

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



**Real-time PCR detekce viru
Tomato ringspot virus (ToRSV)
v biologickém materiálu**

Lucie Valentová a kol.



**CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2021**

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Real-time PCR detekce viru Tomato ringspot virus (ToRSV) v biologickém materiálu

Lucie Valentová a kol.



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

2021

- Autoři: Mgr. Lucie Valentová, Ing. Martina Rejlová, Bc. Josef Podlipný,
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o., Holovousy 129, 508 01 Hořice
- Název: Real-time PCR detekce viru Tomato ringspot virus (ToRSV)
v biologickém materiálu
- Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu TJ02000159
Vývoj a validace souprav pro diagnostiku vybraných rostlinných virů,
Technologická agentura ČR (TAČR).
- Oponenti: RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D., Univerzita Hradec Králové
RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., ÚKZÚZ
- Další informace: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský schválil publikaci jako
certifikovanou metodiku. Metodice bylo vydáno Osvědčení č. UKZUZ
019932/2021 o uznání metodiky v souladu s podmínkami. Metodiky
hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory
výzkumu, vývoje a inovací.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1 Úvod..... | 7 |
| 2 Cíl metodiky..... | 8 |
| 3 Vlastní popis metodiky..... | 8 |
| 3.1 Detekce viru ToRSV pomocí real-time PCR | 8 |
| 3.1.1 Pre-analytická fáze..... | 8 |
| 3.1.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků..... | 8 |
| 3.1.1.2 Příjem vzorků do laboratoře | 9 |
| 3.1.2 Analytická fáze | 9 |
| 3.1.2.1 Izolace RNA | 9 |
| 3.1.2.2 Příprava cDNA..... | 12 |
| 3.1.2.3 Real-time PCR detekce | 14 |
| 3.1.3 Post-analytická fáze | 18 |
| 3.1.3.1 Vyhodnocování, analýza dat | 18 |
| 3.1.4 Validace metody..... | 21 |
| 3.1.4.1 Stanovení specificity..... | 22 |
| 3.1.4.2 Stanovení analytické senzitivity..... | 24 |
| 3.1.4.3 Stanovení opakovatelnosti..... | 25 |
| 3.1.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti..... | 26 |
| 3.2 Metoda na principu ELISA..... | 29 |
| 3.3 Porovnání metod real-time PCR a ELISA pro diagnostiku viru ToRSV | 29 |
| 3.3.1 Úvod | 29 |
| 3.3.2 Analýza citlivosti obou metod..... | 30 |
| 3.3.3 Analýza rostlinného materiálu..... | 32 |
| 4 Srovnání novosti postupů..... | 34 |
| 5 Popis uplatnění certifikované metodiky | 35 |
| 6 Ekonomické aspekty..... | 35 |
| 7 Seznam použité související literatury..... | 37 |
| 8 Seznam publikací, které předcházejí metodice | 39 |

1 ÚVOD

Virus kroužkovitosti rajčete (tomato ringspot virus; ToRSV) je primárně patogenem dřevin a polodřevin. Svůj název získal podle rostliny rajčete, ze které byl původně izolován na východě USA. Navzdory tomu jsou přírodní infekce u rajčat vzácné (Murant 1996). Může infikovat i zeleninu, některé druhy okrasných bylin a plevele, které jsou zpravidla rezervoárem viru (EPPO 2005). Výskyt ToRSV byl zaznamenán u ovocných plodin, jako jsou např. maliny, borůvky, vinná réva, broskvoně, třešně a jabloně (Rott *et al.* 1991, Walker *et al.* 2015, Martin a Tzanetakis 2018). Zkoumáním viru na okrasných rostlinách se zabývali Navalinskienė a Samuitienė (2000). ToRSV izolovali a identifikovali u 15 druhů okrasných rostlin patřících do 10 botanických čeledí. Přírozenou lokalitou výskytu je Severní Amerika. S rostlinným materiálem byl virus zavlečen téměř po celém světě. V České republice nález viru nebyl dosud prokázán. V ČR testoval virus ToRSV např. Špak *et al.* (2010) v borůvkách nebo Komínek (2008) ve vinné révě s negativním výsledkem.

Virus kroužkovitosti rajčete je taxonomicky zařazen do rodu *Nepovirus*, čeledi Secoviridae. Genom viru je tvořen dvěma segmenty (+)ssRNA. Na základě velikosti molekuly RNA2 je virus zařazen do skupiny nepovirů C. Virus je přenášen háďátkem *Xiphinema americanum sensu lato* Cobb (1913), které se v České republice nevyskytuje. Je přenosný také pylem, semeny (Moini *et al.* 2010) a vegetativním množением rostlin (Zitikaitė 2008).

ToRSV je uveden na seznamu regulovaných škodlivých organismů, který je součástí prováděcího nařízení Komise (EU) 2019/2072 (v ČR platné od 14. 12. 2019). Tyto organismy je nutné sledovat a také evidovat údaje o stavu jejich výskytu na území našeho státu. Údaje o situaci výskytu regulovaných škodlivých organismů jsou určeny hlavně pěstitelům a dalším oprávněným osobám, které dodávají na vnitřní trh EU rostliny a jiné komodity, které podléhají regulaci.

Vzhledem k tomu, že je Česká republika členem EU, platí v naší zemi i další normy (standards), podle kterých se řídí diagnostika a fytosanitární kontrola rostlinných patogenů. Jedná se o normy popsané Evropskou a středozevní organizací pro ochranu rostlin (EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization). Dle EPPO (2020) je ToRSV zařazen na seznam A2 škodlivých organismů doporučených k regulaci jako karanténní organismy. V rámci EPPO (2002) a EPPO (2008) je ToRSV uveden na seznamu patogenů, které jsou předmětem testování při certifikaci rozmnožovacího materiálu rybízu a pelargonii. Dále se výskyt ToRSV reguluje v rámci fytosanitárních kontrol zásilek osiva rajčat (EPPO 2016). V EPPO standardu „PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production“ jsou popsány fytosanitární postupy, které jsou primárně zaměřené na kontrolu míst produkce odrůd a podnoží druhů a hybridů *Malus*, *Pyrus*, *Prunus* a *Cydonia* včetně jejich příbuzných okrasných odrůd. Ve standardu „PM 3/32 (2) Tomato ringspot virus in fruit trees and grapevine: Inspection“ je popsána kontrola ToRSV u ovocných stromů a vinné révy. Přítomnost ToRSV se také sleduje v rostlinách jahodníků, které jsou předmětem dovozu (EPPO 2008). Kontrolou místa

produkce sazenic jahodníků se zabývá standard „PM 3/83 (1) *Fragaria plants for planting – inspection of places of production*“.

2 CÍL METODIKY

Standardně se ToRSV detekuje pomocí imunoenzymatické metody ELISA. Cílem této metodiky bylo navrhnout alternativní metodu detekce tohoto viru na principu real-time PCR, která bude využita pro verifikaci případných pozitivních nálezů při použití metody ELISA. Navržený detekční systém byl validován pro použití s cyklerem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu EPPO PM 7/98 (4) *Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity*. Dalším cílem metodiky bylo porovnání obou postupů při detekci ToRSV.

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika je rozdělena do tří částí. V první části je popsána detekce ToRSV pomocí nově navrženého systému na principu real-time PCR a jeho výkonnostní charakteristiky. V druhé části je popsán postup testování metodou ELISA a ve třetí části jsou uvedeny výsledky srovnání obou metod.

3.1 Detekce viru ToRSV pomocí real-time PCR

Veškeré laboratorní práce, které předcházely sepsání metodiky, byly prováděny v laboratoři, která je akreditována podle normy ČSN/EN ISO IEC 17025:2018 *Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří*. Celý diagnostický proces lze rozdělit do tří fází: pre-analytická, analytická a post-analytická. Metoda detekce ToRSV pomocí real-time PCR byla validována podle standardu EPPO PM 7/98 (4). Vzhledem k tomu, že se virus v České republice nevyskytuje, byla validace provedena pomocí syntetických standardů.

3.1.1 Pre-analytická fáze

V rámci těchto činností je prováděn odběr vzorků, převoz vzorků do laboratoře a jeho příjem laboratoří.

3.1.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Na základě obecných znalostí o odběrech vzorků rostlinného materiálu pro testování rostlinných virů metodami na principu PCR nebo ELISA je nejvhodnější doba pro odběr vzorků období od začátku rašení (duben) až do května, června, kdy jsou rostliny v období intenzivního růstu. Pro diagnostiku viru se odebírají listy nebo narašené pupeny. Další matricí, kterou lze pro testování virů použít, jsou semena. V případě dřevin se odebírají vzorky po celém obvodu koruny stromu. Odebrané části rostlin se vloží do mikroténového sáčku a vzorek se v co nejkratším čase dopraví do laboratoře. Po celou dobu převozu se vzorek uchovává v chladu, v období teplých dní lze pro převoz vzorků použít předchlazené nádoby.

3.1.1.2 Příjem vzorků do laboratoře

Vzorky se po příjmu do laboratoře okamžitě zpracují, nebo se ve zkumavkách šokově zamrazí v tekutém dusíku a uloží se do doby zpracování do mrazicího boxu při teplotě ≤ -70 °C. Při této teplotě je možné vzorky skladovat bez ztráty kvality nejméně 1 rok.

Ke zpracování se přijímají pouze vzorky, které nejsou znehodnoceny:

- Plísní
- Hnilobným procesem
- Pokročilou nekrotizací pletiv
- Dalšími faktory, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky

Kritické body při příjmu vzorků, na které je třeba zvláště dbát:

- Neporušenost obalu zásilky
- Jednoznačná identifikace každého vzorku
- Dodržení doby transportu vzorků do laboratoře od jejich odběru:

Samotné listy: 4 kalendářní dny

Výhony: 7 kalendářních dnů

3.1.2 Analytická fáze

Vlastní analytická fáze se provádí ve třech krocích:

- Izolace RNA
- Příprava cDNA
- Real-time PCR detekce

Kritické body analytické fáze, na které je třeba zvláště dbát:

- Dodržování zásad dekontaminace a hygieny platných pro laboratoř molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací
- Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie
- Zařazování extrakčních kontrol
- Dodržování standardní navážky vstupního materiálu
- Kvalita izolované RNA a připravené cDNA

3.1.2.1 Izolace RNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagií pro izolaci RNA:

- Homogenizace vzorku se provádí v tekutém dusíku.
- Vlastní izolace RNA se provádí pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu Ribospin™ Plant (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o) na bázi kolon. Postupuje se podle návodu výrobce.
- Specifikace kitu, typické výtěžky dle výrobce a vlastní laboratorní výsledky:

Specifikace kitu

| Specifikace | Ribospin™ Plant |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Typ izolace | Kolonová |
| Maximální množství výchozího vzorku | ~ 100 mg rostlinného pletiva |
| Maximální objem kolony | ~ 700 µl |
| Minimální eluční objem | 30 µl |
| Maximální vazebná kapacita | ~ 100 µg |

Typické výtěžky RNA

| Typ vzorku | Množství výchozího vzorku | Typický výtěžek | |
|-------------|--|-----------------|-------|
| List | <i>Cucumis sativus</i> L. (okurka) | 100 mg | 50 µg |
| | <i>Capsicum annuum</i> (červená paprika) | 100 mg | 22 µg |
| | <i>Lycopersicon esculentum</i> (rajče) | 50 mg | 13 µg |

Vlastní laboratorní výsledky

| Typ vzorku | Množství výchozího vzorku | Typický výtěžek | |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------|---------|
| List | <i>Prunus domestica</i> (slivoň) | 50 mg | 8,7 µg |
| | <i>Prunus avium</i> (třešeň) | 50 mg | 7,9 µg |
| | <i>Prunus armeniaca</i> (meruňka) | 50 mg | 6,8 µg |
| | <i>Prunus persica</i> (broskvoň) | 50 mg | 12,2 µg |
| | <i>Malus</i> Mill. (jabloň) | 50 mg | 12,9 µg |
| | <i>Pyrus</i> L. (hrušeň) | 50 mg | 15,6 µg |
| Narašený pupen | <i>Prunus domestica</i> (slivoň) | 50 mg | 27,6 µg |
| | <i>Prunus avium</i> (třešeň) | 50 mg | 28,6 µg |
| | <i>Prunus armeniaca</i> (meruňka) | 50 mg | 23,4 µg |
| | <i>Prunus persica</i> (broskvoň) | 50 mg | 20,2 µg |

- Úspěšná izolace RNA byla tímto kitem provedena v naší laboratoři také u následujících rostlinných druhů a matic:

izolace z listu - angrešt, broskvoň, černý rybíz, červený rybíz, hrušeň, jabloň, jahodník, kanadská borůvka, maliník, mandloň, meruňka, myrobalán, réva vinná, slivoň, třešeň, bohyška japonská, gladiol, hortenzie, lilie, muškát zahradní, narcis, petúnie, podeňka Andersonova, sasanka japonská, srdcovka, meloun cukrový, okurka setá, paprika, rajče jedlé, tykev cuketa, tykev muškátová

izolace ze semen - meloun cukrový, okurka setá, paprika, rajče jedlé, tykev cuketa, tykev muškátová

- U jiných rostlinných druhů lze očekávat podobné výtěžky.
- Izolovaná RNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbcí A260/A280) alespoň 1,8.
- Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. příprava cDNA) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -80 °C.
- Izolace RNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Všechny centrifugační kroky se provádějí ve stolní centrifuze s rotorem pro mikrozkušavky 2 ml při pokojové teplotě při relativní centrifugační síle [RCF] minimálně 10 000 g (u běžných centrifug zpravidla 13 000 - 14 000 otáček za minutu [RPM]).
- Jako kontrolu kvality přípravy RNA a ověření čistoty reagensů používaných pro izolaci lze doporučit tzv. extrakční kontrolu. K sérii paralelně izolovaných vzorků se provede kontrolní izolace, ale bez použití vstupního rostlinného materiálu. Tímto způsobem se testuje případná kontaminace použitých reagensů pro izolaci RNA.

Pracovní postup

1. V třetí misce se v tekutém dusíku homogenizuje dostatečné množství rostlinného pletiva na jemný prášek. Standardně se 50 mg homogenizovaného vzorku přenesse do 2ml mikrozkušavky (není součástí kitu).
2. Přidá se 450 μ l lyzačního pufru RPL nebo v případě tvorby sraženin alternativně pufr REL ve stejném množství. Vzorek se ihned důkladně promíchá na vortexu.
3. Vzorky se inkubují 3 minuty při pokojové teplotě.
4. Lyzát se přenesse pomocí 1ml špičky s filtrem s ustříženou špičkou nebo tenké kovové špachtličky na EzPure™ kolonu (žlutá barva).
5. Vzorky se centrifugují 2 minuty. V případě, že kolonou proteče pouze málo vzorku, lze centrifugaci opakovat.
6. Po stočení se proteklý lyzát opatrně bez narušení pelety přenesse do nové 1,5ml zkušavky (je součástí kitu); typicky se jedná o 350 μ l lyzátu.
7. K lyzátu se přidá 1 objem 70% EtOH (k 350 μ l lyzátu se přidá 350 μ l); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkušavky (cca 5x).
8. Maximálně 700 μ l směsi z kroku 7 se přenesse na mini spin kolonu s modrým kroužkem (typ W) se sběrnou zkušavkou.
9. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkušavky se oře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkušavky. V případě potřeby se na kolonu nanese zbytek lyzátu, zopakuje se krok 9.
10. Na W kolonu se přidá 500 μ l pufru RBW.

11. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
12. V čisté 1,5ml mikrozksamavce nebo přímo ve zkumavce s alikvotovanou DNase I (součást kitu) se připraví premix reakční směsi DNase I (na 2 μ l DNase I se přidává 70 μ l pufru DRB). Do středu W kolony se nanese 70 μ l DNase I reakční směsi, nechá se inkubovat minimálně 10 min. při pokojové teplotě. Pozor, DNase I je náchylná na fyzické poškození, nemíchejte ji a nemanipulujte s ní příliš prudce!
13. Na kolonu se přidá 500 μ l pufru RBW a nechá se stát 2 minuty. Pufr RBW inaktivuje DNase I.
14. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
15. Na kolonu se přidá 500 μ l pufru RNW.
16. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.
17. Zopakují se kroky 15-16.
18. Centrifuguje se 1 minutu, aby se zcela odstranil RNW pufr z kolony. Po stočení se W kolona opatrně vsune do čisté 1,5ml mikrozksamavky (součástí kitu).
19. Do středu W kolony se nanese 50 μ l RNase-free vody a vzorky se nechají stát 1 minutu při pokojové teplotě. Pro zvýšení koncentrace RNA je možné snížit eluční objem až na 30 μ l.
20. Centrifuguje se 2 minuty. Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy krátkodobě uchovat při 4 °C (např. pro navazující přípravu cDNA) nebo dlouhodobě uchovávat při -80 °C.
21. Čistota a koncentrace izolované RNA se stanoví pomocí spektrofotometru.

Odborníkovi v oboru jsou známy další postupy homogenizace vzorků a izolace RNA, které mohou vést ke srovnatelnému výsledku.

3.1.2.2 Příprava cDNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagentů pro přípravu cDNA:

- RNA izolovaná pomocí kitu Ribospin™ Plant, (GeneAll Biotechnology, Co., Ltd.; k.č. 307-150; dodává Bohemia Genetics s.r.o).
- Pro přípravu cDNA se používá maximálně 1 μ g izolované RNA.
- Reverzní transkriptáza: M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/ μ l (Invitrogen, k.č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.). Postupuje se podle návodu výrobce.
- Směs náhodných primerů-hexamerů: Primer Random p(dN)₆ (Roche, k.č. 11034731001; dodává Roche s.r.o.).
- Směs nukleotidů: dNTP mix, 10 mM každý nukleotid [40 mM celková koncentrace] (Genaxxon, k.č. M3016.1010; dodává Bohemia Genetics s.r.o.).

- Připravenou cDNA je možné pro další analýzy (např. PCR) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -20 °C.
- Příprava cDNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Jako kontrolu kvality přípravy cDNA lze doporučit tzv. „RT- kontrolu“. Z RNA příslušného vzorku se paralelně připravují dvě cDNA pouze s tím rozdílem, že se do RT- kontrolního vzorku nepřidá reverzní transkriptáza.

Pracovní postup

1. Podle počtu vzorků se ve stojánku připraví potřebný počet 0,2ml mikrozkušavek včetně zkumavky pro negativní kontrolu, pokud se připravuje (RT-). Jako negativní kontrola může být použita RNA z negativního vzorku nebo voda.
2. Do jednotlivých zkumavek se pipetuje:
 - a. 4 µl náhodných primerů o koncentraci 50 ng/µl
 - b. 1 µl 10 mM dNTPs (každý nukleotid; 40 mM celková koncentrace)
 - c. 1 - 5 µl celkové RNA (Celkové množství RNA v reakci by nemělo překročit 1 µg)
 - d. RNase free voda do celkového objemu 13 µl
 Směs se promíchá.
3. Směs se zahřeje v cykleru na 65 °C 5 minut. Po uplynutí inkubační doby se zkumavky prudce zchladí ve vymražené kovové destičce. Poté se krátce centrifugují.
4. Do jednotlivých zkumavek se napipetuje:
 - a. 4 µl 5x First-Strand Buffer
 - b. 2 µl 0,1 M DTT
5. Ke každé zkumavce se vzorkem kromě RT- se přidá 1 µl (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy, dobře se promíchá.
6. Vzorky se vloží do cykleru.
7. Vzorky projdou následujícími teplotními fázemi:
 - a. Inkubace při 37 °C po dobu 2 minut
 - b. Inkubace při 25 °C po dobu 10 minut
 - c. Inkubace při 37 °C po dobu 50 minut
 - d. Závěrečná denaturace při 70 °C po dobu 10 minut
 - e. Finální zchlazení na 4 °C
8. Takto připravenou cDNA lze přímo použít jako templát (zpravidla 2 µl) pro další PCR analýzy. cDNA se uchovává v mrazničce při -20 °C.

Odborníkovi v oboru jsou známy další postupy přípravy cDNA, které mohou vést ke srovnatelnému výsledku. Odborník v oboru může zvážit i případné naředení cDNA před real-time PCR krokem.

3.1.2.3 Real-time PCR detekce

Úvod

Metodika byla validována s využitím syntetických standardů typu Ultramer®. Sekvence standardů pokrývají celou cílovou oblast detekce u izolátů virů ToRSV a ToRSV-Ch, které jsou dodávány jako pozitivní kontrola v diagnostické soupravě ELISA od firmy Bioreba (k.č. 151453; 151353).

Metodiku lze použít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní detekci přítomnosti. Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro rostlinný mitochondriální gen *Nad5* (NADH dehydrogenase subunit 5; Interní pozitivní kontrola, IPC).

Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond, které je možné zakoupit zvlášť nebo použít ToRSV qPCR-RG detekční kit, který obsahuje všechny reagentie pro real-time PCR detekci pro cykler Rotor-Gene Q [Qiagen] (k.č. ToRSV_qPCR-RG; výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.).

Vzhledem k rozmanitosti používaných real-time PCR cyklerů, PCR reagentií, analyzačních software a dalších faktorů je níže uvedený postup pouze ukázkový a odborník v oboru si tento postup přizpůsobí ke konkrétním podmínkám technického a materiálního vybavení laboratoře.

Pro zabezpečování kvality výsledků zkoušky lze využít následující prvky kvality:

- Systém interních kontrol kvality
- Systém interních standardů
- Zkoušení slepého vzorku
- Opakování zkoušek při použití stejných nebo jiných metod
- Opakování zkoušek při použití stejného nebo jiného přístroje
- Průběžnou kontrolu měřicího zařízení
- Přezkoumání uváděných výsledků

Materiál

Metodika real-time PCR detekce viru ToRSV v biologickém materiálu je **validována pro přístroj Rotor-Gene Q** (Qiagen), s využitím následujícího materiálu a reagentií:

- Pro detekci viru ToRSV se používají následující primery a sondy:

Forward primer: GAATGGTTCAGCCACTTTTT

Reverse primer: AGAGGRTCGCTACTCCTCCGTC

Sonda_1: FAM-TTGTGWCGTACGATTAGAATCCCAG-BHQ1

Sonda_2: FAM-TWGTGTCGTATGATTAATAATCCCAGAA-BHQ1

- Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5*. Pro jeho detekci se používají následující primery a sonda:

Forward primer: GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT

Reverse primer: ACATAAATCGAGGGCTATGCGG

Sonda: 6-FAM-CCACAATTAACATCACTACGGTTCGGGCTA-BHQ1

- Pro vlastní real-time PCR se používá qPCR 2x Blue Master Mix (výrobce a dodavatel: Top-Bio, k.č. P523) podle návodu výrobce.
- Pro rutinní diagnostiku lze doporučit ToRSV qPCR-RG detekční kit (výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.), který obsahuje předmíchané PCR premixy a systém kontrol pro snadné a rychlé sestavení PCR reakce. Kit obsahuje: UniPmxI – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci [Pozn.: Nemusí být vždy v balení přítomen, záleží na typu kitu.]; ToRSV PmxII – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci viru ToRSV; IPC PmxII – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA; ToRSV Ctrl [500 000 kopií/μl] – pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru a IPC Ctrl [500 000 kopií/μl] – pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci IPC.
- Použitý spotřební materiál: Sterilní zkumavky 1,5 ml; PCR stripy pro Rotor-Gene Q; stojánky na zkumavky; špičky s filtrem; voda v kvalitě vhodné pro PCR.

Sestavení vlastní real-time PCR reakce

- Příprava PCR reakce probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (PCR area) s využitím PCR boxů a v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Přidávání syntetických pozitivních kontrol probíhá výhradně v místnosti post-PCR area.
- Pro pipetování se používají špičky s filtrem.
- Vzorky se doporučuje analyzovat v duplikátech.
- Všechny PCR komponenty se před zahájením práce vyjmou z mrazničky a nechají se roztát při pokojové teplotě.
- Před použitím je vhodné PCR komponenty promíchat krátkým vortexováním a dle potřeby stočit na minicentrifuze.
- Pro zajištění validity výsledků se používá systém minimálně následujících kontrol:
 - Kontrola bez přidaného templátu (No-Template Control; NTC)
Jedná se o kontrolu bez přidání vzorku. Tato kontrola se používá vždy u každého testování.
 - Pozitivní kontrola
Jedná se o kontrolu, která je pozitivní v definovaném rozsahu. Zpravidla se jedná o syntetickou pozitivní kontrolu o známé koncentraci.

- Interní kontrola kvality izolované RNA/cDNA, interní pozitivní kontrola (IPC)

Používá se real-time PCR systém pro detekci transkriptu pro rostlinný mitochondriální gen *Nad5*. Přítomnost tohoto transkriptu a hodnoty Ct jsou brány jako indikátor kvality izolované RNA/cDNA. Tato kontrola se provádí ke každému testovanému vzorku.

- Primárně je následující postup určen pro kvalitativní nebo semi-kvantitativní detekci viru ToRSV. Ředěním syntetické pozitivní kontroly lze však získat standardní kalibrační křivku, podle které je možné provádět vyhodnocení kvantitativně.

1. V PCR boxu se do kovového stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkušavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a syntetickou pozitivní kontrolu, případně další různě ředěné standardy pro tvorbu kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení.
2. Podle počtu současně míchaných PCR mastermixů se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkušavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce a rozpisu:

Rozpis pro detekci ToRSV s využitím základních PCR komponent

| ToRSV | Na 1 vzorek | Finální konc. |
|------------------------------|--------------|---------------|
| PCR voda | 5,2 µl | |
| ToRSV forward primer (10 µM) | 1 µl | 0,5 µM |
| ToRSV reverse primer (10 µM) | 1 µl | 0,5 µM |
| ToRSV sonda_1 (10 µM) | 0,4 µl | 0,2 µM |
| ToRSV sonda_2 (10 µM) | 0,4 µl | 0,2 µM |
| qPCR 2x Blue Master Mix | 10 µl | 1x |
| Celkem | 18 µl | |

*Rozpis pro detekci ToRSV s využitím **ToRSV qPCR-RG** detekčního kitu*

- Dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
- Kit obsahuje v základním balení komponenty pro provedení 100 testů. Přesný obsah kitu je uveden výše.

| ToRSV | Na 1 vzorek |
|---------------|--------------|
| PCR voda | 7 µl |
| ToRSV PmxII | 1 µl |
| UniPmxI | 10 µl |
| Celkem | 18 µl |

Rozpis pro IPC s využitím základních PCR komponent

| IPC | Na 1 vzorek | Finální konc. |
|----------------------------|--------------|---------------|
| PCR voda | 6,6 µl | |
| IPC forward primer (10 µM) | 0,5 µl | 0,25 µM |
| IPC reverse primer (10 µM) | 0,5 µl | 0,25 µM |
| IPC sonda (10 µM) | 0,4 µl | 0,2 µM |
| qPCR 2x Blue Master Mix | 10 µl | 1x |
| Celkem | 18 µl | |

Rozpis pro IPC s využitím ToRSV qPCR-RG detekčního kitu (součást kitu)

| IPC | Na 1 vzorek |
|---------------|--------------|
| PCR voda | 7 µl |
| IPC PmxII | 1 µl |
| UniPmxI | 10 µl |
| Celkem | 18 µl |

Detaily ohledně komponent kitu uvedeny výše.

3. Připravený mastermix se promíchá krátkým vortexováním a krátce se centrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
5. K mastermixu se postupně přidají do příslušné zkumavky 2 µl neředěné cDNA testovaného vzorku.

6. Po uzavření všech zkumavek se v post-PCR místnosti přidají 2 µl syntetické pozitivní kontroly (tedy 1 milion kopií/reakci) pro detekci ToRSV a IPC.
7. Po zapnutí Rotor-Gene Q se v obslužném softwaru připraví templát s následujícími parametry:

| | | |
|------------------------|-----------|--|
| Teplotní podmínky PCR: | 1 cyklus: | 94 °C 5 min |
| | 50 cyklů: | 94 °C 20 s |
| | | 58 °C 20 s; čtení v zeleném kanálu pro ToRSV a IPC |
| | | 72 °C 20 s |

 - Pro použitý fluorofor se doporučuje nastavit „Gains“ v kanále „Green“ na hodnotu 5,33.
Jedná se pouze o orientační hodnotu, přesné nastavení si musí uživatel provést sám během prvních třech cyklů nebo po prvním běhu dle návodu výrobce.
 - Předprogramovaný templát lze získat i na kontaktním e-mailu: laboratorni.komplement@vsuo.cz.
 - Celý proces amplifikace trvá cca 2 hodiny.
8. PCR produkty je možné uchovávat při teplotě ≤ -18 °C po dobu minimálně jednoho roku.

Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cykleru

Uživatelé jiných real-time PCR cyklerů než Rotor-Gene Q se musí před objednáním sond (detekčního kitu) seznámit s možnostmi detekce fluoroforů na svém PCR cykleru a s možnostmi příslušného analyzačního softwaru. Vzhledem k tomu, že použité sondy jsou značeny 6-FAM, měla by být detekce proveditelná na většině dodávaných real-time PCR cyklerech.

3.1.3 Post-analytická fáze

V této fázi se vyhodnocují výsledky a na základě všech dostupných informací se provádí jejich interpretace.

Kritické body post-analytické fáze, na které je třeba zvláště dbát:

- Správné vyhodnocení systému kontrol zajišťujících validitu výsledků.

3.1.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q

Pro vyhodnocení PCR běhu se používá identický software jako pro ovládání cykleru. Přesný postup vyhodnocování různých typů experimentů je uveden v příručce výrobce cykleru nebo přímo v nápovědě tohoto softwaru.

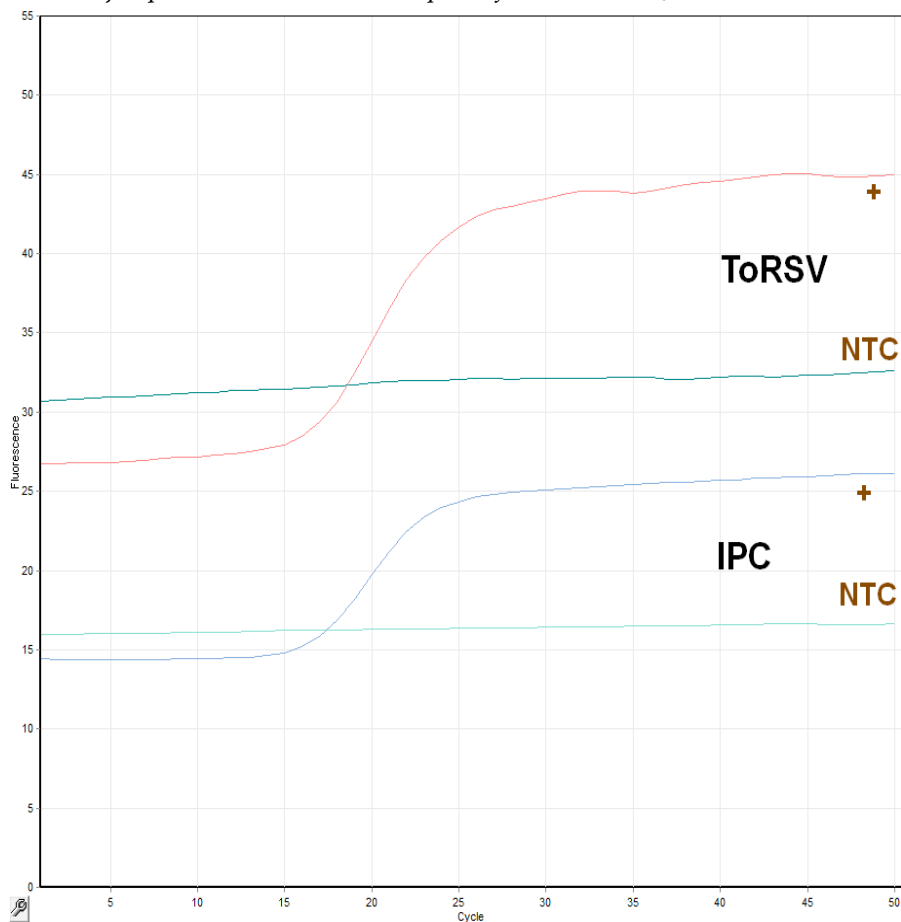
Po ukončení běhu se provádí vyhodnocení odečtením hodnoty Ct v zeleném kanálu pro detekci viru ToRSV a interní kontroly kvality (IPC).

Použité parametry pro vyhodnocení:

| | |
|--------------------------|--------------|
| Dynamic tube: | ANO |
| Slope correct: | ANO |
| Ignore first: | Fakultativně |
| Threshold: | 0,01 |
| Eliminate cycles before: | Dle potřeby |

Pokud se provádí kvantitativní hodnocení nálezů, software vytvoří na základě hodnot různě řaděných standardů a zadaných údajů kalibrační křivku a provede absolutní kvantifikaci přítomnosti viru ToRSV v požadovaných jednotkách.

Ukázka výstupu detekce ToRSV a IPC u přístroje Rotor-Gene Q



Vyhodnocení systému kontrol kvality

Interní kontrola kvality (IPC)

Interní kontrola kvality (IPC) slouží ke dvěma účelům: kontrola kvality izolace RNA a přípravy cDNA a zároveň jako inhibiční kontrola. Technicky se jedná o detekci mitochondriálního transkriptu *Nad5*, který je přítomen v každém rostlinném pletivu a musí pro každý vzorek vyjít pozitivní. Doporučuje se hodnoty Ct dlouhodobě sledovat, protože pro obdobné vzorky bývají hodnoty při standardních podmínkách velmi podobné. Využití této kontroly je tedy výhodné pro pracoviště provádějící rutinní diagnostiku zejména v akreditovaném režimu, neboť kontrolu lze využít jako kritérium hodnocení kvality celého předešlého procesu.

Při použití ToRSV qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložený IPC standard při použití 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct 18,93 – 19,77. Rozmezí představuje průměr ± 3 směrodatné odchylky. Rozpětí očekávaných hodnot Ct se mohou mírně odlišovat v závislosti na šarži kitu.

Kontrola kvality PCR reakce

Pro kontrolu kvality PCR reakce se používají dva typy kontrol. Pozitivní kontrolu může představovat charakterizovaný vzorek nebo zpravidla syntetický standard, který má stejnou sekvenci jako cílové místo pro PCR amplifikaci. Pozitivní kontrola představuje referenční materiál s definovaným rozpětím hodnot Ct, ve kterém se při zohlednění reprodukovatelnosti metody musí nálezy pohybovat u každého PCR běhu bez ohledu na osobu provádějící analýzu.

Při použití ToRSV qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložený ToRSV standard při použití 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct 19,99 – 21,41. Rozmezí představuje průměr ± 3 směrodatné odchylky. Rozpětí očekávaných hodnot Ct se mohou mírně odlišovat v závislosti na šarži kitu.

Negativní kontrola představuje PCR reakci bez přidaného templátu, tzv. netemplátová kontrola (NTC). NTC by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

Další kontroly

Pro kontrolu případné kontaminace reagensů používaných pro izolace RNA lze doporučit zařazení tzv. extrakční kontroly, kdy se provede izolace bez rostlinného materiálu. S touto kontrolou se poté pracuje jako se vzorkem. Extrakční kontrola by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

Jako další kontrolu lze doporučit kontrolu přípravy cDNA. Z RNA příslušného vzorku se paralelně připravují dvě cDNA s tím, že do jednoho vzorku se nepřidá reverzní transkriptáza (tzv. RT- kontrola). RT- kontrola by měla být za všech okolností u každého PCR běhu negativní.

Akceptace a interpretace výsledků

Pokud si laboratoř nestanoví jinak, výsledky z PCR běhu se akceptují, pokud:

- Všechny pozitivní kontroly jsou pozitivní v definovaném rozsahu.
- Všechny NTC kontroly jsou negativní.
- Extrakční kontrola je negativní.
- RT- kontrola je negativní.
- IPC je pozitivní v definovaném rozsahu.

Na základě typu analýzy lze výsledky interpretovat:

- Kvalitativně
 - Virus detekován/nedetekován; pozitivní/negativní výsledek
- Semi-kvantitativně
 - Na základě reálných zkušeností nebo statistických metod lze nálezy podle hodnot Ct přibližně kvantifikovat do různých kategorií, např:
 - - / + / ++ / +++
 - Negativní / slabě pozitivní / pozitivní / silně pozitivní
 - Lze též zavést kategorii pro výsledky na spodní hranici detekovatelnosti, které již vykazují nízkou míru reprodukovatelnosti, např. „výsledek podezřelý“ nebo „potenciálně pozitivní“ aj.
- Kvantitativně
 - Na základě sestrojené kalibrační křivky lze výsledky vydávat kvantitativně, např. v kopiích nalezeného viru na hmotnost původního materiálu.

Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cykleru

Uživatelé jiných typů real-time cyklerů provádějí vyhodnocení dle doporučení výrobce daného cykleru pro jednotlivé typy analýz.

3.1.4 Validace metody

Validace metody byla provedena podle výše uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s využitím kitu ToRSV qPCR-RG s přístrojem Rotor-Gene Q. Uživatelé jiných postupů a jiných real-time PCR cyklerů si musí provést validaci metody a stanovení výkonnostních charakteristik na svém pracovišti podle svých postupů s ohledem na své laboratorní vybavení.

Validace předkládané metodiky byla provedena podle protokolu EPPO PM 7/98 (4): Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity.

Validace představuje proces, při kterém byly stanoveny základní výkonnostní parametry metody. Tyto parametry by měly být adekvátní vzhledem k zamýšlenému

použití dané metody. U předkládané metodiky byly stanoveny následující výkonnostní charakteristiky:

- Specifická
- Analytická senzitivita
- Opakovatelnost
- Reprodukovatelnost

3.1.4.1 Stanovení specifity

Metodika

Specifita je zajištěna ve dvou krocích – analýzou *in silico* a ověřením na pozitivních a negativních vzorcích.

A) *In silico* analýza

Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza dostupných sekvencí viru ToRSV. Jako referenční sekvence byla pro ToRSV použita sekvence GenBank číslo NC_003840 pro segment 1 a NC_003839 pro segment 2. Při výběru vhodné oblasti se primárně přihlíželo k tomu, aby tento úsek byl specifický a zároveň dostatečně konzervován, aby byly detekovány všechny případné kmeny. Byly navrženy primery a sondy v oblasti, která je specifická pro ToRSV.

Navržená oblast byla dále analyzována pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), aby se vyloučila přítomnost této oblasti u příbuzných virů.

B) Specifita ověřená na pozitivních a negativních vzorcích

Vzhledem k tomu, že se virus ToRSV v České republice nevyskytuje, navržený detekční systém byl testován na pozitivních kontrolách, které jsou určeny pro detekci ToRSV a ToRSV-Ch metodou ELISA (Bioreba, Agdia) a na syntetických standardech typu Ultramer®, které odpovídají izolátům ToRSV a ToRSV-Ch pozitivních kontrol pro ELISA dodávaných firmou Bioreba. Pro ověření detekčního systému byly také použity tři vzorky RNA rostlin infikované virem ToRSV, které byly získány ze sbírky mikroorganismů v Leibniz-Institutu DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Z těchto vzorků byla izolována RNA, z níž byla pomocí reverzní transkripce připravena cDNA, která byla použita pro vlastní testování. Výsledky testování pozitivních kontrol byly verifikovány nezávislým detekčním systémem na principu ELISA. Specifita detekčního systému byla dále ověřena přímým sekvenováním ampliconů získaných z testování pozitivních kontrol (z ELISA) klasickou metodou PCR. Přehled kontrol pro ověření specifity detekce ToRSV je uveden v tabulce na další straně.

Kontroly použité pro ověření specifity real-time PCR detekčního systému.

| Název | Zdroj | Kat. číslo | Popis | Výsledek |
|--------------|--------------|-------------------|--|-----------------|
| ToRSV | Bioreba | 151453 | lyofilizovaný rostlinný materiál z <i>Nicotiana tabacum</i> infikovaný ToRSV | + |
| ToRSV-Ch | Bioreba | 151353 | lyofilizovaný rostlinný materiál z <i>Nicotiana tabacum</i> infikovaný ToRSV | + |
| ToRSV-A | Agdia | LPC22001 | lyofilizovaný rostlinný materiál (bez specifikace) | + |
| ToRSV | DSMZ | PV-0049 | celková RNA z <i>Pelargonium sp.</i> infikovaná ToRSV | + |
| ToRSV | DSMZ | PV-0380 | celková RNA z jabloně <i>Malus sylvestris</i> infikovaná ToRSV | + |
| ToRSV | DSMZ | PV-0381 | celková RNA z <i>Vitis sp.</i> infikovaná ToRSV | + |

Dle údajů z dostupné literatury byly pro otestování navrženého diagnostického systému pro detekci ToRSV vybrány rostliny, které byly předmětem testování ToRSV v daných publikacích. Jednalo se jak o ovocné plodiny, tak i o zeleninu a okrasné rostliny - jahodník, maliník, černý rybíz, červený rybíz, angrešt, kanadská borůvka, réva vinná, slivoň, myrobalán, třešeň, broskvoň, meruňka, jabloň, hrušeň, mandloň, muškát zahradní, sasanka japonská, srdcovka, bohyška japonská, podeňka Andersonova, gladiol, narcis, lilie, hortenzie, petúnie, okurka setá, rajče, paprika, tykev muškátová, meloun cukrový a tykev cuketa.

Všechny vzorky byly negativní. Z toho lze usuzovat, že navržený systém je vysoce specifický bez falešně pozitivních výsledků, které by byly způsobeny např. nespecifickou reakcí s RNA (resp. cDNA) dané rostliny.

Očekávaná hodnota parametru

Očekává se 100% specifita detekční metody.

Výsledky

Testované negativní vzorky byly negativní. Pozitivní vzorky byly pozitivní a byly ověřeny i jinými metodami, např. metodou ELISA nebo byla pro klasickou PCR s gelovou vizualizací použita jiná sada primerů.

Závěr

Inkluzivita metody (procento pozitivních vzorků z pozitivních) je stanovena na 100 %.
Exkluzivita metody (procento negativních vzorků z negativních) je stanovena na 100 %.
Analytická specifita metody je stanovena na 100 %.

3.1.4.2 Stanovení analytické senzitivity

Metodika

Syntetické pozitivní kontroly typu Ultramer® pro ToRSV „ToRSV_3UTR_Ctrl“ a pro ToRSV-Ch „ToRSV-Ch_3UTR_Ctrl“ o známé koncentraci 1 µg/µl byly postupně naředěny až na koncentraci 5 kopií/reakci (vypočítáno s pomocí DNA Calculator; <http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html>). Do PCR reakce byly použity 2 µl pro analýzu senzitivity.

Pro analýzu byly desítkovým ředěním připraveny tři ředící řady v opakování po osmi s cílem nalézt nejnižší koncentraci, u které budou všechny výsledky pozitivní u všech třech ředících řad.

Očekávaná hodnota parametru

- Nejnižší dosažené ředění s konzistentní detekcí alespoň 500 kopií/reakci pro testované izoláty ToRSV a ToRSV-Ch.

Výsledky

Analytická senzitivita detekce ToRSV

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| II/S1 LT | 33,05 | 33,77 | 32,86 | 33,26 | 32,82 | 33,41 | 32,87 | 32,94 |
| II/S2 LT | 33,80 | 33,90 | 32,65 | 33,03 | 32,55 | 33,54 | 32,98 | 33,22 |
| II/S3 LT | 32,73 | 32,83 | 32,96 | 33,24 | 32,56 | 33,27 | 32,96 | 32,98 |

Všechny výsledky byly pozitivní u ředění

500 kopií/reakci s průměrným

Ct 33,09 ± 0,37 (variační koeficient 0,0111).

Pro nejnižší testovanou koncentraci 5 kopií/reakci bylo pozitivních 75 % vzorků z řady.

| Průměr | SD | VK |
|--------|------|--------|
| 33,09 | 0,37 | 0,0111 |

Analytická senzitivita detekce ToRSV-Ch

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| II/S1 LT | 32,79 | 33,19 | 33,28 | 33,24 | 33,14 | 33,00 | 33,52 | 33,17 |
| II/S2 LT | 33,14 | 33,25 | 33,08 | 33,21 | 32,89 | 33,36 | 33,15 | 33,33 |
| II/S3 LT | 32,93 | 32,43 | 32,65 | 33,35 | 32,81 | 32,39 | 32,77 | 32,74 |

Všechny výsledky byly pozitivní u ředění

500 kopií/reakci s průměrným

Ct 33,03 ± 0,29 (variační koeficient 0,0088).

Pro nejnižší testovanou koncentraci 5 kopií/reakci bylo pozitivních 100 % vzorků z řady.

| Průměr | SD | VK |
|--------|------|--------|
| 33,03 | 0,29 | 0,0088 |

Závěr

- Skutečný limit metody detekce izolátu ToRSV je ≤ 5 kopií/reakci. Pro účely validace je analytická senzitivita metody detekce ToRSV stanovena na 500 kopií/reakci s průměrným Ct 33,09.
- Skutečný limit metody detekce izolátu ToRSV-Ch je ≤ 5 kopií/reakci. Pro účely validace je analytická senzitivita metody detekce ToRSV-Ch stanovena na 500 kopií/reakci s průměrným Ct 33,03.

3.1.4.3 Stanovení opakovatelnosti

Metodika

Opakovatelnost se stanovuje při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce ToRSV stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly „ToRSV_3UTR_Ctrl“. Pro ToRSV-Ch se opakovatelnost stanovuje při limitním ředění syntetického standardu, které bylo stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly „ToRSV-Ch_3UTR_Ctrl“.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly v rámci jednoho PCR běhu za identických podmínek. U každé série je stanoven variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených Ct při limitním ředění mezi jednotlivými sériemi.

Pro kvalitativní analýzu se opakovatelnost stanoví jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro oba izoláty ToRSV a ToRSV-Ch.

Očekávaná hodnota parametru

- Variační koeficient pro limitní ředění $\leq 2,5$ %.
- Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (opakovatelnost 100%).

Výsledky

Opakovatelnost detekce ToRSV

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | | | Průměr | SD | VK | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------------------------|--------------|---------------|---------------|
| II/S1 LT | 33,05 | 33,77 | 32,86 | 33,26 | 32,82 | 33,41 | 32,87 | 32,94 | | 33,12 | 0,31 | 0,0094 | |
| II/S2 LT | 33,80 | 33,90 | 32,65 | 33,03 | 32,55 | 33,54 | 32,98 | 33,22 | | 33,21 | 0,47 | 0,0142 | |
| II/S3 LT | 32,73 | 32,83 | 32,96 | 33,24 | 32,56 | 33,27 | 32,96 | 32,98 | | 32,94 | 0,22 | 0,0068 | |
| | | | | | | | | | | Průměrné hodnoty | 33,09 | 0,34 | 0,0101 |
| | | | | | | | | | | | SD VK | 0,0030 | |

Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je $0,0101 \pm 0,0030$, tj. 1,01 %.

Opakovatelnost detekce ToRSV-Ch

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | | Průměr | SD | VK |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------------|---------------|
| II/S1 LT | 32,79 | 33,19 | 33,28 | 33,24 | 33,14 | 33,00 | 33,52 | 33,17 | 33,17 | 0,20 | 0,0060 |
| II/S2 LT | 33,14 | 33,25 | 33,08 | 33,21 | 32,89 | 33,36 | 33,15 | 33,33 | 33,18 | 0,14 | 0,0042 |
| II/S3 LT | 32,93 | 32,43 | 32,65 | 33,35 | 32,81 | 32,39 | 32,77 | 32,74 | 32,76 | 0,28 | 0,0086 |
| Průměrné hodnoty | | | | | | | | | 33,03 | 0,21 | 0,0063 |
| | | | | | | | | | SD VK | | 0,0018 |

Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je $0,0063 \pm 0,0018$, tj. 0,63 %.

Závěr

- Opakovatelnost metody detekce izolátu ToRSV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 1,01 %.
- Opakovatelnost metody detekce izolátu ToRSV-Ch při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,63 %.
- Opakovatelnost metody detekce izolátů ToRSV a ToRSV-Ch při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

3.1.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti

Metodika

Reprodukovatelnost se stanovuje při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce ToRSV stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly „ToRSV_3UTR_Ctrl“. Pro ToRSV-Ch se reprodukovatelnost stanovuje při limitním ředění syntetického standardu, které bylo stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly „ToRSV-Ch_3UTR_Ctrl“.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly ve třech nezávislých PCR bězích provedených třemi různými pracovníky. Je stanoven variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených Ct při limitním ředění mezi jednotlivými nezávislými PCR běhy.

Pro kvalitativní analýzu se reprodukovatelnost stanoví jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro oba izoláty ToRSV a ToRSV-Ch.

Očekávaná hodnota parametru

- Variační koeficient pro limitní ředění ≤ 5 %.

Výsledky

Reprodukovatelnost detekce ToRSV

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci. Analýza byla provedena třemi různými pracovníky.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I/S1 JP | 32,86 | 33,11 | 32,75 | 33,15 | 33,30 | 32,92 | 33,29 | 33,03 |
| II/S1 LT | 33,05 | 33,77 | 32,86 | 33,26 | 32,82 | 33,41 | 32,87 | 32,94 |
| III/S1 LK | 32,78 | 33,17 | 32,88 | 33,03 | 32,61 | 33,54 | 33,24 | 33,19 |
| I/S2 JP | 32,77 | 33,11 | 32,76 | 32,86 | 32,81 | 32,22 | 32,66 | 33,67 |
| II/S2 LT | 33,80 | 33,90 | 32,65 | 33,03 | 32,55 | 33,54 | 32,98 | 33,22 |
| III/S2 LK | 33,04 | 33,30 | 33,30 | 32,80 | 33,16 | 32,51 | 32,77 | 33,54 |
| I/S3 JP | 32,88 | 32,69 | 32,55 | 32,31 | 32,01 | 31,70 | 32,26 | 32,02 |
| II/S3 LT | 32,73 | 32,83 | 32,96 | 33,24 | 32,56 | 33,27 | 32,96 | 32,98 |
| III/S3 LK | 33,00 | 32,85 | 32,96 | 32,77 | 32,58 | 32,05 | 32,49 | 32,46 |

| | | | |
|---|---------------|-------------|---------------|
| Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR běžích měřená variačním koeficientem je 0,0128, tj. 1,28 %. | Průměr | SD | VK |
| | 32,92 | 0,42 | 0,0128 |

Reprodukovatelnost detekce ToRSV-Ch

Tabulka níže uvádí hodnoty Ct pro tři ředící řady pro ředění 500 kopií/reakci. Analýza byla provedena třemi různými pracovníky.

| Běh/Série | Ct | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I/S1 JP | 31,84 | 32,09 | 31,83 | 32,20 | 31,85 | 32,06 | 32,51 | 32,57 |
| II/S1 LT | 32,79 | 33,19 | 33,28 | 33,24 | 33,14 | 33,00 | 33,52 | 33,17 |
| III/S1 LK | 31,90 | 32,15 | 32,69 | 32,48 | 32,53 | 33,01 | 32,69 | 32,87 |
| I/S2 JP | 32,29 | 31,85 | 31,68 | 31,95 | 31,91 | 32,20 | 32,00 | 32,14 |
| II/S2 LT | 33,14 | 33,25 | 33,08 | 33,21 | 32,89 | 33,36 | 33,15 | 33,33 |
| III/S2 LK | 32,48 | 32,78 | 32,66 | 32,67 | 33,03 | 32,60 | 32,45 | 32,85 |
| I/S3 JP | 32,05 | 31,68 | 31,46 | 31,60 | 31,41 | 31,58 | 31,80 | 31,72 |
| II/S3 LT | 32,93 | 32,43 | 32,65 | 33,35 | 32,81 | 32,39 | 32,77 | 32,74 |
| III/S3 LK | 32,87 | 32,42 | 32,43 | 32,45 | 31,83 | 32,39 | 32,48 | 32,05 |

| | | | |
|---|---------------|-------------|---------------|
| Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR běžích měřená variačním koeficientem je 0,0167, tj. 1,67 %. | Průměr | SD | VK |
| | 32,50 | 0,54 | 0,0167 |

Závěr

- Reprodukovatelnost metody detekce izolátu ToRSV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 1,28 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce izolátu ToRSV-Ch při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 1,67 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce izolátů ToRSV a ToRSV-Ch při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

Zjednodušený validační protokol

Název zkušební postupu: Detekce viru ToRSV metodou real-time PCR

Identifikace zkušební postupu: SOP_LMB_02; PP_LMB_12

Předmět zkoušky: Rostlinný materiál

Poznámky: Simplexní reakce; Rotor-Gene Q
v zeleném kanálu

Výkonnostní parametry

Hodnota, komentář

Analytická specifita ToRSV 100%

Analytická specifita ToRSV-Ch 100%

Analytická senzitivita ToRSV 500 kopií/reakci

Analytická senzitivita ToRSV-Ch 500 kopií/reakci

Opakovatelnost ToRSV Průměrný variační koeficient 1,01 % pro limitní ředění

Opakovatelnost ToRSV-Ch Průměrný variační koeficient 0,63 % pro limitní ředění

Opakovatelnost metody detekce kmenů ToRSV a ToRSV-Ch při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

Reprodukovatelnost ToRSV Variační koeficient 1,28 % pro limitní ředění

Reprodukovatelnost ToRSV-Ch Variační koeficient 1,67 % pro limitní ředění

Reprodukovatelnost metody detekce kmenů ToRSV a ToRSV-Ch při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

Dokumentace

Zpráva_z_validace_ToRSV_200824.doc

Závěr:

Na základě uvedených výkonnostních parametrů je možné zkušební postup používat pro detekci viru ToRSV metodou real-time PCR v rostlinném materiálu dle SOP_LMB_02 a PP_LMB_12.

Vypracoval dne: 24.8.2020 Mgr. Lucie Valentová

Schválil dne: 28.8.2020 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vedoucí laboratoře

*******Konec validačního protokolu*******

3.2 Metoda na principu ELISA

Pro svou jednoduchost a relativně nízkou cenu za provedení testu je metoda na principu DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) velice často využívána pro detekci nejrůznějších patogenů. Metoda je založena na interakci specifických protilátek s antigenem detekovaného cíle. Pro vizualizaci výsledků se používají enzymy navázané na protilátku (např. alkalická fosfatáza) a chromogenní substrát (pro alkalickou fosfatázu se používá p-nitrofenylfosfát; pNPP). Pokud je antigen přítomen, dochází k enzymatické reakci, při které je chromogenní substrát hydrolyzován na barevný produkt, který lze měřit spektrofotometricky. Intenzita zabarvení koreluje s koncentrací detekovaného antigenu.

Obecně se metoda ELISA považuje za méně citlivou ve srovnání např. s PCR, neboť nedochází k pomnožení detekovaného cíle. ELISA se proto využívá všude tam, kde citlivost metody není pro stanovení cíle limitující. Pokud se však tato metoda používá pro diagnostiku patogenů způsobujících závažná onemocnění, bývá pravidlem, že pozitivní nálezy jsou potvrzovány další metodou využívající jiný princip detekce.

ELISA soupravy na detekci viru ToRSV nabízí několik firem (např. Bioreba, Agdia, Loewe), a protože ToRSV patří mezi karanténní viry, které zatím nebyly v České republice nalezeny, je nutné případné pozitivní nálezy získané metodou ELISA potvrdit. Dalším cílem předkládané metodiky tedy bylo vzájemně porovnat metodu ELISA (primární metoda detekce ToRSV) s nově vyvinutou metodou na principu real-time PCR (konfirmační metoda).

3.3 Porovnání metod real-time PCR a ELISA pro diagnostiku viru ToRSV

3.3.1 Úvod

Pro porovnání obou metod byla využita detekční souprava firmy Bioreba. Reagencie pro detekci ToRSV (k.č. 151475) obsahují směs protilátek, které byly vytvořeny proti různým izolátům viru z širokého okruhu hostitelských rostlin. Tyto protilátky však nereagují se sérologicky odlišnými izoláty z révy vinné, původem z Kalifornie, napadené onemocněním grape yellow vein (GYV) nebo izoláty z jabloňové podnože původem z Oregonu, označenými Chickadee, které lze detekovat pomocí druhé sady označené jako ToRSV-Ch (k.č. 151375). Uvedené soupravy obsahují všechny potřebné reagencie a kontroly.

Metoda ELISA byla provedena přesně podle návodu výrobce s využitím originálních reagiencí. Jako nezávislá kontrola byla využita pozitivní kontrola ToRSV ze soupravy dodávané firmou Agdia.

Ze všech pozitivních kontrol byla izolována RNA (cDNA), která byla použita pro paralelní detekci metodou real-time PCR podle kapitoly 3.1.2.

Byly provedeny dva typy srovnávacích analýz: i) Analýza citlivosti obou metod využitím ředících řad pozitivních kontrol; ii) Analýza rostlinného materiálu s očekávaným negativním výsledkem.

3.3.2 Analýza citlivosti obou metod

Metodika

Pro srovnání obou metod byly použity tři pozitivní kontroly, které jsou součástí ELISA souprav: ToRSV (k.č. 151453; Bioreba); ToRSV-Ch (k.č. 151353; Bioreba) a ToRSV-A (k.č. LPC22001; Agdia). Lyofilizované kontroly byly rekonstituovány do původního objemu podle návodu výrobce v ultračisté vodě. Z rekonstituovaných pozitivních kontrol byly připraveny ředící řady s dvojnásobným ředěním ve vodě: 2×, 4×, 8×, 16× a 32×; a 200 µl bylo použito na izolaci RNA/přípravu cDNA (kapitoly 3.1.2.1 a 3.1.2.2) pro detekci viru metodou real-time PCR (kapitola 3.1.2.3). Paralelně bylo 200 µl z každého ředění otestováno na přítomnost viru ToRSV oběma soupravami od firmy Bioreba podle návodu výrobce.

Očekávaná hodnota parametru

- Metoda real-time PCR musí pro detekci všech izolátů ToRSV poskytovat stejné pozitivní výsledky v celém rozsahu koncentrací patogenu jako metoda ELISA.
- Metoda real-time PCR musí pro detekci všech izolátů ToRSV vykazovat nižší limit detekce (vyšší senzitivitu) než metoda ELISA, aby mohla být považována za konfirmační.

Výsledek

Výsledky testování jsou shrnuty v následující tabulce.

Srovnání citlivosti metody ELISA a real-time PCR pro detekci izolátů ToRSV. ELISA: vzorky v technických duplikátech; uvedena průměrná hodnota absorbance po odečtení pozadí ± směrodatná odchylka. Real-time PCR: vzorky v technických triplikátech; uvedena průměrná hodnota Ct ± směrodatná odchylka; údaj v závorce vyjadřuje procento pozitivních nálezů z testovaného triplikátu. (-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek; (PP): potenciálně pozitivní výsledek

| ToRSV pozitivní kontrola (Bioreba) | | | |
|------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| Ředění | Reagenční kit ToRSV | Reagenční kit ToRSV-Ch | Real-time PCR |
| Neředěno | (+) 3,690 ± 0,321 | (-) 0,081 ± 0,000 | (+) 31,63 ± 0,60 (100 %) |
| 2× | (+) 2,912 ± 0,110 | (-) 0,078 ± 0,002 | (+) 32,77 ± 0,32 (100 %) |
| 4× | (+) 1,740 ± 0,066 | (-) 0,080 ± 0,001 | (+) 35,41 ± 0,90 (100 %) |
| 8× | (+) 0,892 ± 0,032 | (-) 0,073 ± 0,001 | (+) 35,97 ± 0,59 (100 %) |
| 16× | (PP) 0,456 ± 0,002 | (-) 0,069 ± 0,002 | (+) 38,25 ± 0,24 (100 %) |
| 32× | (-) 0,354 ± 0,012 | (-) 0,065 ± 0,001 | (+) 38,84 ± 1,71 (66,6 %) |

| ToRSV-Ch pozitivní kontrola (Bioreba) | | | |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| Ředění | Reagenční kit ToRSV | Reagenční kit ToRSV-Ch | Real-time PCR |
| Neředěno | (PP) 0,449 ± 0,010 | (+) 0,802 ± 0,029 | (+) 29,88 ± 0,27 (100 %) |
| 2× | (-) 0,400 ± 0,023 | (+) 0,606 ± 0,099 | (+) 31,86 ± 0,44 (100 %) |
| 4× | (-) 0,361 ± 0,007 | (+) 0,365 ± 0,030 | (+) 32,62 ± 0,49 (100 %) |
| 8× | (-) 0,284 ± 0,005 | (+) 0,222 ± 0,030 | (+) 34,36 ± 0,37 (100 %) |
| 16× | (-) 0,400 ± 0,023 | (+) 0,165 ± 0,036 | (+) 34,41 ± 0,30 (100 %) |
| 32× | (-) 0,285 ± 0,009 | (PP) 0,101 ± 0,004 | (+) 34,87 ± 0,30 (100 %) |

| ToRSV-A pozitivní kontrola (Agdia) | | | |
|------------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| Ředění | Reagenční kit ToRSV | Reagenční kit ToRSV-Ch | Real-time PCR |
| Neředěno | (PP) 0,612 ± 0,019 | (-) 0,073 ± 0,001 | (+) 33,99 ± 0,38 (100 %) |
| 2× | (-) 0,382 ± 0,005 | (-) 0,069 ± 0,003 | (+) 33,81 ± 0,47 (100 %) |
| 4× | (-) 0,289 ± 0,016 | (-) 0,072 ± 0,003 | (+) 36,03 ± 0,18 (100 %) |
| 8× | (-) 0,248 ± 0,010 | (-) 0,067 ± 0,001 | (+) 35,15 ± 0,20 (100 %) |
| 16× | (-) 0,246 ± 0,003 | (-) 0,067 ± 0,002 | (+) 38,03 ± 1,64 (100 %) |
| 32× | (-) 0,251 ± 0,001 | (-) 0,066 ± 0,003 | (+) 39,65 (33,3 %) |

Z tabulky je zřejmé, že ELISA soupravy od firmy Bioreba jsou opravdu specifické pouze pro daný izolát ToRSV. Věrohodný detekční limit je pro základní soupravu ToRSV při ředění kontroly 8× až < 16×, souprava ToRSV-Ch dokáže věrohodně detekovat cíl při ředění kontroly 16× až < 32×. Překvapivě, žádná souprava ELISA od firmy Bioreba nebyla schopna jednoznačně detekovat izolát ToRSV-A dodávaný jako pozitivní kontrolu pro soupravy Agdia.

Validovaný real-time PCR systém byl naopak schopen detekovat všechny tři kontroly až do nejvyššího ředění 32×, byť s nižší pravděpodobností záchytu ToRSV. Teoretická senzitivita vyvinutého real-time PCR systému je však ještě 100× vyšší, neboť v průběhu přípravy cDNA a následné PCR reakce dochází k ředění detekovaného cíle. Případné zvýšení citlivosti lze dosáhnout např. snížením výsledného objemu RNA nebo použitím jednokrokové PCR kombinované s reverzní transkripcí, kdy nedochází k ředění cDNA. Tyto modifikace postupu však nebyly předmětem validace.

Závěr

- Metoda real-time PCR vykazovala stejné pozitivní výsledky pro detekci všech izolátů ToRSV v celém rozsahu koncentrací patogenu jako metoda ELISA.
- Metoda real-time PCR vykazovala vyšší senzitivitu detekce pro všechny testované izoláty ToRSV ve srovnání s metodou ELISA.
- Na základě výsledků lze metodu real-time PCR pro detekci ToRSV používat jako konfirmační.
- Uživatelům testovacích souprav pro detekci viru ToRSV od firmy Bioreba lze doporučit primární použití metody real-time PCR pro testování přítomnosti ToRSV v biologickém materiálu, protože tyto soupravy nejsou schopny zachytit všechny testované kmeny ToRSV.

3.3.3 Analýza rostlinného materiálu

Metodika

Pro srovnávací analýzu byly odebrány dostupné hostitelské rostliny viru ToRSV s předpokladem, že se bude jednat o rostliny negativní na přítomnost ToRSV. Rostlinné vzorky pocházely z Královéhradeckého kraje kromě 6 vzorků osiva z Hobby programu určeného pro zahrádkáře. Celkem bylo testováno 37 vzorků v zastoupení: 15x ovocný druh, 10x okrasná rostlina, 12x zelenina. Vstupním materiálem k testování u ovocných druhů a okrasných rostlin byly listy. U 6 druhů zeleniny byly k analýze využity jak listy, tak semena. K detekci viru ToRSV v rostlinném materiálu metodou ELISA byly použity obě dvě diagnostické soupravy ToRSV a ToRSV-Ch (Bioreba). Paralelně byly všechny vzorky otestovány pomocí real-time PCR.

Očekávaná hodnota parametru

- Metoda real-time PCR potvrdí případné pozitivní nálezy ToRSV získané metodou ELISA.
- Metoda real-time PCR bude použita pro konfirmaci negativních nebo potenciálně pozitivní nálezů ToRSV získaných metodou ELISA.

Výsledek

Výsledky srovnávací analýzy jsou shrnuty v následující tabulce.

Vzorky a matrice testované na přítomnost viru ToRSV metodou ELISA a real-time PCR. Soupravy ELISA použity od firmy Bioreba. (-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek; (PP): potenciálně pozitivní výsledek

| Rostlina | Rostlinný materiál | Reagenční kit ToRSV | Reagenční kit ToRSV-Ch | Real-time PCR |
|---------------------|--------------------|---------------------|------------------------|---------------|
| Jahodník | List | (-) | (-) | (-) |
| Maliník | List | (-) | (-) | (-) |
| Černý rybíz | List | (-) | (-) | (-) |
| Červený rybíz | List | (-) | (-) | (-) |
| Angrešt | List | (-) | (-) | (-) |
| Kanadská borůvka | List | (-) | (-) | (-) |
| Réva vinná | List | (-) | (-) | (-) |
| Slivoň | List | (-) | (-) | (-) |
| Myrobalán | List | (-) | (-) | (-) |
| Třešeň | List | (-) | (-) | (-) |
| Broskvoň | List | (-) | (PP) | (-) |
| Meruňka | List | (-) | (-) | (-) |
| Jabloň | List | (-) | (-) | (-) |
| Hrušeň | List | (-) | (-) | (-) |
| Mandloň | List | (-) | (PP) | (-) |
| Muškat zahradní | List | (-) | (-) | (-) |
| Sasanka japonská | List | (-) | (-) | (-) |
| Srdcovka | List | (-) | (-) | (-) |
| Bohyška japonská | List | (-) | (-) | (-) |
| Podeňka Andersonova | List | (-) | (-) | (-) |
| Gladiol | List | (-) | (-) | (-) |
| Narcis | List | (-) | (-) | (-) |
| Lilie | List | (-) | (-) | (-) |
| Hortenzie | List | (-) | (PP) | (-) |
| Petúnie | List | (-) | (-) | (-) |
| Okurka setá | List | (-) | (-) | (-) |
| Okurka setá | Semena | (-) | (-) | (-) |
| Rajče | List | (-) | (-) | (-) |
| Rajče | Semena | (-) | (-) | (-) |
| Paprika | List | (-) | (-) | (-) |
| Paprika | Semena | (-) | (-) | (-) |
| Tykev muškátová | List | (-) | (-) | (-) |
| Tykev muškátová | Semena | (-) | (-) | (-) |
| Meloun cukrový | List | (-) | (-) | (-) |
| Meloun cukrový | Semena | (-) | (PP) | (-) |
| Tykev cuketa | List | (-) | (-) | (-) |
| Tykev cuketa | Semena | (-) | (-) | (-) |

Z výsledků je patrné, že zatímco základní souprava ELISA pro detekci ToRSV nedetekovala v žádném vzorku tento virus, použití komplementární soupravy pro detekci ToRSV-Ch vedlo u čtyř vzorků (11 %) k nejednoznačnému výsledku. Real-time PCR metodou, která je citlivější, byl však u všech vzorků potvrzen negativní nález.

Závěr

- Real-time PCR metoda byla použita pro confirmaci negativních a nejednoznačných výsledků získaných metodou ELISA.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V současné době se pro rutinní detekci viru ToRSV nejčastěji využívá imunoenzymatická metoda ELISA. Tato metoda je vhodná pro testování většího objemu vzorků, ale je méně citlivá, než metody založené na principu PCR, které se dnes hojně v diagnostice rostlinných virů používají. Další nevýhodou ELISA mohou být falešně pozitivní výsledky, které mohou být způsobeny nespecifickými reakcemi nebo zkříženou reaktivitou (Kfir a Genthe 1993). Přesto má metoda ELISA své místo v diagnostice rostlinného viru ToRSV. Aby nedocházelo k falešným pozitivitám, je vhodné pozitivní výsledky získané metodou ELISA ověřit další nezávislou metodou, např. metodou na principu real-time PCR s využitím sond.

Z literatury jsou pro detekci ToRSV dostupné různě modifikované metody na principu PCR. Griesbach v roce 1995 vyvinul metodu pro detekci ToRSV založenou na principu polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR). Metoda je dle něj specifitější a citlivější než ELISA (Griesbach 1995). Metodou na principu real-time PCR s využitím TaqMan Low-density arrays (LDA) se zabývali Osman *et al.* (2008). Ti ve své studii srovnávali metodu TaqMan LDA real-time PCR s metodou real-time PCR s využitím TaqMan sond. Virus ToRSV detekovali společně s dalšími viry u révy vinné.

Návrh detekčního systému na principu klasické RT-PCR s gelovou vizualizací publikovali Gritsenko *et al.* (2020). Virus ToRSV ve svém detekčním systému testují společně s dalšími viry jabloní v multiplexní reakci. Primery v jejich práci byly navrženy v oblasti genu pro obalový protein.

Jak se zmiňují Wang a Sanfaçon (2000), různé izoláty ToRSV se mohou v kódující oblasti pro obalový protein lišit, a proto není tato oblast vhodná pro návrh sond, což také potvrdili ve své studii Stewart *et al.* 2007, kteří proto detekovali ToRSV metodou real-time PCR s interkalačním barvivem SYBR Green. V závěru uvádějí, že navržená sekvence o velikosti 330 bp v oblasti obalového proteinu je mezi konzervovanými primery variabilní a nelze do této oblasti navrhnout sondu, která dokáže detekovat všechny izoláty. Dále provedli porovnání metod real-time PCR a ELISA s výsledkem, že real-time PCR metoda detekovala všechny pozitivní vzorky ELISA, ale ELISA nedokázala detekovat všechny real-time PCR pozitivní vzorky.

Jednokrokovou real-time PCR s využitím TaqMan sond vyvinuli Tang *et al.* (2014).

K návrhu primerů a sond použili vysoce konzervovanou oblast 3'-UTR. Specificitu, senzitivitu a spolehlivost navrženého systému ve své práci ověřovali a porovnávali s existujícími metodami pro detekci ToRSV. Na rozdíl od uvedené publikace byly v našem detekčním systému v konzervované oblasti genomu 3'-UTR navrženy dvě sondy, čímž se potenciálně zvýšila specificita detekčního systému a zároveň byl zkrácen amplifikovaný fragment na polovinu, což může vést k zlepšené amplifikační účinnosti PCR reakce a tím k vyšší citlivosti metody.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce viru ToRSV v biologickém materiálu může být např. využita:

- Konfirmační metoda pro ověření nálezů ToRSV v biologickém materiálu získaných jinou diagnostickou metodou např. ELISA
- Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu
- Monitoring přítomnosti viru ToRSV na daném území
- Studium šíření viru ToRSV
- Základní výzkum biologie viru ToRSV
- Studium vektorů daných virů a jejich přirozených hostitelů

Validovaná metodika real-time PCR detekce viru ToRSV v biologickém materiálu je určena pro laboratoře molekulární biologie, které se věnují virologickému výzkumu nebo diagnostice virových onemocnění, jako např.:

- Laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ, NRL, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin)
- Referenční laboratoře
- Laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Při hodnocení ekonomických aspektů je nutné vycházet zejména z faktu, že ToRSV patří mezi karanténní organismy, které se na našem území zatím nevyskytují. S tím souvisí požadavek na spolehlivou metodu detekce, neboť se v případě potvrzeného nálezů karanténního organismu zahajují přísná fytosanitární opatření, která mohou mít zásadní ekonomický dopad pro postižené podnikající subjekty.

Druhý ekonomický pohled vychází z požadavků laboratoří, které musí touto spolehlivou metodou disponovat. Předkládaná validovaná metoda pro detekci ToRSV pomocí real-time PCR byla primárně určena jako metoda konfirmační pro ověření pozitivních/negativních nálezů získaných jinými metodami, např. ELISA. Vzhledem k publikovaným nižším výkonnostním parametrům běžně používané metody ELISA však doporučujeme, aby s ohledem na potenciální ekonomické dopady byla pro diagnostiku ToRSV primárně používána metoda založená na principu real-time PCR.

Konkrétní finanční přínos je však těžko odhadnutelný, bude záležet na aktivitách

konkrétní laboratoře. Oproti metodě ELISA je real-time PCR přístup mnohem rychlejší (hodiny versus dny), navíc v případě použití ELISA souprav od firmy Bioreba je nutné pro detekci ToRSV použít obě dodávané soupravy – standardní a pro detekci kmenů ToRSV-Ch – což analytický proces dále prodlužuje. Navíc je v případě detekce karanténních organismů jednoznačně upřednostňována rychlost, aby mohly být co nejdříve zahájeny příslušné kroky k nápravě ze strany státní správy. Rychlejší odezva laboratoře bude mít též pozitivní dopad na ekonomiku žadatele o vyšetření zdravotního stavu rostlin, neboť může získat výsledky v kratším čase, a tak pružněji reagovat na obdržené výsledky. Odhad ekonomického přínosu pro tyto žadatele je těžko vyčíslitelný, bude záležet na rozsahu nákazy a rychlosti odezvy laboratoře provádějící testy.

Další, ekonomicky obtížně kvantifikovatelný, pozitivní dopad bude mít využití metodiky pro testování rozmnožovacího materiálu, kdy včasnou detekcí případných pozitivních rostlin bude zabráněno případnému šíření ToRSV množitelským materiálem a tím i budoucím ztrátám na výnosu v dalších letech.

V laboratořích molekulární biologie, kde se rutinně provádí real-time PCR vyšetření přítomnosti RNA virů, jsou náklady na zavedení metodiky minimální a souvisejí pouze s nákupem primerů/sond (cena cca 8 000 Kč/1 000 reakcí), případně celého kitu. Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení pro real-time PCR, musí počítat s následujícími náklady (orientační ceny, uvedeno bez DPH):

| | | |
|----------------------|--------------|--------------|
| Izolace RNA: | 50 izolací | 7 000 Kč |
| Příprava cDNA: | 200 reakcí | 10 000 Kč |
| Primery+sondy | 1 000 reakcí | 8 000 Kč |
| PCR reagensie | 1 000 reakcí | 10 000 Kč |
| Real-time PCR cykler | 1 ks | > 800 000 Kč |

Na závěr uvádíme porovnání finančních nákladů navrženého diagnostického systému real-time PCR s metodou ELISA, které jsou spojené pouze s nákupem potřebných reagensií a spotřebního materiálu; do ceny nejsou zahrnuty další náklady, které jsou odlišné pro každou laboratoř (energie, mzdy, režie, amortizace, atd.). Pokud by se používaly obě dvě ELISA soupravy pro detekci ToRSV od firmy Bioreba, jejíž produkty se pro detekci rostlinných patogenů velmi často využívají, je kalkulovaná cena za analýzu cca 230 Kč. Pro metodu real-time PCR je kalkulovaná cena podle této metodiky cca 375 Kč, jednotlivé laboratoře však mohou realizovat i výrazně nižší cenu v závislosti na používaných reagensiích.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- PM 7/49 (1) Tomato ringspot nepovirus. OEPP/EPPO Bulletin. 2005, 35: 313–318. DOI:10.1111/j.1365-2338.2005.00831.x
- PM 1/2 (29) EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulations as quarantine pests. 2020: 1-19. Dostupné z https://www.eppo.int/media/uploaded_images/RESOURCES/eppo_standards/pm1/pm1-002-29-en.pdf
- PM 3/32 (2) Tomato ringspot virus in fruit trees and grapevine: Inspection. OEPP/EPPO Bulletin. 2013, 43: 397. DOI: 10.1111/epp.12073
- PM 3/73 (1) Draft commodity-specific phytosanitary procedure. OEPP/EPPO Bulletin. 2008, 38: 396–406. Dostupné z [eppo.int › pm3-073-1-en](https://www.eppo.int/pm3-073-1-en)
- PM 3/76 (1) Trees of Malus, Pyrus, Cydonia and Prunus spp. – inspection of places of production. OEPP/EPPO Bulletin. 2016, 46: 28–39. DOI: 10.1111/epp.12268
- PM 3/80 (1) Consignment inspection of seed of Solanum lycopersicum. OEPP/EPPO Bulletin. 2016, 46: 68–72. DOI: 10.1111/epp.12272
- PM 3/83 (1) Fragaria plants for planting – inspection of places of production. OEPP/EPPO Bulletin. 2017, 47: 349–365. DOI: 10.1111/epp.12408
- PM 4/3 (3) Certification scheme for pelargonium. OEPP/EPPO Bulletin. 2002, 32: 67–78. DOI: 10.1046/j.1365-2338.2002.d01-220.x
- PM 4/9 (2) Certification scheme for Ribes. OEPP/EPPO Bulletin. 2008, 38: 14–18. DOI:10.1111/j.1365-2338.2008.01177.x
- PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. OEPP/EPPO Bulletin. 2019, 49: 530–563. DOI: 10.1111/epp.12508
- GRIESBACH, John A. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant disease (USA)*. 1996, 79(10):1054-1056.
- GRITSENKO, D.A., AUBAKIROVA, K.P., VOITSEKHOVSKIY, I., SOLDATOVA, I., GALIAKPAROV, N.N. Simultaneous detection of five apple viruses by RT-PCR. *International Journal of Biology and Chemistry*. 2020, 13(1): 129-134. DOI:10.26577/ijbch.2020.v13.il.13
- KFIR, R., GENTHE, B. Advantages and disadvantages of the use of immunodetection techniques for the enumeration of microorganisms and toxins in water. *Water Science and Technology*. 1993, 27(3-4): 243-252.
- KOMÍNEK, P. Distribution of grapevine viruses in vineyards of the Czech Republic. *Journal of Plant Pathology*. 2008, 90(2): 357-358.
- MARTIN, R.R., TZANETAKIS, I.E. High risk blueberry viruses by region in North America; implications for certification, nurseries, and fruit production. *Viruses*. 2018, 10(7): 342. DOI:10.3390/v10070342

- MOINI, A.A., ROUMI, V., MASOUMI, M., IZADPANAH, K. Widespread occurrence of Tomato ring spot virus in deciduous fruit trees in Iran. *Julius-Kühn-Archi.* 2010, (427), 127-128.
- MURANT, A.F., JONES, A.T., MARTELLI, G.P., STACE-SMITH, R. *Nepoviruses: General Properties, Diseases, and Virus Identification.* In: Harrison B.D., Murant A.F. (eds) *The Plant Viruses. The Viruses.* Springer, Boston, MA. 1996: 99-137. DOI:10.1007/978-1-4899-1772-0_5
- NAVALINSKIENĖ, M., SAMUITIENĖ, M. Natural occurrence of Tomato ringspot nepovirus in ornamental plants in Lithuania. *Transactions of the Estonian Agricultural University. Agronomy.* 2000, 209:140-143.
- OSMAN, F., LEUTENEGGER, C., GOLINO, D., ROWHANI, A. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of virological methods.* 2008, 149(2): 292-299. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.012
- ROTT, M. E., TREMAINE, J. H., ROCHON, D. M. Nucleotide sequence of tomato ringspot virus RNA-2. *Journal of general virology.* 1991, 72(7): 1505-1514. DOI: 10.1099/0022-1317-72-7-1505
- SPAK, J., PRIBYLOVA, J., KUBELKOVA, D., PETRZIK, K., SPAKOVA, V. Detection of viruses and phytoplasma in *Vaccinium* sp. in the Czech Republic. *Acta Horticulturae.* 2012, 926: 631-635. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.926.91
- STEWART, E.L., QU, X., OVERTON, B.E., GILDOW, F.E., WENNER, N.G., GROVE, D.S. Development of a real-time RT-PCR SYBR green assay for Tomato ring spot virus in grape. *Plant disease.* 2007, 91(9): 1083-1088. DOI: 10.1094/ PDIS-91-9-1083
- TANG, J., KHAN, S., DELMIGLIO, C., WARD, L.I. Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the highly conserved 3'-UTR region. *Journal of virological methods.* 2014, 201: 38-43. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.02.011
- WALKER, M., CHISHOLM, J., WEI, T., GHOSHAL, B., SAEED, H., ROTT, M., SANFAČON, H. Complete genome sequence of three tomato ringspot virus isolates: evidence for reassortment and recombination. *Archives of virology.* 2015, 160(2): 543-547. DOI: 10.1007/s00705-014-2240-y
- WANG, A., SANFAČON, H. Diversity in the coding regions for the coat protein, VPg, protease, and putative RNA-dependent RNA polymerase among tomato ringspot nepovirus isolates. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 2000, 22(2): 145-149. DOI: 10.1080/07060660009500488
- ZITIKAITĖ, I. Nematode-transmissible virus disease agents detected in some vegetable crops. *Vytauto Didžiojo universiteto Botanikos sodo raštai.* 2008, 12: 147-163.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Metodice nepředcházely žádné publikace. Metodika vznikla *de novo* na základě výzkumné a vývojové činnosti autorů.

Poznámky:

**Real-time PCR detekce viru Tomato ringspot
virus (ToRSV) v biologickém materiálu**

Mgr. Lucie Valentová, Ing. Martina Rejlová, Bc. Josef Podlipný,
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Repropaint s.r.o.

ISBN 978-80-87030-80-6

