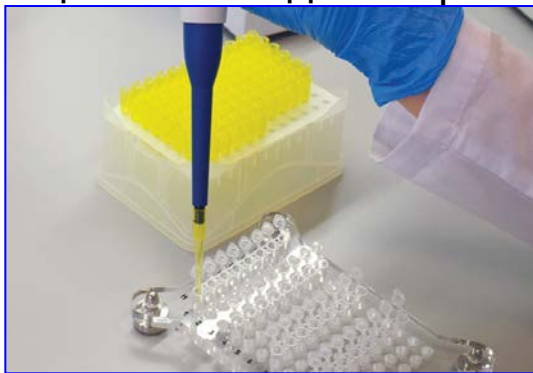
Рекомендуется при потоке анализов – более 48 образцов в день

II этап

ПЦР в реальном времени ОТ – ПЦР в реальном времени

Обнаружение ДНК или РНК фитопатогенов происходит с высокой точностью, чувствительностью и достоверностью, присущими методу ПЦР.

Для выявления РНК-содержащих вирусов и виридов проводятся совмещённые в одной пробирке реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ.



III этап

Автоматическая обработка результатов анализа

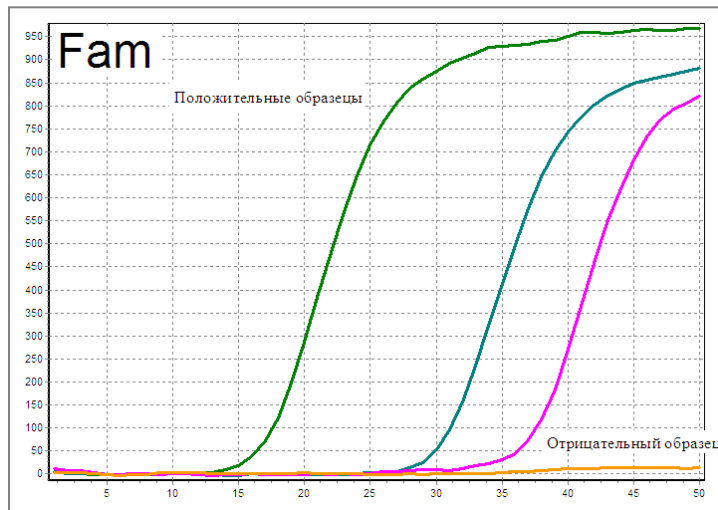
Программное обеспечение прибора ПЦР-РВ АНК-32 (Россия) позволяет автоматически формировать протоколы исследований

РЕЗУЛЬТАТ

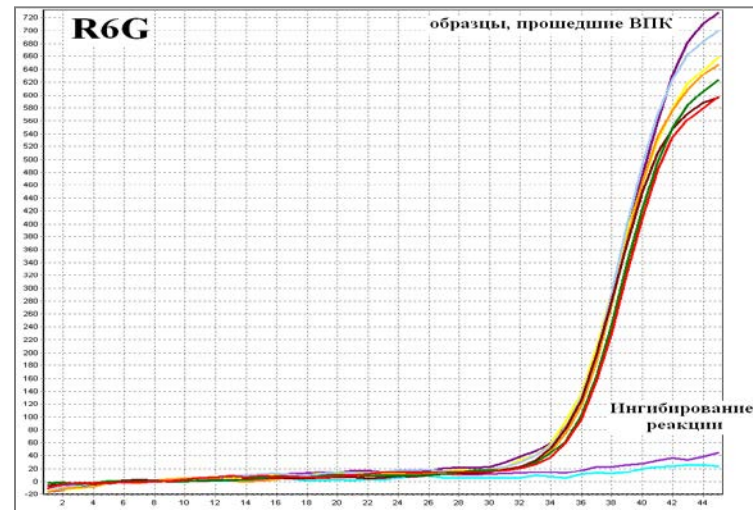
№	Поз.	Тип	Описание	Реактор	Ct FAM	Ct R6G	FAM	R6G	Наличие ДНК/РНК в образце	Вывод	Действие
1	A1	ПКО	ПКО	CMS	30,39	32,61	+	+	ДА	Результат по ПКО достоверен	Анализ завершен
2	A2	ОКО	ОКО	CMS	-	31,62	-	+	Нет	Результат по ОКО достоверен	Анализ завершен
3	A3	ОКО-в	ОКО-в	CMS	-	32,81	-	+	Нет	Результат по ОКО достоверен	Анализ завершен
4	A4	ИО	ИО1	CMS	34,51	32,72	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен
5	A5	ИО	ИО2	CMS	-	32,65	-	+	Нет	ДНК CMS не обнаружена	Анализ завершен
6	A6	ИО	ИО3	CMS	33,35	32,69	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен
7	A7	ИО	ИО4	CMS	33,31	32,44	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен
8	A8	ИО	ИО5	CMS	33,59	32,51	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен
9	B1	ИО	ИО6	CMS	36	32,89	?	+	???	Обнаружены единичные копии ДНК CMS	Повторить исследование
10	B2	ИО	ИО7	CMS	35,68	31,01	?	+	???	Обнаружены единичные копии ДНК CMS	Повторить исследование
11	B3	ИО	ИО8	CMS	35,74	32,41	?	+	???	Обнаружены единичные копии ДНК CMS	Повторить исследование
12	B4	ИО	ИО9	CMS	35,99	32,67	?	+	???	Обнаружены единичные копии ДНК CMS	Повторить исследование
13	B5	ИО	ИО10	CMS	35,49	32,64	?	+	???	Обнаружены единичные копии ДНК CMS	Повторить исследование
14	B6	ИО	ИО11	CMS	17,5	32,68	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен
15	B7	ИО	ИО12	CMS	17,59	32,63	+	+	ДА	ДНК CMS обнаружена	Анализ завершен



Для разработки наборов реагентов использовались уникальные и рекомендованные праймеры «Европейской и средиземноморской организацией по карантину и защите растений» (EPPO), а также реактивы производства компании «Синтол».



ДНК-зонд, меченный флуоресцентным красителем FAM позволяет детектировать выбранный фрагмент генома патогена.



Для контроля прохождения реакции ПЦР-РВ в каждой пробирке одновременно с реакцией обнаружения ДНК (или РНК) возбудителя проходит реакция обнаружения ДНК (или РНК) внутреннего положительного контроля (ВПК) – синтетического РНК транскрипта (для ОТ-ПЦР-РВ) или плазмидной ДНК (для ПЦР-РВ).

В ходе испытаний наборов реагентов определялись следующие характеристики:

- - аналитическая специфичность
- - аналитическая чувствительность
- - аналитическая повторяемость
- - аналитическая воспроизводимость



При проведении лабораторных валидационных испытаний использовались штаммы, вирусы и вириоды фитопатогенов из коллекции ФГБУ «ВНИИКР», а также коллекции DSMZ (Германия).



Аналитическая специфичность набора реагентов

«RALSTONIA SOLANACEARUM»

Использовалась ДНК возбудителей:

встречающихся на данном растении-хозяине –

7 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2;

2 штамма вида *Ralstonia solanacearum* I филотип, раса 1;

5 штаммов *Dickeya* sp.,

3 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*,

ДНК близкородственных и сопутствующих

микроорганизмов –

2 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*),

6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов -*Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*, *Xanthomonas fragariae*.



«CLAVIBACTER MICHIGANENSIS»

Использовалась ДНК возбудителей:

встречающихся на данном растении-хозяине-

3 штамма вида *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*;

5 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2;

5 штаммов *Dickeya* sp.,

ДНК близкородственных и сопутствующих

микроорганизмов –

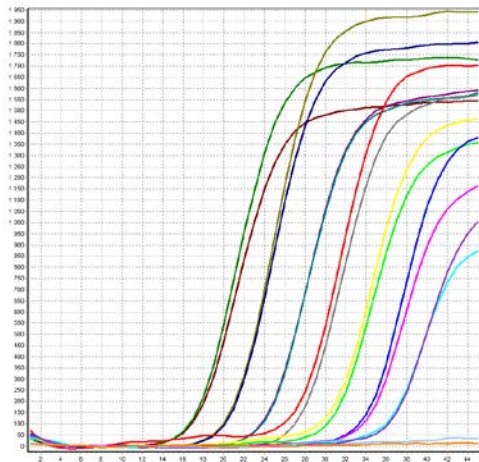
4 штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

и 6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* - Pss1, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas fragariae*).

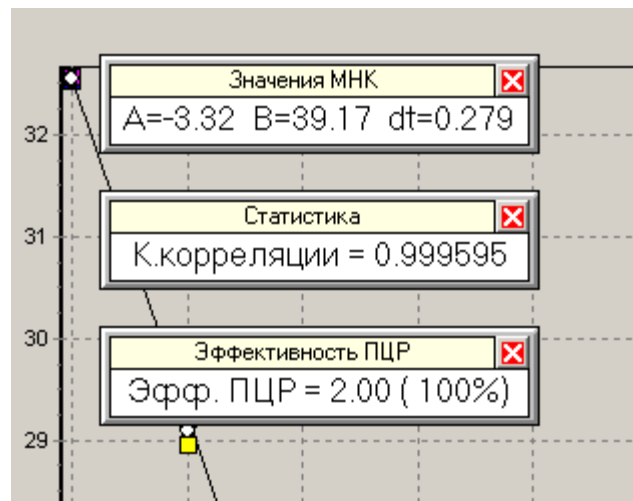
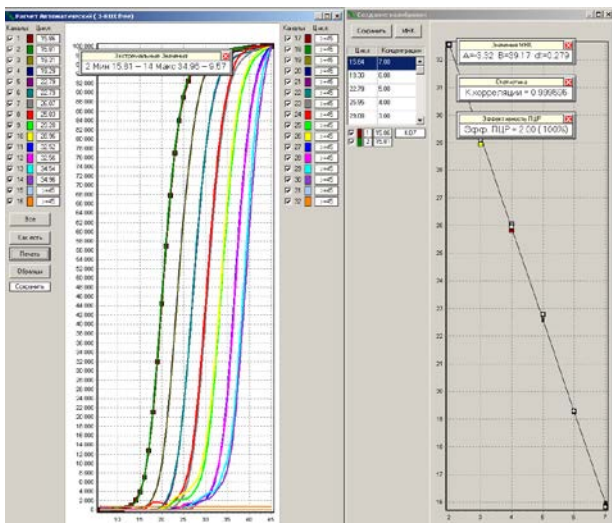
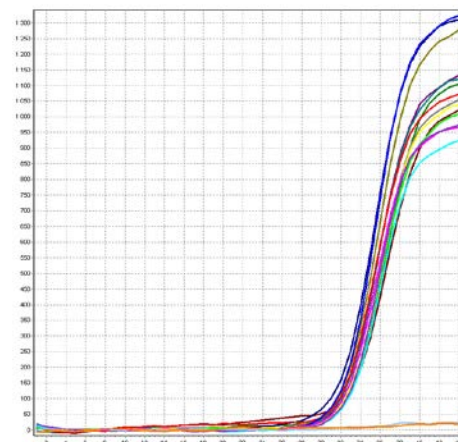


Аналитическая чувствительность набора реагентов

У вирус картофеля – канал **FAM**



ВПК – канал **R6G**



Результаты испытаний наборов реагентов

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

не более $3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл для выявления *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum*

не более $5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл для выявления *Ralstonia solanacearum*

в пределах 5-ого и 6-ого разведения РНК, выделенной из растения со средней степенью зараженности для выявления вирусов и вириода веретеновидности клубней картофеля

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

со всеми положительными образцами был получен положительный результат

со всеми нецелевыми образцами был получен отрицательный результат

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость результатов исследований, полученных с помощью всех наборов реагентов серии «ФИТОКАРАНТИН-РВ» составляет – не менее 99%.

ПОВТОРЯЕМОСТЬ

Повторяемость результатов исследований, полученных с помощью набора всех наборов реагентов серии «ФИТОКАРАНТИН-РВ» составляет – не менее 99%.

Основные характеристики разработанных наборов реагентов

- быстрота анализа – 4 часа;
- совмещение стадии обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в одной пробирке;
- готовые реакционные смеси;
- исключение ложноотрицательных результатов благодаря наличию реакции внутреннего положительного контроля;
- специфичность обнаружения возбудителя - более 99%;
- высокая чувствительность обнаружения ДНК и РНК возбудителя;
- высокая (более 90%) эффективность прохождения реакции ОТ-ПЦР-РВ и ПЦР-РВ.
- могут быть использованы в службе фитосанитарного надзора и карантина растений, а также в практике других профильных испытательных лабораторий

Разработаны наборы для диагностики широкого спектра возбудителей заболеваний картофеля

1. Бурая гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum*)
2. Кольцевая гниль картофеля (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum*)
3. Вирус веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid)
4. Вирус X картофеля (PVX)
5. Вирус Y картофеля (PVY)
6. Вирус S картофеля (PVS)
7. Вирус скручиваемости листьев картофеля (PLRV)
8. Вирус M картофеля (PVM)
9. Вирус A картофеля (PVA)
10. Андийский вирус крапчатости картофеля (APMoV)
11. Андийский латентный вирус картофеля (APLV)
12. Бледная картофельная нематода (*Globodera pallida*)
13. Золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis*)



Благодарю за внимание!

