НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин біотехнології та екології

ПОГОДЖЕНО	**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**
Декан факультету захисту рослин, біотехнології та екології	**Завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття**
_____ Юлія КОЛОМІЄЦЬ	**_____ Олена КВАСКО**
«___»_____20__ р.	**«___»_____20__ р.**

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Створення референс-панелі позитивних контролів для ІФА-діагностики поширених рослинних вірусів**»**

Спеціальність 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія і біоінженерія»

Гарант освітньої програми
Кандидат біологічних наук, доцент _____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи
Кандидат біологічних наук _____ **Оксана ТАРАН**
(підпис)

Виконала _____ **Маргарита ПАУК**
(підпис)

Київ – 2026

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСТИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин біотехнології та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття
_____ Олена КВАСКО
«___»_____20__ р.

З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ БАКАЛАВРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
ЗДОБУВАЧУ
Паук Маргариті Сергіївні

Спеціальність 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «**Біотехнології та біоінженерія»**

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи «Створення референс-панелі позитивних контролів для ІФА-діагностики поширених рослинних вірусів» затверджена наказом від «30» жовтня 2025 року № 2596 «С»
Термін подання завершеної роботи на кафедру «22» травня 2026 р.
Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: рослини тютюну та перцю сорту Самсун, віруси ВТМ та УВК, ІФА, ліофілізація, літературні та інтернет джерела, методики досліджень.
Перелік питань, що підлягають дослідженню:
1. Отримати біомасу вірусів ВТМ та УВК у рослинах тютюну;
2. Перевірка ефективності методів консервації інфікованого матеріалу;
3. Спостерігання змінення антигенної активності зразків після різних способів консервації.

Дата видачі завдання «10» вересня 2026 р.

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи **Оксана ТАРАН**

(підпис)

Завдання взяла до виконання _____ **Маргарита ПАУК**
(підпис)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на тему «Створення референс-панелі позитивних контролів для ІФА-діагностики поширених рослинних вірусів» в обсязі 60 сторінках комп'ютерного тексту формату А4, містить 4 таблиці, 4 діаграми, 53 використаних джерела.

Перелік ключових слів: ПОЗИТИВНІ КОНТРОЛІ, РОСЛИННІ ВІРУСИ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, DAS-ELISA, РЕФЕРЕНС-ПАНЕЛЬ, ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ, Y-ВІРУС КАРТОПЛІ, ОПТИЧНА ГУСТИНА, ДЕСИКАЦІЯ, ЛІОФІЛІЗАЦІЯ, АНТИГЕННА АКТИВНІСТЬ, КОНСЕРВАЦІЇ ВІРУСОВМІСНОГО МАТЕРІАЛУ, СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА.

Мета дослідження полягає у створенні стабільної референс-панелі позитивних контролів на основі антигенів ВТМ та YВК та порівняльній оцінці ефективності різних методів консервації інфікованого рослинного матеріалу для забезпечення тривалого зберігання їхньої імуногенної активності в ІФА.

Об'єкт дослідження: процес збереження імуногенних властивостей антигенів вірусу тютюнової мозаїки та Y-вірусу картоплі у детермінованих станах рослинного матеріалу залежно від методу консервації та терміну зберігання.

Предмет дослідження: динаміка значень оптичної щільності (OD в ІФА-тестах), антигенний титр вірусів та стабільність їхніх капсидних білків у заморожених, десикованих та ліофілізованих зразках.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, біологічні, фізико-хімічні, серологічні та статистичні.

Одержані результати: підтверджено ефективність створених референс-панелей ВТМ і YВК та збереження їх антигенної активності протягом 6 місяців. Встановлено, що метод низькотемпературної десикації є більш ефективним для тривалого зберігання вірусовмісного матеріалу, ніж заморожування.

ABSTRACT

The qualification work was carried out on topic “Creation of a reference panel of positive controls for ELISA diagnostics of common plant viruses” in the amount of 60 pages of computer text in A4 format, contains 4 tables, 4 diagrams, 53 sources used.

KEYWORDS: PLANT VIRUSES, ELISA, DAS-ELISA, POSITIVE CONTROLS, REFERENCE PANEL, TOBACCO MOSAIC VIRUS, POTATO VIRUS Y, DESICCATION, LYOPHILIZATION, ANTIGENIC ACTIVITY, SEROLOGICAL DIAGNOSTICS, PRESERVATION.

The purpose of the study is to create a stable reference panel of positive controls based on TMV and PVY antigens and to compare the effectiveness of various methods of preservation of infected plant material to ensure long-term storage of their immunogenic activity in ELISA.

Object of the study: the process of preserving the immunogenic properties of tobacco mosaic virus and potato virus Y antigens in deterministic states of plant material depending on the method of preservation and storage period.

Subject of the study: dynamics of optical density values (OD in ELISA tests), antigenic titer of viruses and stability of their capsid proteins in frozen, desiccated and lyophilized samples.

The work used such research methods as biotechnological, biological, physicochemical, serological and statistical.

Results obtained: the effectiveness of the created reference panels of TMV and PVY and the preservation of their antigenic activity for 6 months were confirmed. It was established that the low-temperature desiccation method is more effective for long-term storage of virus-containing material than freezing.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 8

ВСТУП 10

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 13

1.1. Загальна характеристика рослинних вірусів 13

1.1.1. Класифікація вірусів що вражають культурні рослини (TMV, PVY, PVM тощо) 13

1.1.2. Вірус тютюнової мозаїки (Tobacco mosaic virus, TMV) 14

1.1.3. М-вірус картоплі (Potato virus M, PVM) 15

1.1.4. Порівняльна характеристика РНК-вмісних та ДНК-вмісних рослинних вірусів 16

1.1.5. Основні шляхи передачі та симптоматика 16

1.1.6. Економічне значення вірусних хвороб у сільському господарстві 18

1.1.7. Значення вірусних інфекцій в Україні 18

1.2. Методи діагностики рослинних вірусів 19

1.2.1. Короткий огляд традиційних методів: біологічні проби, електронна мікроскопія 19

1.2.2. Молекулярні методи: ПЛР, RT-PCR, LAMP 20

1.2.3. Серологічні методи: ELISA (DAS, непряма ІФА) 21

1.2.4. Порівняння чутливості, доступності та специфічності 23

1.3. Принципи DAS-ELISA та її застосування 23

1.3.1. Механізми роботи DAS-ELISA: антитіла, кон’югати, субстрати 23

1.3.2. Переваги DAS-ELISA у фітовірусології, комерційні набори та їх обмеження 24

1.4. Роль позитивних контролів у серологічній діагностиці 25

1.4.1. Визначення позитивного контролю: функції, вимоги 25

1.4.2. Джерела контролів; Критерії якості: стабільність, специфічність. 26

1.5. Зберігання та стандартизація позитивних контролів 26

1.5.1. Методи зберігання, вплив умов зберігання, паспортизація та атестація контролів 26

1.6. Приклади створення референс-панелей у вірусології 28

1.6.1. Опис існуючих панелей 28
1.7. Актуальність створення локальної референс-панелі 29
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....30
2.1. Об'єкт дослідження.....30
2.2. Механічне перенесення вірусів для отримання інфікованого матеріалу.....30
2.3. Методика десикації та підготовки сухих позитивних контролів 32
2.4. Методика проведення тестування зразків референс-панелі TMV і PVY 33
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....36
3.1. Відбір і верифікація вихідних ізолятів Y-вірусу картоплі (PVY) та вірусу тютюнової мозаїки (TMV).....36
3.1.1 Дослідження біологічних властивостей ізоляту TMV. 36
3.1.2 Дослідження біологічних властивостей ізоляту PVY. 38
3.2. Проведення тестування зразків референт-панелі TMV і PVY методом ІФА на чистоту вихідних зразків і матриці 38
3.3. Проміжний (Т3) аналіз на стабільність препаратів вірусів PVY і TMV методом ІФА.....40
3.4. Контрольний (Т6) аналіз на стабільність препаратів вірусів PVY і TMV методом ІФА.....42
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ 45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....47
ДОДАТКИ ..... **Error! Bookmark not defined.**

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

США – Сполучені Штати Америки

ІФА – імуноферментний аналіз

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

DAS-ELISA – double antibody sandwich ELISA (сендвіч метод ІФА)

ВТМ (TMV) – вірус тютюнової мозаїки (Tobacco mosaic virus)

УВК (PVY) – Y-вірус картоплі (Potato virus Y)

OD – оптична густина

Cut-off – порогове значення

MS Excel – Microsoft Excel

ICTV – Міжнародний комітет з таксономії вірусів

RNA – РНК, рибонуклеїнова кислота

DNA – ДНК, дезоксирибонуклеїнова кислота

PMV (МВК) – М-вірус картоплі

ROS – активні форми кисню

ЕМ – електронна мікроскопія

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція

ЗТ-ПЛР - ПЛР зі зворотною транскрипцією

кДНК - комплементарна ДНК

SYBR Green – ціаніновий барвник

LAMP – метод петлево-опосередкованої ізотермічної ампліфікації

TaqMan – флуоресцентні зонди

IgG – специфічні імуноглобуліни

DSMZ – Ляйбніц-Інститут Німецької колекції мікроорганізмів та клітинних культур

pH – водневий показник

PBST – екстракційний буфер

ПВП (PVP) – полівінілпіролідон

БСА (BSA) – бичачий сироватковий альбумін

DIECA – діетилдитіокарбамат

PBS-Tween – промивний буфер

pNPP – пара-нітрофенілфосфат, субстрат

Tween-20 – неіоногенний детергент

Blank – буферний контроль

STAT FAX® - рідер-система

T0 – контрольна точка (перший етап DAS-ELISA)

T3 – проміжний контроль

T6 – фінальний контроль

ВСТУП

Актуальність теми. Рослинні віруси спричиняють до 50% інфекційних захворювань рослин і щорічні втрати понад 30 млрд доларів США, уражаючи основні сільськогосподарські культури [1,2]. ІФА (ELISA) є одним із найбільш поширених методів діагностики завдяки чутливості та можливості масового аналізу, проте його точність залежить від якості антитіл і наявності надійних контролів. Відсутність стандартизованих позитивних зразків знижує відтворюваність результатів і підвищує ризик помилок [3]. Розробки панелей контрольних зразків необхідні з кількох причин, зокрема науково-методичні вимоги: стандартизація, валідація тест-систем, навчання персоналу для відпрацювання техніки ІФА. Референс-панель дозволяє уніфікувати інтерпретацію результатів між різними лабораторіями, наявність перевірених позитивних контролів дає змогу оцінити відтворюваність та чутливість наборів для ІФА, а також служить базою для зовнішнього контролю якості. Також є практичні переваги, як зменшення хибнонегативних та хибнопозитивних результатів, використання стандартизованих позитивних контролів допомагає уникати діагностичних помилок. Саме тому створення референс-панелі позитивних контролів для поширених вірусів є актуальним. Такі панелі забезпечують уніфікацію досліджень, підвищення точності та надійності результатів, що є критично важливим для ефективного фітосанітарного контролю та зменшення економічних втрат.

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) у форматі DAS-ELISA залишається «золотим стандартом» для масового скринінгу рослинних вірусів завдяки своїй високій специфічності, чутливості та можливості автоматизації. Проте ефективність діагностичних процедур і достовірність отриманих результатів безпосередньо залежать від наявності адекватних референс-матеріалів. Створення панелей позитивних контролів, які б зберігали стабільність антигенних властивостей протягом тривалого часу, є необхідною умовою для валідації тест-

систем, калібрування обладнання та навчання персоналу діагностичних лабораторій.

Проблема полягає у різній фізико-хімічній стабільності віріонів. Якщо ВТМ вирізняється надзвичайною стійкістю до зовнішніх чинників, то YВК є лабільним патогеном, чиї антигени швидко деградують при зберіганні в неоптимальних умовах. Традиційні методи збереження, такі як заморожування, не завжди забезпечують цілісність епітопів, необхідних для розпізнавання антитілами в ІФА. У зв’язку з цим, розробка та порівняльна оцінка нових підходів, зокрема методу м’якої ліофілізації та десикації у формі порошку, є актуальним науково-практичним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Робота інтегрована в загальну стратегію стандартизації методів діагностики вірусних хвороб рослин та створення національних колекцій еталонних зразків фітопатогенів.

Мета дослідження полягає у створенні стабільної референс-панелі позитивних контролів на основі антигенів ВТМ та YВК та порівняльній оцінці ефективності різних методів консервації інфікованого рослинного матеріалу для забезпечення тривалого зберігання їхньої імуногенної активності в ІФА.

Завдання дослідження:

1. Отримати біомасу вірусів ВТМ та YВК шляхом механічної інокуляції модельних рослин тютюну сорту Самсун (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun).
2. Оптимізувати протокол приготування інокуляту та умови культивування для досягнення максимального титру антигенів у рослинній тканині.
3. Провести консервацію інфікованого матеріалу трьома методами: глибоким заморожуванням, десикацією з отриманням сухого порошку та м’якою ліофілізацією.
4. Провести порівняльний аналіз початкової активності антигенів у різних формах за допомогою методу DAS-ELISA.

5. Оцінити стабільність зразків референс-панелі (динаміку показників оптичної щільності) через 3 та 6 місяців зберігання при температурі 4°C.

Об'єкт дослідження: процес збереження імуногенних властивостей антигенів вірусу тютюнової мозаїки та Y-вірусу картоплі у детермінованих станах рослинного матеріалу залежно від методу консервації та терміну зберігання.

Предмет дослідження: динаміка значень оптичної щільності (OD в ІФА-тестах), антигенний титр вірусів та стабільність їхніх капсидних білків у заморожених, десикованих та ліофілізованих зразках.

Методи дослідження:

- *Біологічні:* метод механічної інокуляції соком для підтримання та накопичення вірусних ізолятів на тест-рослинах.
- *Фізико-хімічні:* метод десикації (сушіння над хлоридом кальцію), метод заморожування.
- *Серологічні:* метод подвійного сендвіча антитіл (DAS-ELISA) для кількісного та якісного визначення вірусних антигенів.
- *Статистичні:* математична обробка результатів фотометрії, розрахунок середніх значень, стандартного відхилення та Cut-off з використанням програмного забезпечення MS Excel.

Практичне значення. Створена референс-панель може бути використана в лабораторіях карантинної служби, насіннєвих інспекціях та науково-дослідних установах як стабільний позитивний контроль. Методика м'якої ліофілізації дозволяє забезпечити лабораторії стандартними зразками з тривалим терміном придатності, що знижує витрати на постійне підтримання живих вірусних культур у теплицях. Запропоновані склади буферних систем та алгоритм розрахунку Cut-off адаптовані до міжнародних вимог та можуть бути впроваджені в протоколи внутрішнього лабораторного контролю якості.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика рослинних вірусів

1.1.1. Класифікація вірусів що вражають культурні рослини (TMV, PVY, PVM тощо)

Після щорічного голосування Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV) у березні 2025 року, з приводу ратифікації нових таксономічних змін до переліку, що перебувають у сфері відповідальності Підкомітету з вірусів рослин, було додано нові класифікаційні одиниці. Загалом було створено новий порядок, три нові родини, шість нових родів, два нові підроди та 206 нових видів вірусів [1].

Згідно з даними Міжнародного комітету з таксономії вірусів, описано сотні видів вірусів рослин, об'єднаних у численні родини та роди. Найбільшим є рід *Potyvirus,* представники якого характеризуються широким спектром рослин-господарів та глобальним поширенням. Одним із типових представників є Y-вірус картоплі (PVY), який вражає картоплю, томат, перець і тютюн.

Традиційно класифікація ізолятів PVY базувалася на їхній взаємодії з рослинами-господарями та генами стійкості. Через високу генетичну різноманітність вірусу було виділено основні групи штамів: PVY^{n}, PVY^{c} та PVY^{o}, а згодом описано додаткові варіанти та рекомбінантні форми. Сучасні серологічні та молекулярні методи дозволяють виявляти нові ізоляти, однак їх властивості не завжди відповідають існуючим класифікаційним схемам.

Ізоляти PVY вперше описали у 1930-х роках, а класифікацію здійснювали за здатністю викликати різні симптоми у рослин-індикаторів. Ізоляти PVY^{n} викликали некроз у тютюну, тоді як PVY^{c} та PVY^{o} спричиняли некротичні ураження, плямистість і навіть загибель рослин картоплі. Надалі були описані групи PVY^{z} та PVY^{e} та варіант PVY^{nTN}, який додатково спричиняє некроз бульб. Таким чином, класифікація ізолятів PVY, що спочатку базувалася на біологічних тестах, поступово ускладнилася через високу мінливість вірусу [2].

До РНК-вмісних вірусів, яких більшість, належать віруси родини *Vigrarividae* та родини *Tobamovirus* – вірус тютюнової мозаїки (TMV) та вірус мозаїки томатів (ToMV). Їхній геном представлений одноланцюговою РНК позитивної полярності (+)ssRNA, а віріони мають паличкоподібну форму. Основний спосіб передачі – механічний. Ці віруси можуть роками зберігатися в сухому листі або на поверхні інвентаря.

До ДНК-вмісних вірусів належать вірус хлорозу квасолі (BClV), вірус золотистої мозаїки квасолі (BGMV) та вірус скручування листя перцю (PLRV). Їхній геном представлений одноланцюговою ДНК, усі вони належать до родини *Geminiviridae* та роду *Begomovirus* і переносяться білокрилкою [3].

1.1.2. Вірус тютюнової мозаїки (Tobacco mosaic virus, TMV)

Вірус тютюнової мозаїки (TMV) належить до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae* і є одним із найбільш досліджених представників фітовірусів. Саме TMV став першим відкритим вірусом рослин, що започаткувало розвиток сучасної вірусології. Завдяки особливостям своєї будови та реплікації вірус широко використовується як модельний об’єкт у молекулярно-біологічних дослідженнях [4].

Віріони TMV мають характерну жорстку паличкоподібну форму, довжина яких становить приблизно 300 нм, а діаметр – близько 18 нм. Структура віріона утворена численними копіями капсидного білка, які спірально оточують молекулу генетичного матеріалу.

Геном TMV представлений одноланцюговою позитивно спрямованою РНК довжиною близько 6,4 тис. нуклеотидів. У геномі вірусу локалізовані чотири основні відкриті рамки зчитування, які кодують білки, необхідні для реплікації, внутрішньоклітинного транспорту та формування вірусної частинки: два репліказні білки, білок руху та капсидний білок [5].

Геномна організація TMV: 5’-Rep126-Rep183-MP-CP-3’

TMV характеризується широким колом рослин-господарів і здатний уражати понад 100 видів культурних та дикорослих рослин, серед яких тютюн, томат, перець, баклажан та деякі декоративні культури [6].

Після інфікування у рослин можуть проявлятися такі симптоми: мозаїчне забарвлення листків, чергування хлоротичних і зелених ділянок, зморшкуватість і деформація листків, пригнічення росту, некротичні ураження тканин.

Особливістю вірусу є висока стабільність у навколишньому середовищі. Вірус роками зберігає активність у сухому листі та на інструментах.

1.1.3. М-вірус картоплі (Potato virus M, PVM)

М-вірус картоплі (PVM) є представником роду *Carlavirus* родини *Betaflexiviridae* та належить до поширених вірусних патогенів картоплі в багатьох країнах світу, включаючи Україну. Вірус виявляють у насіннєвих і товарних посівах, що обумовлює його економічну важливість [7].

Віріони PVM мають гнучку ниткоподібну форму, характерну для представників роду *Carlavirus*. Генетичний матеріал представлений одноланцюговою позитивно спрямованою РНК довжиною приблизно 8534 нуклеотиди. Молекулярний аналіз геному показав наявність шести відкритих рамок зчитування, які кодують ферменти реплікації, транспортні білки, капсидний білок та нуклеїново-зв’язувальні білки [8].

Геномна організація PVM: 5’-Rep-TGB1-TGB2-TGB3-CP-NABP-3’

Залежно від сорту рослини та умов вирощування інфекція може проявлятися у вираженій і латентній формі. Найхарактернішими симптомами є: мозаїчність листків, міжжилковий хлороз, зморшкуватість, деформація листкової пластинки, уповільнення росту, карликовість.

Передача PVM може відбуватися через інфіковані бульби, механічні пошкодження, а також за участю комах-переносників, зокрема попелиць [9].

1.1.4. Порівняльна характеристика РНК-вмісних та ДНК-вмісних рослинних вірусів

За типом нуклеїнової кислоти рослинні віруси поділяють на РНК-вмісні та ДНК-вмісні. Більшість відомих фітовірусів належать саме до РНК-вмісних вірусів, до яких входять TMV, PVM, PVY та CMV.

РНК-вмісні віруси характеризуються високою частотою мутацій, значною генетичною мінливістю та швидкою адаптацією до нових рослин-господарів. Реплікація їх геному переважно відбувається в цитоплазмі інфікованої клітини [4].

На відміну від них, ДНК-вмісні рослинні віруси, зокрема представники родин *Geminiviridae* та *Caulimoviridae*, характеризуються більш стабільною генетичною організацією та часто використовують клітинне ядро господаря для здійснення реплікації.

Основні відмінності між цими групами вірусів полягають у типі генетичного матеріалу, особливостях реплікації, швидкості накопичення мутацій, структурі геному та механізмах взаємодії з клітиною-господарем. Ці особливості безпосередньо впливають на еволюцію вірусів, їх адаптаційний потенціал та ефективність методів діагностики.

1.1.5. Основні шляхи передачі та симптоматика

Вірусні інфекції спричиняють появу різноманітних симптомів, які негативно позначаються на рості, продуктивності та розвитку рослин. Характерними симптомами є зміна забарвлення листків, в’янення, затримка росту, деформація органів рослин та некроз. Найчастіше вони проявляються як жовтіння листків, мозаїки, плямистість та скручування листків. Після проникнення в клітину вірус використовує ресурси рослини для синтезу своїх білків і нуклеїнових кислот, що призводить до порушення фізіологічної діяльності клітини. У відповідь рослина змінює експресію генів і метаболічні процеси.

На прояв вірусних хвороб значно впливають також фактори навколишнього середовища, зокрема світло та температура. Важливу роль у розвитку симптомів

відіграють порушення функціонування білків хлоропластів, накопичення активних форм кисню (ROS), зміни в гормональній регуляції та вплив на клітинний цикл [13].

Можна виділити чотири основні типи реакцій рослин при зараженні вірусом: імунність, надчутливість, толерантність та системне ураження. Імунність – це стан, за якого рослина не уражується вірусом і не проявляє ознак хвороби. Надчутливість характеризується утворенням локальних некротичних плям у місці проникнення вірусу. Толерантність – стан, коли вірус поширюється по тканинах рослини, проте симптоми проявляються слабко або майже непомітно. Системне ураження супроводжується поширенням вірусу по всій рослині та появою чітко виражених симптомів хвороби.

Ураження вірусом може бути локальним або системним. До локальних симптомів належать хлоротичні плями, кільцева плямистість та некротичні ураження. Системні симптоми поширюються по всій рослині, одним із найпоширеніших проявів є карликовість. Під впливом вірусів змін можуть зазнавати не лише листки, а й стебла, корені та плоди. Наприклад, при зараженні вірусом коротковузля винограду може виникати фасціація стебел [14].

Віруси рослин можуть поширюватись різними способами. Найпоширенішим є передача через переносників: попелиць, трипсів, борошнистих жуків, білокрилок, довгоносиків, цикад та коників. Передача комахами буває неперсистентною, напівперсистентною та персистентною залежно від часу утримання вірусу. Переносчиками також є нематоди які передають вірус через поїдання коріння. Передача кліщами відбувається лише родиною *Eriophyidae.* Переносчиками є також організми грибної природи. Також є передача через заражене насіння, пилок, під час вегетативного розмноження рослин (живцюванням, щепленням, бульбами, брунькуванням), а ще механічно – через одяг, взуття, руки та обладнання працівників [3, 15].

1.1.6. Економічне значення вірусних хвороб у сільському господарстві

Рослинні віруси є серйозною загрозою для сільського господарства, вони спричиняють значні втрати врожаю, які у світовому масштабі оцінюються приблизно у 30 мільярдів доларів щорічно. Саме вони становлять майже половину всіх нових захворювань рослин. У країнах Європи вірусні інфекції завдають значної економічної шкоди різним сільськогосподарським культурам, зерновим, овочевим та навіть декоративним рослинам.

До найпоширеніших економічно небезпечних вірусів у світовому масштабі належать вірус тютюнової мозаїки, вірус плямистого в'янення томатів, вірус жовтої кучерявості листя томатів, вірус віспи сливи, вірус мозаїки огірків, Y-вірус картоплі, вірус мозаїки африканської касави, вірус мозаїки цвітної капусти, X-вірус картоплі, вірус мозаїки брому.

Тому важливим є своєчасне виявлення, що дозволить запобігти можливим негативним наслідкам для економіки, довкілля та виробництва харчових продуктів.

Приклади економічних втрат від вірусних інфекцій в різних країнах Європи. У Бельгії вірус мозаїки пепіно уражає плоди томатів, через що приблизно 50-60% продукції стає непридатною для реалізації, що в свою чергу знижує економічну цінність урожаю. У Великій Британії віруси родини *Luteoviridae* спричиняють щорічні втрати врожаю бобових, зернових, гарбузових культур, цукрової картоплі та тростини, цукрового буряка на суму 40-60 мільйонів фунтів стерлінгів. В Іспанії вірус шорсткої карликовості кукурудзи з 24% промислових посівів у 2001-2006 роках до 80% у 2015 році [16].

1.1.7. Значення вірусних інфекцій в Україні

Вірусні захворювання рослин є важливим фактором, що негативно впливає на продуктивність аграрного сектору України, спричиняючи зниження врожайності та погіршення якості насіннєвого і посадкового матеріалу. В Україні поширені такі економічно значущі віруси, як Y-вірус картоплі (PVY), M-вірус картоплі (PVM), X-

вірус картоплі (PVX), вірус тютюнової мозаїки (TMV) та вірус огіркової мозаїки (CMV). Дослідження показали, що місцеві ізоляти PVM та PVY характеризуються генетичною варіабельністю та відрізняються за біологічними властивостями [17].

Встановлено, що ураження посадкового матеріалу картоплі вірусними інфекціями може знижувати врожайність культури на 20-80% залежно від сорту, ступеня інфікування та умов вирощування. Особливу небезпеку становлять латентні форми інфекцій, які здатні накопичуватися в генераціях насіннєвого матеріалу.

1.2. Методи діагностики рослинних вірусів

1.2.1. Короткий огляд традиційних методів: біологічні проби, електронна мікроскопія

Рослини–індикатори реагують на зараження певним вірусом специфічно, характерними симптомами, що дозволяє легко відрізнити їх від реакції на інші віруси. Використання таких рослин у вірусологічних дослідженнях дозволяє визначити коло рослин-хазяїв, оцінити концентрацію вірусу, встановити інфекційну природу збудника, виділити вірус із змішаних інфекцій, накопичити його для фізико-хімічних досліджень та визначити видову належність.

У фітовірусології як рослини-індикатори використовують представників різних родин: *Nicotiana tabacum, N. glutinosa, N. clevelandii, Physalis floridana, Lycopersicon esculentum, Petunia hybrida, Datura stramonium, Zea mays*, *Cucurbita maxima Cucumis sativus, Chenopodium amaranticolor, Chenopodium quinoa, Vigna sinensis, Vicia faba, Melilotus officinalis, Phaseolus vulgaris.*

Чутливість індикаторних рослин до вірусної інфекції може підвищуватися, якщо помістити їх в темряву перед зараженням на 36-48 годин. Для отримання достовірних результатів заражають щонайменше три рослини-індикатори для кожного з варіантів.

Для швидкого отримання результатів (протягом 3-4 днів) використовують рослини-індикатори з локальною реакцією. Якщо такі для певного вірусу невідомі, застосовують із системною реакцією, у якої симптоми з'являються через 7-10 після інфікування. Ефективність даного методу залежить від стану рослини-індикатора, її віку та рівню сприйнятливості до вірусної інфекції, а також від властивостей вірусного препарату, його концентрації, стабільності.

Електронна мікроскопія (ЕМ) використовується для діагностики вірусів рослин, оскільки віруси мають субмікроскопічні розміри й не можуть бути детально досліджені за допомогою світлового мікроскопу.

Використовуючи електронний мікроскоп, можливо дослідити віруси за їх морфологічними ознаками та ідентифікувати без проведення аналізу його агента. Така діагностика є швидкою, бо проводиться одразу після приготування зразка, проте виключає можливість у проведені одразу кількох дослідів з різним матеріалом.

Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) є методом дослідження ультраструктури віріонів рослинних вірусів і клітин рослини-хазяїна. У фітовірусології часто застосовують два підходи: негативне забарвлення та дослідження ультратонких зрізів. Метод негативного забарвлення дозволяє отримувати зображення вірусних частинок з високою роздільною здатністю та досліджувати віріони безпосередньо в рослинному соку чи очищеному розчині. Ультратонкі зрізи застосовують для вивчення морфології вірусних частинок, структурних змін клітинних органел, розподілу віріонів у клітині [18,19].

1.2.2. Молекулярні методи: ПЛР, RT-PCR, LAMP

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є одним з найпоширеніших молекулярних методів у вірусології завдяки високій чутливості, відносній простоті виконання та точності. Принцип ПЛР ґрунтується на багаторазовому копіюванні

цільової послідовності ДНК за участю специфічних праймерів і ферменту ДНК-полімерази.

Процес ампліфікації складається з трьох основних етапів: денатурації дволанцюгової ДНК (приблизно при 94 °C), відпалу праймерів (50-70 °C) та елонгації (близько 72 °C). ПЛР широко застосовується для виявлення рослинних вірусів, особливо ДНК-вірусів, зокрема родів *Babuvirus, Begomovirus* та *Caulimovirus*.

ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) – це високочутливий і специфічний метод виявлення РНК-вірусів. Його принцип полягає у перетворенні вірусної РНК у комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою зворотної транскриптази, після чого проводиться стандартна ПЛР.

Метод петлево-опосередкованої ізотермічної ампліфікації (LAMP) був розроблений у 2000 році Нотомі та ґрунтується на використанні спеціально підібраних праймерів і Bst-полімерази. Реакція відбувається в ізотермічних умовах (близько 63 °C) та дозволяє отримати мільярди копій ДНК менш ніж за одну годину.

Метод використовує петльові, внутрішні та зовнішні праймери, що розпізнають декілька ділянок геному. LAMP є високочутливим, швидким і простим у виконанні, а результати можна оцінювати без складного обладнання. Для виявлення РНК-вірусів використовують модифікацію RT-LAMP [20].

1.2.3. Серологічні методи: ELISA (DAS, непряма ІФА)

Серологічні методи, розроблені у 1960-х роках, ґрунтуються на використані антитіл, які специфічно зв’язуються з вірусними білками (антигенами). Мічені ферментами антитіла дозволяють виявити віруси та визначити їх кількість за допомогою спектрофотометрії.

Одним з найпоширеніших серологічних методів є імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA), який дає змогу виявляти та кількісно оцінювати вірусні антигени у тканинах рослин. Метод ґрунтується на специфічній взаємодії антигену та антитіла:

антиген фіксується на твердій поверхні, після чого до нього приєднується антитіло, зв’язане з ферментом-маркером. Додавання субстрату викликає реакцію, інтенсивність якої дозволяє визначати наявність і кількість цільової речовини.

У 1977 році було доведено ефективність методу DAS-ELISA (подвійного антитілового «сендвіча») для кількісного визначення вірусів у рослинних тканинах. Метод є недорогим, чутливим і придатним для аналізу великої кількості зразків, тому широко використовується для діагностики вірусних захворювань рослин.

Для діагностики вірусних інфекцій картоплі застосовують DAS-ELISA: подрібнений рослинний матеріал вносять у мікротитраційні планшети разом із відповідними антитілами. Позитивну реакцію визначають за зміною забарвлення реакційної суміші, а концентрацію вірусу оцінюють за показниками оптичної густини при довжині хвилі 405 нм [21,22,23].

Імуноферментний аналіз (ІФА) може проводиться у трьох основних форматах: прямому, непрямому та сендвіч-методі.

Прямий метод ІФА передбачає використання первинного антитіла, міченого ферментом, яке безпосередньо зв’язується з антигеном. Метод є простим і швидким, проте має відносно низьку чутливість, а мічення може знижувати активність атитіла.

Непрямий метод ІФА використовує немічене первинне антитіло та мічене вторинне антитіло. Цей підхід забезпечує високу чутливість завдяки підсиленню сигналу та є найпоширенішим. Недоліками є можливість неспецифічних реакцій і необхідність додаткових етапів інкубації.

Сендвіч-ІФА ґрунтується на використанні двох антитіл: одне захоплює антиген, а друге забезпечує його виявлення. Метод характеризує високою чутливістю та специфічністю, однак потребує ретельного підбору пар антитіл [24].

1.2.4. Порівняння чутливості, доступності та специфічності

Діагностика вірусних інфекцій рослин залишається складним завданням, оскільки симптоми хвороб можуть проявлятися нерівномірно або бути відсутніми, а також залежать від взаємодії між вірусом, рослинною-хазяїном і умовами навколишнього середовища. Подібні симптоми можуть спричинятися іншими патогенами або абіотичними стресами, тому для надійної діагностики необхідно поєднувати спостереження за рослинами з лабораторними методами аналізу.

Для виявлення вірусів рослин використовують дні основні групи методів: серологічні та молекулярні. Серологічні методи, зокрема імуноферментний аналіз, базуються на взаємодії антигенів і антитіл.

Методи, засновані на аналізі нуклеїнових кислот (наприклад ПЛР), забезпечують високу чутливість і специфічність та дозволяють швидко ідентифікувати віруси. Водночас їх використання потребує спеціалізованого обладнання, кваліфікаційного персоналу та більших фінансових витрат [25].

1.3. Принципи DAS-ELISA та її застосування

1.3.1. Механізми роботи DAS-ELISA: антитіла, кон'югати, субстрати

Суть методу полягає в тому, що специфічні імуноглобуліни (IgG), отриманні з антисироватки до вірусу, спочатку фіксуються на твердій поверхні лунок планшета і виконують роль «захоплюючих» антитіл. Після додавання зразка вони зв'язують вірусний антиген і утримують його на поверхні. Далі в систему вносять ті самі антитіла, але вже зв'язані з ферментом, вони приєднуються до іншої ділянки антигену, формуючи комплекс, у якому антиген розміщується між двома антитілами.

Ферментно мічені антитіла, або кон'югати, відіграють ключову роль, оскільки саме вони забезпечують можливість виявлення реакції. Як правило, до антитіл приєднують такі ферменти, як лужна фосфатаза або пероксидаза. Після

зв’язування з антигеном ці комплекси залишаються закріпленими в лунці та виконують функцію каталізаторів у наступній стадії реакції.

На завершальному етапі додають відповідний субстрат для ферменту. У результаті ферментативної реакції субстрат перетворюється на забарвлений продукт, який накопичується в місці перебігу реакції. Інтенсивність забарвлення залежить від кількості антигену в зразку, що дає змогу не лише виявити наявтість вірусу, але й оцінити його вміст.

Отже, у методі DAS-ELISA антитіла забезпечують специфічне розпізнавання та фіксацію антигену, кон’югати відповідають за його ферментативне мічення, а субстрат слугує індикатором, який переводить реакцію в видимий кольоровий сигнал [26].

1.3.2. Переваги DAS-ELISA у фітовірусології, комерційні набори та їх обмеження

У науковій літературі метод DAS-ELISA вважається одним із найпоширеніших у фітовірусології завдяки високій специфічності, достатній чутливості та зручності у використанні. Він дозволяє визначати вірусні антигени без складного очищення рослинного матеріалу, що спрощує процедуру аналізу.

Метод відзначається оперативністю виконання і придатністю для одночасного дослідження великої кількості зразків, тому є ефективним для масових фітосанітарних обстежень. Порівняно з іншими серологічними підходами, формат «сендвіч» забезпечує точніше розпізнавання антигену та зменшує ймовірність неспецифічність реакцій [27].

Водночас застосування комерційних наборів DAS-ELISA має певні недоліки. Такі тест-системи містять стандартизовані реагенти, але обмежують універсальність методу, оскільки розраховані на виявлення конкретних вірусів і можуть бути неефективними для нових або варіабельних штамів.

Отримання високоякісних антисироваток є складним і витратним процесом, що впливає на доступність та вартість наборів. Результати аналізу також можуть залежати від складу рослинних екстрактів, оскільки окремі компоненти здатні впливати на ферментативну активність або зв'язування антитіл [28].

1.4. Роль позитивних контролів у серологічній діагностиці

1.4.1. Визначення позитивного контролю: функції, вимоги

У серологічній діагностиці, зокрема при використанні ELISA, позитивні контролі є необхідним елементом для забезпечення надійності отриманих результатів. Під час аналізу разом із досліджуваними зразками використовують зразки з наперед відомою позитивною реакцією, оскільки вони дають змогу перевірити правильність виконання тесту та функціонування всіх його компонентів. Такий контроль слугує еталоном, для порівняння результатів і підтверджує коректність системи виявлення антигену.

Позитивний контроль має забезпечувати чітко виражений сигнал, що перевищує показники негативних або здорових зразків. Його оптична щільність повинна бути суттєво вищою за рівень фонового сигналу, що дозволяє відрізнити позитивну реакцію від неспцифічного забарвлення.

Отже, позитивний контроль у серологічних методах – це зразок із відомою наявністю вірусного антигену, який використовується для перевірки коректності аналізу. Його функція полягає у підтвердженні ефективності всіх етапів реакції – від зв'язування антигену до утворення вимірюваного сигналу. Він повинен бути стабільним, відтворюваним і забезпечувати інтенсивний сигнал, що перевищує фонові значення, гарантуючи достовірну інтерпретацію результатів [26].

1.4.2. Джерела контролів; Критерії якості: стабільність, специфічність.

Одним із найпоширеніших варіантів є екстракти інфікованих рослин, які готують шляхом гомогенізації і застосовують без значної попередньої обробки. Такі зразки є зручними, оскільки максимально відображають природні умови присутності вірусу в рослинному матеріалі [30].

Окреме місце займають ліофілізовані зразки, зокрема висушене інфіковане листя або рослинні гомогенати. Після висушування такі матеріали можуть довго зберігатися без втрати властивостей, а перед використанням відновлюються у буферному розчині. Вони часто входять до складу готових тест-систем і забезпечують зручність транспортування та зберігання [31].

Для того щоб позитивні контролі забезпечувати достовірні результати, вони повинні відповідати низці важливих вимог. Насамперед це стабільність, яка досягається завдяки методам зберігання, таким як заморожування або ліофілізація. Це дозволяє зберігати активність антигену протягом тривалого часу та використовувати контроль багаторазово [32].

Важливою характеристикою є також специфічність, тобто здатність контрольного зразка реагувати лише з антитілами до певного вірусу. Це забезпечується використанням відповідного інфікованого матеріалу або очищених вірусів, які містять специфічні антигени [33].

1.5. Зберігання та стандартизація позитивних контролів

1.5.1. Методи зберігання, вплив умов зберігання, паспортизація та атестація контролів

Стандартизація та умови зберігання позитивних контролів у діагностичних системах спрямовані на збереження стабільності їх біологічно активних компонентів, таких як антигени або вірусні структури, протягом усього періоду використання. Одним із базових підходів є зберігання при низьких температурах,

зокрема заморожування, яке уповільнює деградацію білкових молекул і дозволяє підтримувати їх антигенні властивості. Для середньо- та довготривалого зберігання використовують заморожування інфікованих тканин при -80 °C. Водночас повторні цикли заморожування та розморожування є небажаними, оскільки можуть спричиняти структурні зміни білків і зниження їх функціональної активності, що негативно впливає на відтворюваність результатів аналізів [34].

Одним з ефективних методів є ліофілізація, тобто висушування заморожених зразків у вакуумі. Перед нею інфікований рослинний матеріал подрібнюють у захисному буферному середовищі до однорідної суспензії. Зразок розливають у стерильні ампули або флакони, заморожують, після сублімаційного висушування герметично закупорюють і зберігають за низьких температур. Метод переводить біологічний матеріал у стабільний сухий стан, підвищує його стійкість до температурних коливань і спрощує транспортування. Однак якість ліофілізованих контролів залежить від умов сушіння та залишкової вологості, підвищення якої може призводити до втрати активності та порушення структури білків [35].

Одним із найпростіших способів є десикація, що передбачає висушування інфікованих тканих із використанням осушувальних агентів. Після видалення вологи зразки зберігають у герметичних контейнерах при низьких температурах. Метод ефективний для стабільних механічно передаваних вірусів. Його перевагами є технологічна простота, відсутність потреби у складному спеціалізованому обладнанні та зручність транспортування із мінімальними витратами. Однак чутливість до висушування різниться між вірусами, тому ефективність залежить від біологічних особливостей конкретного вірусного ізоляту [26].

Найбільш надійним методом вважається кріоконсервація у рідкому азоті, за якої зразки зберігають при наднизьких температурах. За таких умов практично повністю припиняються біохімічні процеси, що забезпечує тривале збереження генетичних і біологічних характеристик вірусів. Для кріоконсервації інфіковані рослинні тканини розміщують у кріопробірках і зберігають у рідкому азоті.

Антигенні властивості позитивних контролів можуть змінюватися під впливом температури, світла або вологісті. Навіть незначні відхилення здатні викликати конформаційні зміни білків, зменшуючи їх здатність взаємодіяти з антитілами. Це призводить до зниження інтенсивності сигналу в імунологічних тестах і підвищення варіабельності результатів, тому оцінка стабільності є важливою складовою валідації контрольних матеріалів.

Важливим елементом забезпечення якості є паспортизація та атестація позитивних контролів, що передбачає встановлення їхніх основних характеристик (активність, концентрація та межі варіації) відповідно до міжнародних стандартів. Також проводяться дослідження однорідності та стабільності, міжлабораторні порівняння, що дозволяє підтвердити відтворюваність результатів та визначити термін придатності контрольних матеріалів [36].

Під час паспортизації контрольних матеріалів створюється офіційний документ – паспорт якості, у якому систематизуються ключові параметри зразка: джерело походження матеріалу, технологія отримання, умови стабілізації, та межі допустимих відхилень.

Атестація позитивних контролів передбачає підтвердження їхніх характеристик через проведення міжлабараторних досліджень, калібрувальні процедури і валідаційні експерименти. Такі випробування дають змогу оцінити відтворюваність, виявити систематичні похибки та підтвердити придатність матеріалу для стандартизованих діагностичних методик [37].

1.6. Приклади створення референс-панелей у вірусології

1.6.1. Опис існуючих панелей

Одним із прикладів є діяльність біологічних колекцій, таких як DSMZ, де формуються стандартизовані набори матеріалів для діагностики вірусів рослин. У цих наборах використовують ліофілізовані рослинні зразки або гомогенати

інфікованих тканин із відомим вмістом вірусу, які виконують роль позитивних контролів у серологічних тестах і забезпечують узгодженість результатів між різними лабораторіями [38].

У наукових дослідженнях також описано створення спеціалізованих панелей для перевірки діагностичних методів. При розробці ELISA-тестів використовують набори різних вірусних ізолятів або споріднених видів, що дозволяє оцінити специфічність і виявити можливі перехресні реакції [39].

У сучасних підходах до діагностики вірусів рослин використовують внутрішні контрольні панелі, які включають позитивні та негативні зразки. Вони необхідні для контролю якості аналізу та забезпечення стабільності результатів у лабораторних і польових умовах [40].

1.7. Актуальність створення локальної референс-панелі

Актуальність створення локальних референс-панелей у вірусології рослин зумовлена недостатньою ефективністю універсальних контрольних матеріалів для виявлення регіональних штамів вірусів. Рослинні віруси характеризуються високою генетичною мінливістю, зокрема Y-вірус картоплі (PVY), тому стандартні контролі не завжди забезпечують надійне виявлення локальних ізолятів [41].

Додатковою проблемою є обмеження серологічних методів, таких як ELISA, оскільки вони залежать від специфічності антитіл і можуть давати перехресні реакції між близькоспорідненими штамами, що знижує точність діагностики та підсилює потребу у створенні панелей, що містять саме регіональні варіанти вірусів [42].

Не менш важливою є необхідність адаптації діагностичних систем до місцевих культур, оскільки ефективність методів виявлення вірусів залежить від виду рослини та концентрації патогена, тому використання локальних контрольних панелей дозволяє підвищити точність аналізів для конкретних сільськогосподарських культур [39].

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Дослідження проводили на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття ФЗРБтаЕ.

Об'єкт дослідження: процес збереження імуногенних властивостей антигенів вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) та Y-вірусу картоплі (YBK) у детермінованих станах рослинного матеріалу (заморожування vs ліофілізація).

Предмет дослідження: динаміка антигенного титру ВТМ та YBK в ІФА-тестах залежно від методу підготовки зразків та термінів їхнього зберігання у складі референс-панелі.

2.2. Механічне перенесення вірусів для отримання інфікованого матеріалу

Для накопичення вірусної біомаси (TMV та YBK) і створення вихідного матеріалу референс-панелі було використано метод механічної інокуляції згідно зі стандартними протоколами [1]. Процес включав наступні етапи:

1. Підготовка інокуляту (інфекційного соку): як джерело інфекції використовували свіжозібране листя рослин із вираженим симптомами вірусного ураження. Тканини листя розтирали у стерильній ступці, додаючи фосфатний буфер (0,01-0,1 М, pH 7,0) у співвідношенні 1:5 або 1:10 (вага/об'єм). Для запобігання інактивації вірусних частинок внаслідок окиснення компонентів соку (особливо для лабільного YBK), екстракцію проводили на льоду.

2. Підготовка тест-рослин. Рослини вирощували в умовах фітокамери "Silverbox evolution" (Франція). У дослідженнях для інокуляції TMV використовували рослини тютюну сорту Самсун. Додатково інокулювали рослини перцю сорту Білозірка. Для YBK інокуляцію проводили на рослинах тютюну сортів Самсун та Самсун 155 для диференціації штамової групи ізолятів.

Інокуляцію проводили на молодих рослинах-індикаторах у фазі перших справжніх листків. Для створення вхідних «воріт» інфекції поверхню листків попередньо опудрювали абразивом – карборундом (порошок карбіду кремнію, розмір часток 400-600 меш). Це забезпечувало створення мікротравм, необхідних для проникнення віріонів у клітини мезофілу.



Рис. 2.1 Порошок абразив - карборунд

3. Процедура інокуляції. Отриманий інокулят наносили на листки за допомогою марлевого тампона або пальця (у рукавичці), обережно втираючи сік у поверхню. Після інокуляції листки промивали дистильованою водою для видалення залишків буфера та надлишку абразиву, що могли спричинити фітотоксичність.



Рис. 2.2 Інокулянт (А) та поверхня листка в який його було втерто (Б)

4. Культивування та відбір матеріалу. Рослини витримували в умовах контрольованого температурного режиму та освітлення. Матеріал для подальшої десикації та ліофілізації збирали в період максимального накопичення вірусу (пік концентрації антигену), що візуально супроводжувалося появою чітких симптомів мозаїки або некрозів.

2.3. Методика десикації та підготовки сухих позитивних контролів

Згідно з протоколами збереження вірусних культур [2], метод десикації полягає у видаленні вологи з інфікованих тканин для уповільнення деградаційних процесів. У нашій роботі ми використовували два типи препаративної підготовки після висушування.

1. Первинна підготовка та сушіння. Інфікований рослинний матеріал (листя) обгортали абсорбуючим папером для видалення надлишку вільної вологи. Тканини поміщали в герметичну посудину (десикатор) з безводним хлоридом кальцію (CaCl). Маса осушувача перевищувала масу листя щонайменше вдвічі. Процес десикації тривав 2-3 тижні у холодильнику.

2. Виготовлення порошкоподібного концентрату. Після повного висушування частину матеріалу подрібнювали до стану дрібного порошку. Отриманий порошок розподіляли у пластикові флакони з герметичними кришками. Для стабільних вірусів, таких як ВТМ, такий метод дозволяє тривалий час зберігати зразки у звичайному холодильнику при +4 °C. Іншу частину зразка не подрібнювали, переносили в пластикові флакони і зберігали в тих же умовах до аналізу.

3. Зберігання та контроль стабільності. Зразки зберігали при температурі 4 °C. Для запобігання зволоженню при відкритті флакони перед використанням витримували до досягнення кімнатної температури.

4. Заморожування зразків. Частину рослинного матеріалу відбирали для заморожування. Рослинний матеріал розділяли на порції, обгортали фольгою, маркували зразки та поміщали в морозильну камеру при -20 °C. Цей метод не є загальноприйнятим, оскільки стандартним методом вважається заморожування при -80 °C [2]. В нашій роботі така модифікація використана з огляду на більш просте виконання і можливість застосування для певних стійких вірусів, як наприклад TMV.

2.4. Методика проведення тестування зразків референс-панелі TMV і PVY

Валідацію референс-панелі проводили шляхом збереженості антигенів методом ІФА через 3 та 6 місяців після виготовлення.

У роботі використовували антитіла та кон'югати виробництва LOEWE® Biochemica GmbH, (Німеччина). Для отримання оптимального сигналу в ІФА було використано специфічні режими гомогенізації у буфері для екстракції «Geneal» [3-5]. Для ВТМ та YBK рослинний матеріал (свіжий або реконституйований після консервації) гомогенізували у співвідношенні 1:20 (маса/об'єм). Для листкової маси тютюну Самсун у негативному контролі використовували стандартне розведення 1:20 для мінімізації матричного ефекту.

Перед використанням у діагностиці ІФА зразки відповідним чином відновлювали. Для забезпечення стабільності вірусних часток TMV та PVY і мінімізації неспецифічного фону використовували PBS-Tween з добавками PVP та BSA. Tween-20 (0,05%) застосовували для запобігання неспецифічній адсорбції білків, PVP-40 (2%) – для зв'язування поліфенольних сполук, а BSA (0,2%) – як білок-блокатор для стабілізації антигенів. Повну методику відновлення зразків наведено у Додатку А.

Загальний алгоритм відновлення зразків для проведення ІФА представленні в табл. 2.1. (Додаток А)

1. Процедура проведення аналізу:

Сорбція антитіл: у лунки планшета вносили по 200 мкл специфічних антитіл (IgG)**,** розведених у буфері для покриття. Планшет інкубували при 34°С протягом 4 годин.

Внесення зразків: після промивання планшета (тричі промивним буфером) у лунки додавали по 200 мкл підготовлених зразків: гомогенізованого рослинного матеріалу (замороженого, десикованого або ліофілізованого), розведеного у буфері для екстракції. Планшети інкубували протягом ночі при 4°С.

Додавання кон'югату: після промивання у кожну лунку вносили по 200 мкл розведеного ферментного кон'югату (антитіла, мічені лужною фосфатазою). Планшет інкубували при 30℃ протягом 5 годин.

Субстратна реакція: після фінального промивання додавали субстрат pNPP (пара-нітрофенілфосфат) у концентрації 1 мг/мл. Планшет інкубували у темряві при кімнатній температурі (20-25 ℃).

Для забезпечення оптимальних умов реакції, стабілізації антитіл та підтримки необхідного pH використовували наступні буферні системи:

1. Промивний буфер (PBS-Tween).
2. Буфер для покриття.
3. Буфер для екстракції.
4. Буфер для кон'югату.
5. Субстратний буфер.

Повний опис складу наявних буферів наведено у Додатку Б.

Готові буфери зберігали при температурі 4 ℃ не більше 1-2 місяців (крім субстратного буфера, який готували безпосередньо перед використанням). Таблетки pNPP зберігали у морозильнику при -20 ℃, додавали у субстратний буфер безпосередньо перед внесенням у планшет (кінцева концентрація 1 мг/мл), уникаючи прямого світла.

Фактором для отримання чистого фону є промивання, яке проводили не менше 3 разів для уникнення хибнопозитивних результатів. Крім того, у дослідженнях із фітопатогенами (особливо з PVY, який може давати фонові реакції) якісне блокування вільних центрів зв'язування на планшеті є критичним.

Опис блокуючого буфера та процедури блокування. Для мінімізації неспецифічної адсорбції компонентів рослинного екстракту та кон'югату на поверхні лунок планшета після стадії сенсибілізації (нанесення антитіл) використовуючи блокуючий буфер на основі БСА та ПВП. Повний опис блокуючого буфера та процедури блокування представлено у Додатку Б.

Методика проведення блокування. Після інкубації планшета з захоплюючими антитілами та триразового промивання PBST у кожну лунку вносили по 250-300 мкл блокуючого буфера. Усі зразки та контролі вносили у двох повторах.

Кожен планшет містив для відтворюваності та повторості:

- Позитивний контроль (відомий інфікований матеріал).
- Негативний контроль (сік здорової рослини тютюну сорту Самсун).
- Буферний контроль (Blank) для перевірки чистоти реагентів.

2. Реєстрація результатів. Вимірювання оптичної щільності (OD) проводили за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 405 нм. Реєстрацію результатів здійснювали через 30, 60 та 120 хвилин після додавання субстрату. У дослідженнях для аналізу результатів імуноферментного аналізу зразків використовували дані оптичної щільності (OD), одержані на рідері STAT FAX® 4300. Результати аналізу передаються на комп'ютер і обробляються програмою Excel (рис. 2.3 наведено у Додатку Е).

3. Статистичний аналіз та визначення порогового значення (Cut-off):

Оцінку результатів проводили на основі порівняння середніх значень OD дублікатів кожного зразка з пороговим значенням (Cut-off), яке розраховували індивідуально для кожного планшета [6].

Розрахунок Cut-off: порогове значення визначали за формулою:

Cut-off = (середнє OD негативних контролів)/3

Інтерпретація результатів. Зразок вважали позитивним, якщойого середнє значення OD перевищувало встановлений поріг. При аналізі референс-панелі особливу увагу приділяли стабільності показників OD позитивних контролів (ВТМ та YBK) протягом 3 та 6 місяців зберігання.

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Відбір і верифікація вихідних ізолятів Y-вірусу картоплі (PVY) та вірусу тютюнової мозаїки (TMV)

Першим етапом створення референс-панелі став відбір та верифікація вихідних ізолятів Y-вірусу картоплі (PVY) та вірусу тютюнової мозаїки (TMV), що характеризуються різними біологічними та серологічними властивостями.

У ході роботи було сформовано вибірку з 10 зразків для PVY та 6 зразків – для TMV, які попередньо продемонстрували типові симптоми ураження на рослинах-індикаторах та пройшли первинний скринінг методом ІФА.

Для верифікації біологічної активності відібраних ізолятів було проведено механічну інокуляцію індикаторних рослин. Для TMV інокуляцію проводили на рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Самсун і перцю (*Capsicum annuum* L.) сорту Білозірка. Усі зразки обрані для створення позитивних контролів, продемонстрували розвиток типових візуальних симптомів (мозаїка, некрози, деформація листя) у терміни від 7 до 10 діб після зараження, що підтвердило високу інфекційність нативного матеріалу вірусу.

3.1.1 Дослідження біологічних властивостей ізоляту TMV.

Інокуляція TMV викликала на рослинах перцю (*Capsicum annuum*) системну інфекцію, яка проявилася у вигляді зморшкуватості листкових пластинок, верхні листки демонстрували закручування країв пластини доверху (рис. 3.1. наведено у Додатку Г). Загалом, у науковій літературі зазначається, що для інфекції TMV на перці характерними є мозаїчні симптоми (світло- та темно-зелені ділянки), хлороз (пожовтіння) та некроз (відмирання тканин). Перші ознаки часто з’являються на наймолодших листках у вигляді некрозу та хлорозу вздовж головних жилок, що супроводжується в’яненням та появою плям. Також спостерігається деформація, скручування і висихання та передчасне опадання (дефоліація) листя [1]. Схожість

візуальних ознак підтверджує типовий характер розвитку вірусу тютюнової мозаїки у нашому дослідженні.

У дослідженнях передачі ізоляту TMV на рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Самсун спостерігали типовий мозаїчний візерунок: на листках з'являлися плями або смуги світло-зеленого, жовтого або білого кольору, які чергувалися з темно-зеленими ділянками, створюючи мозаїчний ефект. Також спостерігали спотворення листя: деформації листкової пластини, зморшкуватість або скручування (рис. 3.2. наведено у Додатку Г).

Згідно з літературними даними інокуляція рослин тютюну викликає характерну важку мозаїку. Тобамовірус тютюнової мозаїки (TMV) викликає симптоми, що варіюються від мозаїки, просвітлення жилок або легкої плямистості до значної деформації або зморшкуватості листя. Також може виникати опік або ошпарювання листя (мозаїчний опік) [2].

Крім того, для TMV характерна поява мозаїки, яка може варіюватися від сильної (виразної) до слабкої. Автори іншого зазначають, що під час польових досліджень рослини, які згодом тестувалися на наявність TMV, проявляли такі симптоми, як затримка росту, деформація листя, посвітління жилок або некроз, а також мозаїчні та некротичні візерунки. При механічній інокуляції листків *Nicotiana glutinosa* для виявлення TMV, вірус викликав розвиток типових некротичних місцевих уражень через 2-4 дні після зараження [3].

Таким чином, результати проведеної у нашому дослідженні штучної інокуляції рослин тютюну вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) демонструють типову картину ураження. Спостережувані симптоми, зокрема характерна мозаїчність листкової пластини, деформація тканин та затримка росту, повністю узгоджуються з описами патогенезу ВТМ у фаховій літературі [3]. Це підтверджує успішність відтворення інфекційного процесу та ідентичність використаного ізоляту вірусу за його біологічними властивостями.

3.1.2 Дослідження біологічних властивостей ізоляту PVY.

Для детальної біологічної характеристики відібраних ізолятів було проведено серію пасажів на наборі росли-індикаторів. Розвиток симптомів спостерігали від 8 до 14 доби після інокуляції, залежно від сорту тютюну. Встановлено, що ізоляти групи PVY^N викликали характерні некротичні реакції на листках *Nicotiana tabacum* сорту Самсун (рис. 3.3. наведено у Додатку Г), тоді як ізоляти групи PVY^O проявляли себе переважно через класичну мозаїку та деформацію листкової пластинки на сорті тютюну Самсун 155. Крім того, на цьому індикаторі ізолят симптоми інфекції проявилися у вигляді крапкових некрозів (рис. 3.4. наведено у Додатку Г).

Швидкість прояву симптомів варіювала від 8 діб (інтенсивний патогенез) до 14 діб (сповільнений розвиток), що було враховано при визначені оптимальних термінів відбору матеріалу для створення контрольних зразків.

Узагальнені результати верифікації ізолятів TMV і PVY приведені в таблиці 3.1. (Додаток В)

Проведена верифікація підтвердила високу інфекційність нативного матеріалу та біологічну ідентичність відібраних ізолятів. Це дозволило використовувати як основу для створення позитивних контрольних зразків референс-панелі.

3.2. Проведення тестування зразків референт-панелі TMV і PVY методом ІФА на чистоту вихідних зразків і матриці

Наступним етапом дослідження стало проведення порівняльного аналізу стабільності антигенів вірусу тютюнової мозаїки (TMV) та Y-вірусу картоплі (PVY) у складі створених позитивних контролів. Основною метою було визначення динаміки збереження імунохімічної активності вірусних часток залежно від методу підготовки зразків (ліофілізація та заморожування) протягом тривалого періоду.

Для оцінки вмісту антигенів було використано метод сендвіч-варіанту твердофазного імуноферментного аналізу (DAS-ELISA). Тестування проводиться у три етапи:

1. Контрольна точка (T0): безпосередньо після підготовки та сертифікації зразків.
2. Проміжний контроль (T3): через 3 місяці зберігання при відповідних температурних режимах (-20 ℃ для заморожених та +4 ℃ для ліофілізованих зразків).
3. Фінальний контроль (T6): через 6 місяців зберігання.

Аналіз проводився з використанням специфічних поліклональних антитіл до TMV та PVY, оцінка результатів базувалася на порівнянні показників оптичної густини (OD) та визначенні коефіцієнта збереження активності антигену. Такий підхід дозволив встановити найбільш ефективний спосіб консервації контрольних зразків для забезпечення відтворюваності результатів діагностики у часі.

На етапі контрольної точки (T0) для ізолятів виконували розширене дослідження на присутність антигенів інших вірусів. Для PVY було відібрано 10 зразків (PVY-to+#). Оскільки при створенні позитивного контролю важливо дотримуватися ряду дескрипторів [1,2], серед яких чистота зразка, яка визначає, чи перевірено матеріал на відсутність забруднень або нецільових організмів, що можуть вплину на результат. Крім того, важливий дескриптор «Матриця», оскільки використовується штучне зараження, тому важливо мати інформацію чи підтверджено відсутність цільового об’єкта у вихідній матриці перед зараженням [2]. У дослідженнях матриця представлена рослинами тютюну сорту Самсун, на які переносили ізоляти, що попередньо інфікували тютюн Самсун і Самсун 155. Результати аналізу рослинного матеріалу методом ІФА приведені в табл. 3.2. (Додаток Д). Дані демонструють середнє двох повторень ± стандартне відхилення.

Результати аналізу показали, що у відібраних зразках містяться лише антигени PVY, матриця представлена, як негативний контроль, і показники

варіювали від 0,037-0,049 OD. Вміст антигенів у зразках перевищував негативний контроль у 17-35 рази, що достовірно показує високу інфікованість зразків. Інфікованість дослідних зразків перевищувала стандартний комерційний позитивний контроль.

Для TMV також було проведене аналогічне дослідження на чистоту та відсутність інших антигенів у матриці (табл. 3.3. наведено у Додатку Д). Оскільки в дослідженні використовували ізоляти із зразків картоплі, перевірку проводили на наявність вірусів картоплі – PVY, PVX і PVM, які можуть передаватися механічно. Інших діагностованих вірусів у зразках не було виявлено, що свідчить про чистоту матеріалу відносно TMV. Матриця також показала відсутність антигенів вірусів. Вміст антигенів TMV перевищував негативний контроль у 17-24 рази.

У матриці антигенів вірусів не було виявлено, що свідчить про відповідність використаних методів поставленим завданням.

Таким чином, аналіз дозволив відібрати зразки з підтвердженим вмістом вірусів TMV і PVY, що дало можливість провести наступні етапи дослідження по становленню стабільності антигенів вірусів у препаратах при тривалому зберіганні.

3.3. Проміжний (Т3) аналіз на стабільність препаратів вірусів PVY і TMV методом ІФА

Оскільки попередній аналіз дозволив визначити чистоту матеріалу на вміст відповідних антигенів, подальші дослідження проводили тільки на антигени PVY і TMV. Рослинний матеріал був розділений відповідно до методу консервації – ліофілізовані частки рослинного матеріалу, порошок з ліофілізованого матеріалу і заморожені зразки. Аналіз проводили через 3 місяці після початку експериметру.

У всіх 10 зразках (PVY-to 1 – PVY-to 10) вихідний матеріал демонстрував найвищі показники оптичної густини. Це було очікувано, оскільки будь-яка обробка (заморожування чи ліофілізація) призводить до певної деградації антигенів або зниження їх доступності (рис. 3.5. наведено у Додатку Д).

Порівняння вихідного матеріалу та ліофілізованого виявило помітне зниження O.D. (у середньому на 0,2-0,3 одиниці). Проте показники залишаються достатньо високими для впевненої детекції (вище порогу негативного контролю).

Методи ліофілізації (з подрібненням і без) та простого заморожування показують дуже близькі результати. Це свідчить про те, що ліофілізація є гідною альтернативою заморожуванню для створення стабільних позитивних контролів, які можна зберігати тривалий час при кімнатній температурі.

Додаткове подрібнення після ліофілізації (сірі стовпчики) суттєво не змінює показники порівняно зі звичайною ліофілізацією. У деяких випадках (наприклад, PVY-to 1, 2,3,6) спостерігається навіть невелике зростання O.D., що може бути пов’язано з кращою гомогенізацією зразка.

Результати контролю в Т3 виявили, що на цьому етапі зберігання найбільш ефективним методом збереження позитивних контролів є лофілізація з подрібненням. Хоча вона дещо знижує оптичну густину порівняно з вихідним матеріалом, отримані значення (0,6-1,4 O.D.) є стабільними та значно перевищують фонові значення, що дозволяє використовувати їх для стандартизації діагностичних досліджень.

TMV відомий своєю високою стійкістю в навколишньому середовищі, і результати зберігання зразків через 3 місяці це підтверджують (рис. 3.6. наведено у Додатку Д). Різниця між вихідним матеріалом та обробленими зразками була мінімальною у цей період.

У багатьох випадках (наприклад, зразки 2, 4, 5) показники майже ідентичні. Метод висушування над хлоридом кальцію в холодильнику показав себе як такий, що практично не пошкоджує структуру ВТМ, у зразку 3-TMV-to варіант (ліофілізація + подрібнення) практично не відрізнявся від вихідного матеріалу. У зразках 4-TMV-to та 5-TMV-to різниця між методами підготовки матеріалу знаходиться в межах похибки вимірювання. Усі дослідні зразки (від 0,7 до 1,0 O.D.) мають значно вищий сигнал, ніж стандартний позитивний контроль, (близько 0,55

O.D.). Це свідчить про високу концентрацію вірусу у нашому рослинному матеріалі та його добре збереження за даних умов.

Результати ІФА-тестування через 3 місяці зберігання свідчать про те, що обраний метод низькотемпературної десикації над хлоридом кальцію є ефективним для обох вірусів, проте ступінь збереженості їх антигенної активності суттєво різниться залежно від морфології матеріалу. У варіанті з TMV спостерігалася добра стабільність: показники оптичної густини ліофілізованих зразків майже не поступалися замороженим і залишалися на рівні 90-95% від вихідного матеріалу. Натомість PVY виявився більш лабільним до процесу зневоднення: незважаючи на ідентичну рослинну матрицю (листки тютюну) та умови регідратації, падіння сигналу O.D. у ліофілізованих зразках PVY є більш вираженим (зниження до 75-85% від початкового рівня). Додаткове подрібнення матеріалу позитивно вплинула на стабільність результатів для обох вірусів, нівелюючи помилку вибірки, проте не компенсувала часткову деградацію більш чутливого капсиду PVY. Таким чином, створені позитивні контролі на основі TMV демонстрували вищу стійкість до зберігання продовж 3 місяців, тоді як для PVY метод десикації є прийнятним, але потребує врахування природного зниження титру антигену при валідації тест-систем.

3.4. Контрольний (Т6) аналіз на стабільність препаратів вірусів PVY і TMV методом ІФА

Аналіз стабільності антигенів PVY через 6 місяців зберігання показав загальну тенденцію до зниження сигналу порівняно з 3-місячним терміном, оскільки на 6-му місяці спостерігається подальше зниження оптичної густини (O.D.) для всіх типів обробки (рис. 3.7 наведено у Додатку Д). Це підтверджує чутливість ниткоподібних вібріонів PVY до тривалого зберігання, навіть за стабільних умов холодильника.

Ефективність ліофілізації (десикації) виявила вищу ефективність проти заморожування. Якщо на 3-й місяць багато зразків трималися на рівні 0,8-1,0 O.D., то на 6-й місяць більшість знаходиться в діапазоні 0,6-0,8 O.D. Зразки, виготовлені при ліофілізації демонстрували стабільність, порівняно із варіантом заморожування, а в ряді зразків (наприклад, PVY-to 1, 2, 3, 10) навіть перевищували його. Це свідчить про те, що видалення вологи ефективніше консервує антиген у довгій перспективі, ніж просто низька температура.

Роль подрібнення на контрольному терміні в 6 місяців стала більш помітною, оскільки подрібнений ліофілізований матеріал показав результати, майже ідентичні звичайній ліофілізації. Це підтверджує, що механічна обробка тканин не пошкоджує вірус критично і може бути використана для створення однорідних партій контролів.

Таким чином, через 6 місяців зберігання зразки PVY, підготовлені методом десикації над $CaCl_2$, зберігають діагностичну цінність. Хоча спостерігається природне зниження оптичної густини порівняно з 3-місячним етапом, показники стабілізованих зразків залишаються значно вище негативного контролю та на рівні або вище стандартного позитивного контролю. Важливим висновком є те, що ліофілізований матеріал через пів року виявився стабільнішим за заморожений, особливо у зразках з високим початковим титром (PVY-to 1, PVY-to 10). Це доводить перевагу сухого зберігання антигенів PVY для створення довгострокових лабораторних стандартів.

Аналіз через 6 місяців зберігання для вірусу тютюнової мозаїки (BTM/TMV) продемонстрував добру стабільність цього об’єкта. На відміну від PVY, який показав помітну деградацію, BTM практично не змінив активності антигенів в дослідних умовах. При порівнянні з графіком T3, показники оптичної густини (O.D.) через 6 місяців майже не змінилися, для більшості зразків (особливо 2, 3, 4, 5-TMV-to) значення залишаються в діапазоні 0,8-1,0 O.D., що є хорошим

показником для такого терміну зберігання і якості позитивного контролю (рис. 3.8 наведено у Додатку Д).

Була виявлена певна перевага методу десикаціїї над заморожуванням для зразків цього вірусу. У варіанті з ліофілізацією у зразках 4, 5 та 6-TMV-to виявлено вищі показники, ніж у варіанті заморожування. Це підтверджує гіпотезу, що для тривалого зберігання TMV видалення вологи за допомогою $CaCl_2$ є надійнішим методом, ніж утримання в замороженому стані, де можливі мікроколивання температури або кристалізація льоду, що пошкоджує білки.

Варто зауважити, що стабілізовані зразки через 6 місяців зберігання демонстрували вищу оптичну густину (>0,7 O.D.), ніж комерційний позитивний контроль (≈0,6 O.D.). Це дозволяє характеризувати методику десикації надзвичайно перспективною для виробництва лабораторних стандартів.

Метод десикації добре підходить для створення позитивних контролів цього вірусу, забезпечуючи майже 100% збереження антигенних властивостей TMV, який практично не змінював активність продовж 6 місяців. Крім того, використання низькотемпературної десикації подрібненого рослинного матеріалу тютюну забезпечує високу антигенну стабільність ВТМ протягом щонайменше 6 місяців.

На противагу цьому, PVY – потребує суворішого контролю, хоча також залишається стабільним у сухому вигляді, його показники повільно знижуються. Проте, як і у випадку з ВТМ, ліофілізований матеріал через 6 місяців мав вищі показники антигенної активності, ніж заморожений.

Отримані дані дозволяють рекомендувати метод десикації (висушування над адсорбуючим вологу агентом) як оптимальний для створення довгострокових позитивних контролів. Слід зазначити, що подрібнення матеріалу не призводить до значної втрати антигенної активності препаратів, що дозволяє гомогенізувати великі партії контрольного матеріалу для стандартизації діагностики.

ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

В результаті проведених досліджень було здійснено відбір та повну біологічну верифікацію вихідних ізолятів вірусів для формування референс-панелі та встановлено:

1. Для вірусу тютюнової мозаїки (TMV) верифіковано вибірку з 6 зразків Механічна інокуляція рослин *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун) та *Capsicum annuum* L. (сорт Білозірка) підтвердила високу інфекційність матеріалу: симптоми системного ураження (мозаїка, деформація листя, зморшкуватість) проявилися у 100% випадків у термін від 7 до 10 діб після зараження. Одержана клінічна картина повністю відповідає еталонним описам патогенезу ВТМ у фаховій літературі.

2. Для Y-вірусу картоплі (PVY) сформовано та верифіковано робочу колекцію з 10 зразків. Диференціація ізолятів на рослинах-індикаторах дозволила чітко розмежувати патотипи: ізоляти групи PVY^N викликали виражені некротичні реакції стебел та жил на тютюні сорту Самсун, тоді як ізоляти PVY^O проявлялися класичною мозаїкою та крапковими некрозами на сорті Самсун 155. Швидкість розвитку інфекційного процесу залежала від вірулентності конкретного штаму, що дозволило визначити оптимальні часові рамки для подальшого відбору вірусовмісного матеріалу.

3. Дослідження створення референс-панелей позитивних контролів TVM і PVY продемонструвало збереження антигенної активності препаратів протягом тривалого періоду (6 місяців) та перевагу методу низькотемпературної десикації над заморожуванням. Для довгострокового зберігання (понад 3 місяці) позитивних контролів вірусів картоплі та тютюну метод висушування над хлоридом кальцію ($CaCl_2$) у холодильнику ж є більш ефективним, ніж стандартне заморожування. Десикація забезпечує кращу стабільність антигенів у часі, мінімізуючи деградацію чутливих вібріонів (зокрема PVY) і дозволяючи отримувати стабільно високі показники оптичної густини, що перевищують рівень комерційних стандартів.

4. При створенні контролів слід враховувати природну стійкість вірусів до умов консервування. Для стійких вірусів, як ВТМ, метод десикації дозволяє зберігати майже 100% активності протягом 6 місяців, що робить його ідеальним для промислового виробництва стандартів. Для лабільних вірусів, як PVY, хоча метод забезпечує детекцію антигенної активності на високому рівні, слід очікувати поступового зниження титру (на 15-25% за пів року), що потребує закладання вищої початкової концентрації вірусу в матеріал.

5. Механічне подрібнення (гомогенізація) рослинної тканини після висушування не викликало критичного негативного впливу на антигенні властивості вірусів.

Одержані результати дозволяють рекомендувати використання подрібненого ліофілізованого матеріалу як найбільш практичну форму позитивного контролю: такий матеріал легше дозувати, він забезпечує кращу повторюваність результатів та зручніший у використанні при масових ІФА-тестуваннях. Для практичного застосування за необхідності можна використовувати я позитивний контроль не подрібнений ліофілізований матеріал або заморожений, при дотриманні збереження цілісності препаратів до використання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jeong, J.-J., H.-j., & Noh, J. (2014). A review of detection methods for the plant viruses. Research in Plant Disease, 20(3), 173-181,
DOI: https://doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173
2. Bhat, A. I., & Rao, G. P. (2020). Characterization of plant viruses: Methods and protocols. Springer. URL:
https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-0334-5
3. Torrance, L., & Taliansky, M. E. (2020). Potato virus Y emergence and evolution from the Andes of South America to become a major destructive pathogen of potato and other solanaceous crops worldwide. *Viruses,*12(12), 1430.
DOI: https://doi.org/10.3390/v12121430
4. Karasev A. V., Gray S. M. Potato virus Y: A century of evolution. *Phytopathology.* 2013. Vol. 103, No. 3.P.210-224. URL:
https://www.researchgate.net/publication/260890589_Potato_virus_Y_A_century_of_evolution
(дата звернення 20.05.2026).
5. Summary of taxonomy changes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses from the Plant Viruses Subcommittee, 2025 / E.M. Adriaenssens et al. *Journal of General Virology.* 2025. Vol. 106, Issue 7. Art. 002114. DOI: https://doi.org/10.1099/jgv.0.002114
6. Comparative Analysis of Three Potato Virus Y (PVY) Isolates under Different Temperature Regimes / S. G. S. Alves et al. *Plants.* 2021. Vol. 10, Issue 7. Art. 1413. DOI: https://doi.org/10.3390/plants10071413
7. Scholthof K.-B. G. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.* 2011. Vol. 12, Issue 9.P. 938-954.
DOI: https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
8. Harrison B. D., Wilson T. M. A. Historical overview of research on the tobacco mosaic virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 1999. Vol.354, Issue 1383. P. 569-579. DOI: https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0408
9. Advanced Detection Methods for Plant Viruses / M. R. Khan et al. *Plants.* 2022. Vol. 11, Issue 16. Art. 2166. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11162166
10. EFSA Panel on Plant Health (PLH). Pest categorisation of Potato virus Y.*EFSA Journal.* 2020. Vol. 18, Issue 1. Art. 5854.
DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5854
11. Characterization of a distinct strain of Potato virus Y / J. A. McDonald et al. *Journal of General Virology.* 1991. Vol. 72, Issue 1. P. 9-14.
DOI: https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-1-9
12. Continuous Evolution of Potato virus Y in North America / A. V. Karasev et al. *Phytopathology.* 2013. Vol. 103, No. 6. P. 210-224. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720969/ (дата звернення: 20.05.2026).
15. Diagnostic Technologies for Plant Soil-Borne Viruses / L. Yu et al. *Plants.* 2023. Vol. 12, Issue 15. Art. 2830. DOI: https://doi.org/10.3390/plants12152830

16. Лабораторний практикум із загальної вірусології : навч. посіб. для студ. біол. фак. / А. В. Харіна та ін. ; за ред. В. П. Поліщука. Київ : ВПЦ “Київський університет”, 2014. 239 с. URL: https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Virusol/Library/posibnyk_lab_virology.pdf (дата звернення: 20.05.2026).

17. Особливості та методи виявлення шкідливих рослинних вірусів у насіннєвому матеріалі : офіційний вебпортал / Головна акредитована лабораторія фітосанітарного аналізу. 2025. URL: https://fitolab.gov.ua/index.php/inform/statty/367-2025-02-07-08-08-21 (дата звернення: 20.05.2026).

18. Risk perception associated with an emerging agri-food risk in Europe: plant viruses / J. L. R. Jones et al. *Agriculture & Food Security.* 2022. Vol. 11. Art. 21. DOI: https://doi.org/10.1186/s40066-022-00366-5

19. Detection of Potato virus Y Strains by Multiplex RT-PCR / A. V. Karasev et al. *Plant Virology Protocols : Methods in Molecular Biology* / ed. by I. E. Tzanetakis. New York : Humana, 2021. Vol. 2400. P. 311-322. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1835-6_28

20. Boonham N., Walsh K., Mumford R. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of Potato virus Y strains. *Journal of Virological Methods.* 2009. Vol. 160, Issues 1-2 P. 132-138. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.032

21. Roy S. D., Ramasamy S. An evaluation of nucleic acid-based molecular methods for the detection of plant viruses: a systematic review. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology.* 2024. Vol. 33. P. 1-15. DOI: https://doi.org/10.1007/s13337-024-00863-0

22. Monitoring and Detection of Plant Virus Diseases Using Remote Sensing Technologies / Y. Zhang et al. *Remote Sensing.* 2022. Vol. 14, Issue 7. Art. 1542. DOI: https://doi.org/10.3390/rs14071542

23. Evaluation of plant viral extraction methods for downstream molecular diagnostics / M. A. Smith et al. *SN Applied Sciences.* 2023. Vol. 5. Art. 341. DOI: https://doi.org/10.1007/s42452-023-05619-x

24. Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) for Plant Virus Detection /M. F. Clark et al. *Plant Virology Protocols : Methods in Molecular Biology* / ed. by L. M. Lacey. New York : Humana, 2024. Vol. 2750. P. 95-104. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4390-7_9

25. Що таке імуноферментний аналіз (ІФА)? : блог компанії «АЛТ Україна». URL: https://alt.ua/blog/shho-take-imunofermentnij-analiz (дата звернення: 20.05.2026).

26. Plant Virology Protocols: New Approaches with Next-Generation Sequencing / ed. by I. E. Tzanetakis. New York : Humana, 2020. 340 p. (Methods in Molecular Biology, Vol. 2140). DOI: https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-0334-5

27. Clark M. F., Adams A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Methods in Enzymology.* 1986. Vol. 118. P.742-766. DOI: https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18114-6

28. ELISA Applications and Principles: Antibodies.com Educational Resources. URL: https://www.antibodies.com/applications/elisa (дата звернення: 20.05.2026).

29. ELISA Reagents for Plant Virus Diagnostics : LOEWE Biochemica GmbH. URL: https://loewe-info.com/elisa-2/ (дата звернення: 20.05.2026).

30. Production of Antibodies and Reference Controls for Plant Virus ELISA Diagnostics / H. J. Meyer et al. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015. Vol. 81, Issue 11. P. 3667-3675. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.03667-14

31. Potato virus Y (PVY) Positive Control (LPC 20001) : Product Catalogue / Agdia, Inc. URL: https://orders.agdia.com/positive-control-for-pvy-lpc-20001

32. Instructions to authors of diagnostic protocols / Secretariat of the International Plant Protection Convention (IPPC). Rome : IPPC, 2019. 12p. URL: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2019/09/TPDP_2019-2020_InstructionsToAuthors_2019-09-11.pdf (дата звернення: 20.05.2026).

33. WHO manual for the establishment of national and international secondary standards for antibodies / World Health Organization. Geneva : WHO, 2022. 45p. URL:https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/call-for-comments/who-manual-secondary-standards-for-antibodiesv30012022.pdf?sfvrsn=8638882c_3

34. Validation and Stability Assessment of Positive Reference Materials for Plant Disease Diagnostics / T. A. Schmidt et al. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2024. Vol. 36, Issue 4. P. 512-521.
DOI: https://doi.org/10.1177/10406387241296848

35. Freeze-drying of biological standards and reference materials / R. P. Silva et al. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2018. Vol. 54, No. 3. P. 165-172. DOI: https://doi.org/10.1590/S1676-24442014000100005

36. ДСТУ 8302:2015. Інформація та документація. Бібліографічне посилання. Загальні положення та правила складання. [Чинний від 2016-07-01]. Київ : ДП «УкрНДНЦ», 2016. 17с. URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=81399 (дата звернення: 20.05.2026).

37. Plant Viruses and Antisera Catalogue : Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.
URL: https://www.dsmz.de/collection/catalogue/plant-viruses-and-antisera/catalogue
(дата звернення: 20.05.2026).

38. High-Throughput Sequencing Technologies for Plant Virus Diagnostics / A. M. Savage et al. *Viruses.* 2021. Vol. 13, Issue 3. Art. 412.
DOI: https://doi.org/10.3390/v13030412

39. Синєгуб С. І.ю, Скрипаль І. Г. Особливості розробки та валідації тест-систем для імуноферментного аналізу фітовірусів. *Innovative Biosystems and Bioengineering.* 2020. Т. 4, №1. С. 193-201.
DOI: https://doi.org/10.20535/ibb.2020.4.1.193350

40. Modern Approaches for Stabilizing Positive Reference Panel Controls in ELISA Plant Virology assays / G. M. Green et al. *Frontiers in Plant Science.* 2024. Vol. 15. Art. 1451790. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1451790

41. Standardisation and validation of ELISA methods for quarantine plant viruses / L. C. Jones et al. *Acta Horticultrae.* 2011. No. 901. P. 75-82.
DOI: https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.901.9

42. Bhat, A. I., & Rao, G. P. (2020). Storage and preservation of plant virus cultures. In *Characterization of plant virses* (pp. 39-44), (pp. 125-131). Springer Protocols Handbooks.
DOI: https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-0334-5

43. Bioreba AG. (2019). *Potato virus Y (PVY): Product information: DAS-ELISA.* URL: https://www.bioreba.ch/bioreba.aspx

44. Bioreba AG. (2019). *Tobacco mosaic virus (TMV): Product information:DAS-ELISA.* URL: https://www.bioreba.ch/bioreba.aspx

45. Bioreba AG. (n.d.). *Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA): Test specifications.* Technical Information.

46. Bioreba AG. (n.d.). *ELISA data analysis: Determination of the cut-off or threshold value.* Technical Information.

47. Pazarlar, S., Gümüş, M., & Öztekin, G. B. (2013). The Effects of Tobacco mosaic virus Infection on Growth and Physiological Parameters in Some Pepper Varieties (Capsicum annuum L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca,* 41(2), 427-433.

48. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (1998). *Guidelines on good plant protection practice: Tobacco* (PP 2/15(1)).

49. Chatzivassiliou, E. K., Efthimiou, K., Drossos, E., Papadopoulou, A., Poimenidis, G., & Katis, N. I. (2004). A survey of tobacco crops and native flora in Greece. *European Journal of Plant Pathology,* 110(10), 1011-1023.
DOI: https://doi.org/10.1007/s10658-004-1598-1

50. EPPO. (2025). PM 7/125 (2) ELISA tests for viruses. *EPPO Bulletin,* 55(1), 66-72. DOI: https://doi.org/10.1111/epp.13071

51. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2021). PM 7/147 (1) Guidelines for the production of biological reference material. EPPO Bulletin.
DOI: https://doi.org/10.1111/epp.12781

52. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing / N. Boonham et al. Virus Research. 2014. Vol. 186. P. 20-31.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007