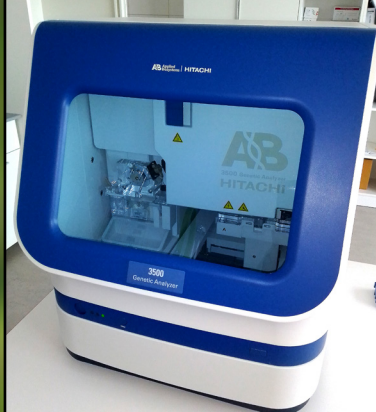


# VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

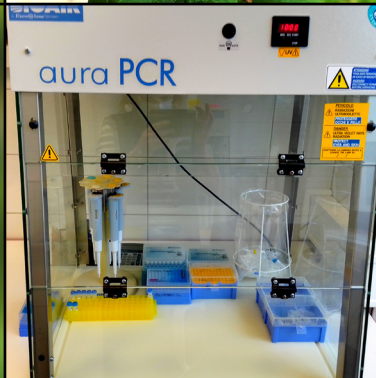


**Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v biologickém materiálu**

Lucie Valentová, Radek Čmejla



**CERTIFIKOVANÁ  
METODIKA  
2020**





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

**Real-time PCR detekce virů  
Blackcurrant reversion virus (BRV)  
a Gooseberry vein banding  
associated virus (GVBaV)  
v biologickém materiálu**

Lucie Valentová, Radek Čmejla



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

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

**2020**

- Autoři: Mgr. Lucie Valentová  
RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.  
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.  
Holovousy 129, 508 01 Hořice
- Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu TJ02000159  
Vývoj a validace souprav pro diagnostiku vybraných rostlinných virů,  
Technologická agentura ČR (TAČR).
- Oponenti: Ing. Tomáš Kiss, Mendelova univerzita v Brně  
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 205304/2020 o uznání metodiky v souladu s podmínkami  
Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové  
podpory výzkumu, vývoje a inovací.

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	7
<b>2. Cíl metodiky</b> .....	8
<b>3. Vlastní popis metodiky</b> .....	9
<b>3.1 Pre-analytická fáze</b> .....	9
3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků .....	9
3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře .....	10
<b>3.2 Analytická fáze</b> .....	10
3.2.1 Izolace RNA .....	10
3.2.2 Příprava cDNA .....	13
3.2.3 Real-time PCR detekce .....	14
3.2.3.1. Úvod .....	14
3.2.3.2. Materiál .....	15
3.2.3.3. Sestavení vlastní real-time PCR reakce .....	16
3.2.3.4. Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklu .....	19
<b>3.3 Post-analytická fáze</b> .....	19
3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat .....	19
3.3.1.1. Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q .....	19
3.3.1.2. Vyhodnocení systému kontrol kvality .....	20
3.3.1.3. Akceptace a interpretace výsledků .....	21
3.3.2 Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklu .....	21
<b>3.4 Validace metody</b> .....	21
3.4.1 Stanovení specificity .....	22
3.4.2 Stanovení analytické senzitivity .....	23
3.4.3 Stanovení opakovatelnosti .....	23
3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti .....	24
3.4.5 Zjednodušený validační protokol .....	25
<b>4. Srovnání novosti postupů</b> .....	26
<b>5. Popis uplatnění certifikované metodiky</b> .....	27
<b>6. Ekonomické aspekty</b> .....	28
<b>7. Seznam použité související literatury</b> .....	30
<b>8. Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	31



## 1. ÚVOD

Pěstování rybízu, který patří do skupiny ovocných plodin „drobné ovoce“, má v České republice dlouholetou tradici. Přestože není dominantním druhem této skupiny, zaslouží si pozornost, a to vzhledem k tomu, že je významným druhem ovocných dřevin pěstovaných v produkčních výsadbách i drobnými pěstiteli. V roce 2019 byla plocha plodných produkčních výsadb červeného a bílého rybízu 534 ha a černého rybízu 320 ha. K 15. 6. 2019 bylo z těchto ploch celkem sklizeno 1214 t červeného a bílého rybízu a 264 t černého rybízu. V roce 2018 se vyprodukovalo celkem 381 670 školkařských výpěstků rybízu (Buchtová 2019).

Význam pěstování rybízu je v produkci nutričně vysoce hodnotného ovoce určeného zejména pro potravinářský průmysl, kde ho lze využít jednak pro přímý konzum a dále pak v konzervářském, mrazírenském a nápojovém průmyslu. Rybíz patří mezi důležité zdroje vitamínů a esenciálních minerálních látek. Soural *et al.* (2019) testovali obsah kyseliny L-askorbové a antioxidační kapacitu v ovocných šťávách. Štáva z černého rybízu se ukázala pro spotřebitele jako atraktivní produkt, a to jak senzorycky, tak i z hlediska obsahu zkoumaných látek.

Jako každá rostlina, tak i rybíz je hostitelem mnoha virů. Mezi významné viry, které mohou ovlivňovat kvalitu výsledné produkce rybízu, jsou Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV). Virus BRV patří do čeledi Secoviridae (rod *Nepovirus*) a jeho genom je tvořen dvěma segmenty (+)ssRNA. GVBaV je zařazen do čeledi Caulimoviridae (rod *Badnavirus*) a jeho genom je reprezentován cirkulární dsDNA.

Choroba virový zvrát černého rybízu, jejímž původcem je virus BRV, byla pojmenována na základě toho, že rostlina mění svoji podobu (zejména listů). Rostlina se svým vzhledem tzv. „navrací“ zpět k primitivnějším divokým formám rybízu. Podle symptomů, které se na rostlinách objevují především na květech, můžeme odlišit dvě formy této choroby. U evropské E-formy virus vyvolává výrazný pokles hustoty chloupků na pupenech a zvyšuje intenzitu zabarvení pupenů. Nejvíce jsou symptomy patrné v růstovém období, kdy se pupeny začínají otevírat. Závažnější R-forma onemocnění, která je častá v ČR (Příbylová *et al.* 2002) a v dalších zemích střední Evropy, v zemích bývalého Sovětského svazu a Skandinávií, způsobuje dělení okvětních lístků na deset místo pět a zvyšuje jejich pigmentaci. Květy u obou forem jsou obvykle sterilní, předčasně opadávají a infikované rostliny se stávají neproduktivními (Latvala *et al.* 1997). Další příznaky BRV lze pozorovat na listech infikovaných rostlin, ty se projevují menším počtem laloků, listy jsou užší a protáhlejší, mají nerovnoměrně zoubkovaný okraj, svým vzhledem připomínají list kopřivy.

Virus BRV je přenášen pomocí roztoče – vlnovník rybízový (*Cecidophyopsis ribis*) a dále pak vegetativním množением rozmnožovacího materiálu, roubováním a očkováním. Jak uvádí Mazeikiene *et al.* (2019), virus BRV je prvním zástupcem nepovirů (viry přenášené nematody), který je přenášen roztočem.

Virus GVBaV způsobuje jednu z nejzávažnějších chorob rybízu po celé Evropě a Severní Americe. Pro toto onemocnění je charakteristické chlorotické lemování

listové žilnatiny, dochází k významnému snížení růstu a výnosu některých kultivarů rybízu. Virus je přenášen semiperzistentním způsobem pomocí různých druhů mšic: *Aphis grossulariae*, *Nasonovia ribisnigri* a *Hyperomyzus* spp. (Xu *et al.* 2011, Jones 2002). Virus se dále přenáší vegetativním množením rostlinného materiálu, roubováním a očkováním. Vyskytuje se také na angreštu, u kterého se příznaky choroby projevují viditelněji než u rybízu. Účinná kontrola onemocnění způsobená virem GVBaV závisí na výsadbě zdravého rozmnožovacího materiálu a na kontrole a regulaci výskytu mšic (Jones 2002).

Protože se oba viry přenášejí především vegetativním množením rostlin, účinná ochrana proti těmto virům je převážně preventivního charakteru spočívající zejména v produkci a používání bezvirózního rozmnožovacího materiálu. Oba viry BRV i GVBaV jsou uvedeny jednak na seznamu virů a virům podobných škodlivých organizmů, na které se testuje rozmnožovací materiál ovocných rodů a druhů v České republice, a také na seznamu patogenů dle certifikačního schématu pro testování rybízu PM 4/9 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for Ribes dle EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 95/2018 Sb., o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu chmele, révy, ovocných rodů a druhů a okrasných druhů a jeho uvádění do oběhu. Dle této platné legislativy je kontrola množitelského materiálu rybízu na přítomnost virů BRV a GVBaV povinná.

## 2. CÍL METODIKY

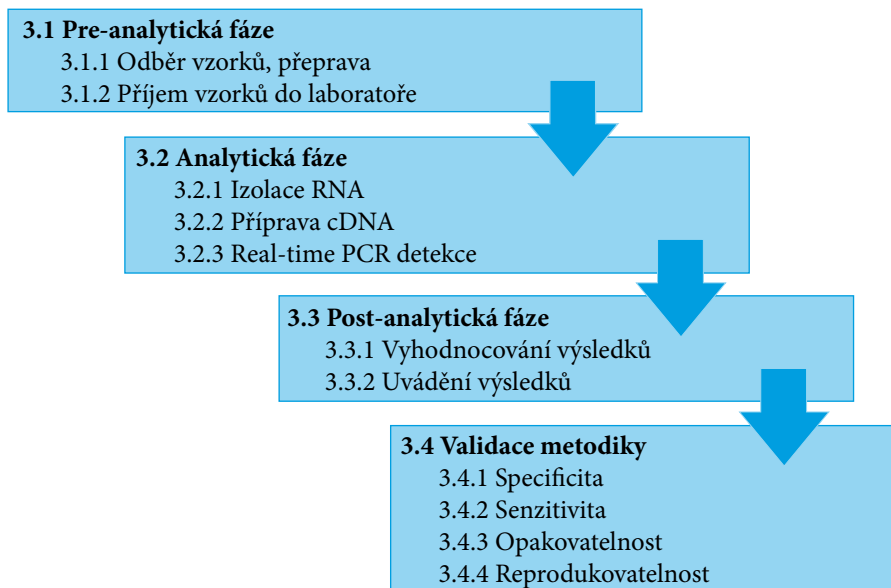
Metodika se zaměřuje na zavedení nového detekčního systému pro rutinní diagnostiku rostlinných virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV), které jsou původci virového onemocnění rybízu (*Ribes* spp.). BRV je původcem virového zvratu rybízu a GVBaV je původcem virového světlezeleného lemování žilek rybízu. Hostitelskými rostlinami těchto virů jsou zejména rybízy, avšak jak uvádějí Zulge *et al.* (2018) výskyt viru BRV byl popsán také u dalších příbuzných druhů, např. u meruzalky zlaté (*Ribes aureum*), meruzalky vonné (*Ribes fragrans*), meruzalky svazčité (*Ribes fasciculatum*) a dále u *Ribes alpinum* a *Ribes spicatum* (Latvala *et al.* 1997), virus GVBaV byl nalezen u angreštu (*Ribes uva-crispa*).

Navržená metodika detekce virů je založena na principu real-time PCR. Tento přístup umožňuje současnou kvalitativní/kvantitativní detekci obou virů v jedné reakci. Navržený detekční systém byl validován v multiplexním uspořádání pro použití s cyklerem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu EPPO PM7/98(4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Využití detekčního systému se předpokládá zejména pro rutinní diagnostiku těchto virů při certifikaci rozmnožovacího materiálu, dále pak pro využití ve virologických laboratořích v základním či aplikovaném výzkumu.



### 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Vlastní metodika sestává z několika kroků:

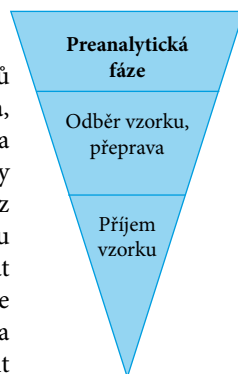


Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů molekulárně-biologických metod a principů správné laboratorní praxe. Metodika byla testována a validována s použitím konkrétních reagensií, souprav a přístrojů (viz níže), odborník v oboru však bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře a používané laboratorní reagensie.

#### 3.1 Pre-analytická fáze

##### 3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Nejvhodnější dobou odběru vzorků rybízu pro detekci virů BRV a GVbAV je období od dubna do první poloviny června, kdy se odebírají listy. Rybízu lze však díky citlivé metodě na principu real-time PCR testovat po celý rok. V době, kdy nejsou k dispozici listy, je možné testování virů provádět z narašených pupenů. Protože se viry BRV a GVbAV mohou vyskytovat v rostlinách nerovnoměrně, doporučuje se odebírat vzorky po celém obvodu keře (8-12 listů), pokud možno ze všech stran, aby se získal reprezentativní vzorek. Odebrané a řádně označené vzorky je nutné uchovávat v chladu a dopravit co nejrychleji do laboratoře.



### 3.1.2 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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 nektrózou 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

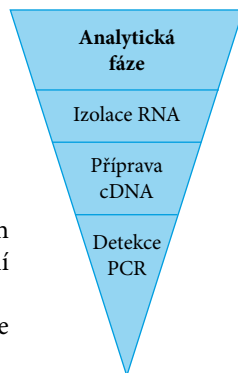
### 3.2 Analytická fáze

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



#### 3.2.1 Izolace RNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagentů 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 a typické výtěžky:

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

### Typické výtěžky

Typ vzorku		Množství výchozího vzorku	Typický výtěžek
List	<i>Pinus densiflora</i> (Borovice)	100 mg	2,7 µg
	<i>Cucumis sativus</i> L. (Okurka)	100 mg	50 µg
	<i>Zea mays</i> (Kukuřice)	100 mg	11 µg
	<i>Capsicum annuum</i> (Červená paprika)	100 mg	22 µg
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Rajče)	50 mg	13 µg
	<i>Lactuca sativa</i> (Hlávkový salát)	100 mg	29 µg
	<i>Citrus grandis</i> Osbek (Satsuma)	100 mg	4,6 µg
	<i>Diospyros kaki</i> (Tomel japonský – Kaki)	100 mg	16 µg
	<i>Crassula ovata</i> (Tlustice vejčitá)	100 mg	3 µg
	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabák)	50 mg	13 µg
Kořen	<i>Allium cepa</i> (Cibule)	100 mg	8 µg
	<i>Plantago asiatica</i> (Jitrocel asijský)	50 mg	2,5 µg
	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabák)	50 mg	5,3 µg
Plod	<i>Citrus grandis</i> Osbek (Satsuma)	50 mg	1,1 µg
Klíček	<i>Allium cepa</i> (Cibule)	100 mg	9 µg

- Typický výtěžek RNA z 50 mg **rybízu** (*Ribes* spp.) je 7,7 µg (vlastní laboratorní výsledky).
- 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 mikrozkumavky 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 třecí misce se v tekutém dusíku homogenizuje dostatečné množství rostlinného pletiva na jemný prášek. Standardně se 50 mg homogenizovaného vzorku přenese do 2ml mikrozkumavky (není součástí kitu).
2. Přidá se 450 µl 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 přenese pomocí 1ml špičky s filtrem s ustríženou 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 přenese do nové 1,5ml zkumavky (je součástí kitu); typicky se jedná o 350 µl lyzátu.
7. K lyzátu se přidá 1 objem 70% EtOH (k 350 µl lyzátu se přidá 350 µl); roztoky je nutné okamžitě promíchat otáčením zkumavky (cca 5x).
8. Maximálně 700 µl směsi z kroku 7 se přenese na mini spin kolonu s modrým kroužkem (typ W) se sběrnou zkumavkou.
9. Centrifuguje se 1 minutu. Proteklá tekutina se vylije, okraj sběrné zkumavky se otře buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky. V případě potřeby se na kolonu nanese zbytek lyzátu, zopakuje se krok 9.
10. Na W kolonu se přidá 500 µl 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 mikrozkumavce nebo přímo ve zkumavce s alikvotovanou DNase I (součást kitu) se připraví premix reakční směsi DNase I (na 2 µl DNase I se přidává 70 µl pufru DRB). Do středu W kolony se nanese 70 µl 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 µl pufru RBW a nechá 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 µl 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 mikrozkumavky (součástí kitu).
19. Do středu W kolony se nanese 50 µl 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 µl.
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 stejnému výsledku.

### 3.2.2 Příprava cDNA

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

- Pro přípravu cDNA se používá 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 µg izolované RNA.
- Pro přípravu cDNA se používá reverzní transkriptáza: M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl (Invitrogen, k.č. 28025-013; dodává Life Technologies Czech Republic s.r.o.). Postupuje se podle návodu výrobce.
- Pro přípravu cDNA se používá směs náhodných primerů-hexamerů: Primer Random p(dN)<sub>6</sub> (Roche, k.č. 11034731001; dodává Roche s.r.o.).
- Pro přípravu cDNA se používá směs nukleotidů: dNTP mix, 10 mM každý (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 napipetuje:
  - a. 4  $\mu$ l náhodných primerů o koncentraci 50 ng/ $\mu$ l
  - b. 1  $\mu$ l 10 mM dNTPs (každý nukleotid; 40 mM celková koncentrace)
  - c. 1–5  $\mu$ l celkové RNA (Celkové množství RNA v reakci by nemělo překročit 1  $\mu$ g.)
  - d. RNase free voda do celkového objemu 13  $\mu$ l  
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  $\mu$ l 5 $\times$  First-Strand Buffer
  - b. 2  $\mu$ l 0,1M DTT
5. Ke každé zkumavce se vzorkem kromě RT- se přidá 1  $\mu$ l (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  $\mu$ l) 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 stejnému výsledku. Odborník v oboru může zvážit i případné naředení cDNA před real-time PCR krokem.

### **3.2.3 Real-time PCR detekce**

#### **3.2.3.1. Úvod**

Metodika je validována pro současnou detekci virů BRV a GVBaV v jedné reakci (multiplexní uspořádání). Metodiku lze použít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní detekci přítomnosti obou virů. 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 RibesVir qPCR-RG detekční kit, který obsahuje všechny reagenty pro real-time PCR detekci pro cykler Rotor-Gene Q [Qiagen]

(k.č. RibesVir\_qPCR-RG; výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.). Sondy musí být vhodně označeny vzhledem k zamýšlenému použití a detekčním možnostem real-time PCR cyklieru. Pro detekci v multiplexním uspořádání se doporučuje sondy označit tak, aby vrcholy jejich emisních spekter byly co nejdále od sebe vzhledem k detekčním schopnostem příslušného cyklieru.

Vzhledem k rozmanitosti používaných real-time PCR cyklierů, PCR reagentů, 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

### 3.2.3.2. Materiál

Metodika real-time PCR detekce virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu je validována pro přístroj Rotor-Gene Q (Qiagen), s využitím následujícího materiálu a reagentů:

- Pro multiplexní detekci virů BRV a GVBaV se používají následující primery a sondy:

**BRV:** Forward primer: ACTTGGGAGACAAAGTCTCATCC  
Reverse primer: GGTARGGGTTTGCTAATAATGAGC  
Sonda: FAM-CTACTTGCCCTATCAGTAGGGATGGGA-BHQ1

**GVBaV:** Forward primer: CCGCAGMACAGGAAGAGATYCT  
Reverse primer 1: GGGCCTGGGCTTCCAGC  
Reverse primer 2: TTTGGACCTGGGCTTCTAGC  
Sonda: HEX-ATCCTTCGTTTCYTTGGGCTGGACCTC-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-CCACAATTAACATCACTACGGTCGGGCTA-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 RibesVir 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; RibesVir PmxII – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci virů BRV a GVBaV v jedné reakci; IPC PmxII – premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA; BRV Ctrl [500 000 kopií/μl] – pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru BRV; GVBaV Ctrl [500 000 kopií/μl] – pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru GVBaV; 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.

### 3.2.3.3. 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 virů BRV a GVBaV. Ředěním syntetické pozitivní kontroly lze však získat standardní kalibrační křivku, podle které je možné provádět vyhodnocení kvantitativně.
- Pro úsporu času a financí lze připravit jednu syntetickou pozitivní kontrolu smícháním obou syntetických standardů BRV s GVBaV.

\*\*\*\*\*

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

*Rozpis pro současnou detekci BRV a GVBaV s využitím základních PCR komponent*

BRV + GVBaV	Na 1 vzorek	Finální konc.
PCR voda	2,6 µl	
BRV forward primer (10 µM)	1 µl	0,5 µM
BRV reverse primer (10 µM)	1 µl	0,5 µM
BRV sonda (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
GVBaV forward primer (10 µM)	1 µl	0,5 µM
GVBaV reverse primer 1 (10 µM)	1 µl	0,5 µM
GVBaV reverse primer 2 (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
GVBaV sonda (10 µM)	0,4 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 µl	1x
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	

*Rozpis pro současnou detekci BRV a GVBaV s využitím RibesVir 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.

BRV + GVBaV	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
RibesVir PmxII	1 µl
UniPmxI	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

*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
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>	

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

IPC	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
IPC PmxII	1 µl
UniPmxI	10 µl
<b>Celkem</b>	<b>18 µl</b>

Detaily komponent kitu uvedeny výše.

- Připravený mastermix se promíchá krátkým vortexováním a krátce se centrifuguje.
- Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
- K mastermixu se postupně pipetují 2 µl neředěné cDNA testovaného vzorku.
- Po uzavření všech zkumavek se v post-PCR místnosti přidají 2 µl syntetické pozitivní kontroly (tedy 1 milion kopií/reakci) pro detekci BRV, GVbAV a IPC.
- 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 BRV a IPC

čtení ve žlutém kanálu pro GVbAV

72 °C 20 s

- Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty.

Green: 5,33; Yellow: 6

Jedná se pouze o orientační hodnoty, 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  $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu minimálně jednoho roku.

### 3.2.3.4. 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 různých fluoroforů na svém PCR cykleru a s možnostmi příslušného analyzačního softwaru. Dále je nutné posoudit možnosti přístroje pro multiplexování a naprogramovat příslušný PCR protokol.

## 3.3 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.

### 3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

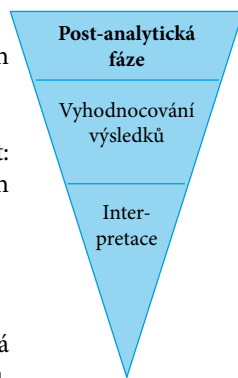
#### 3.3.1.1. Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q

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 BRV a interní kontroly kvality (IPC), a ve žlutém kanálu pro detekci viru GVBAV. 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 sérií různě ředěných standardů a zadaných údajů kalibrační křivku a provede absolutní kvantifikaci přítomnosti viru BRV nebo GVBAV v požadovaných jednotkách.

### 3.3.1.2. 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 zejména pro pracoviště provádějící rutinní diagnostiku zejména v akreditovaném režimu, neboť kontrolu lze využít jako kritérium hodnocení kvality celého předešlého procesu.

Při použití RibesVir 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  $\pm 3$  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 RibesVir qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložené BRV a GVBaV standardy při použití 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct dle tabulky níže.

*Přehled očekávaných výsledků pro systém kontrol, které jsou součástí RibesVir qPCR-RG detekčního kitu. Rozmezí představuje průměr  $\pm 3$  směrodatné odchylky.*

Standard [1mil. kopií/rci]	Očekávaná hodnota Ct
BRV	17,33 – 17,72
GVBaV	18,35 – 18,99

Poznámka: Rozpětí očekávaných hodnot Ct se mohou mírně odlišovat v závislosti na šarži kitu.

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

#### Další kontroly

Pro kontrolu případné kontaminace reagensů používaných pro izolaci 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.

### 3.3.1.3. 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 sestavené kalibrační křivky lze výsledky vydávat kvantitativně, např. v kopiích nalezeného viru na hmotnost původního materiálu.

### 3.3.2 Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklieru

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

## 3.4 Validace metody

Validace metody byla provedena podle výše uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s využitím kitu RibesVir qPCR-RG (multiplexní detekce) s přístrojem Rotor-Gene Q. Uživatelé jiných postupů a jiných real-time PCR cyklierů 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 č. 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:

- Specificita
- Analytická senzitivita
- Opakovatelnost
- Reprodukovatelnost

Následující kapitoly obsahují pro přehlednost pouze zkrácený výtah a závěry ze Zprávy o validaci.

### 3.4.1 Stanovení specificity

#### *Metodika*

Specificita je zajištěna ve dvou krocích:

#### A) Specificita definovaná *in silico*.

Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza dostupných sekvencí virů BRV a GVBaV v databázi GenBank. Jako referenční sekvence byla pro BRV použita sekvence GenBank číslo NC\_003509 pro segment 1 a NC\_003502 pro segment 2; pro GVBaV sekvence GenBank číslo NC\_018105. Při výběru vhodné oblasti se primárně přihlíželo k tomu, aby tento úsek byl specifický pro daný virus a zároveň dostatečně konzervován, aby byly detekovány všechny případné kmeny. Byly navrženy primery a sondy v oblasti, která je specifická pouze pro BRV a GVBaV.

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. Pro vytipované genomové oblasti virů byly navrženy zkušební primery.

#### B) Specificita ověřená na pozitivních a negativních vzorcích

Pomocí navržených primerů bylo provedeno testování souboru vzorků rybízů posbíraných v celé České republice, aby byla zajištěna co největší variabilita izolátů virů BRV a GVBaV. Získané amplikony byly sekvenovány (minimálně 50 vzorků), aby se zjistila genetická variabilita vybraných oblastí. Na základě těchto analýz byly poté navrženy finální primery a sondy pro detekci virů BRV a GVBaV. Tyto byly následně zpětně testovány na souboru původních vzorků rybízů a výsledky porovnány s původními nálezy.

Všechny podstatné kroky vývoje detekčního systému byly verifikovány sekvenačně. Specificita byla též ověřena na negativních vzorcích.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

- Očekává se 100% specificita pro diagnostiku jednotlivých virů.

#### *Výsledky*

Testované negativní vzorky byly negativní, u pozitivních vzorků byla detekována přítomnost příslušného viru. Pozitivní i negativní vzorky byly testovány a ověřeny i jinými metodami, např. pomocí jiné sady primerů..

## Závěr

Diagnostická specifická metody je stanovena na 100 % pro viry BRV a GVBaV.

### 3.4.2 Stanovení analytické senzitivity

#### Metodika

Syntetické pozitivní kontroly pro BRV a GVBaV identické s cílovými místy detekce o známé koncentraci 1 µg/µl byly postupně naředěny ve vodě 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 připraveny tři ředící řady v opakování po osmi s cílem nalézt nejnižší koncentraci, u které budou všechny výsledky pozitivní u všech tří ředících řad.

Protože se jedná o multiplexní reakci se současnou detekcí obou virů, byl testován i vliv multiplexování na analytickou senzitivitu porovnáním se simplexní detekcí konkrétního viru.

#### Očekávaná hodnota parametru

- Multiplexováním nedojde k snížení analytické senzitivity.
- Nejnižší dosažené ředění s konzistentní detekcí alespoň 5 000 kopií/reakci.

#### Výsledky

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů BRV a GVBaV v simplexním a multiplexním uspořádání při různých koncentracích syntetické pozitivní kontroly. Výsledky detekce se pro oba viry v obou provedeních významně neliší.

Pro metodu detekce BRV bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 500 kopií/reakci.

Pro metodu detekce GVBaV bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 500 kopií/reakci.

## Závěr

- Multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu; výsledky jsou srovnatelné se simplexním uspořádáním pro BRV i GVBaV.
- Analytická senzitivita metody detekce BRV je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce GVBaV je stanovena na 500 kopií/reakci.

### 3.4.3 Stanovení opakovatelnosti

#### Metodika

Opakovatelností se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků stejnou osobou za stejných podmínek. Opakovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce všech virů stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly v rámci jednoho PCR běhu za identických podmínek v multiplexním uspořádání se současnou detekcí BRV a GVBaV v jedné reakci. U každé série se stanoví 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 každý virus.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

Pro kvantitativní stanovení musí být 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*

BRV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0045 \pm 0,0011$ , tj. 0,45 %.

GVBaV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0057 \pm 0,0009$ , tj. 0,57 %.

Pro oba testované viry (BRV a GVBaV) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, opakovatelnost je 100%.

#### *Závěr*

- Opakovatelnost metody detekce BRV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,45 %.
- Opakovatelnost metody detekce GVBaV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,57 %.
- Opakovatelnost metody detekce virů BRV a GVBaV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### **3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti**

#### *Metodika*

Reprodukovatelností se rozumí stanovení variability měření při analýze vzorků, které nezávisle na sobě provádějí různí pracovníci. Reprodukovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce obou virů BRV i GVBaV stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly.

Pro analýzu byly připraveny tři série v opakování po osmi vzorcích, které se analyzovaly ve třech nezávislých PCR bězích provedených různými pracovníky. Byl 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 každý virus.



### *Očekávaná hodnota parametru*

Pro kvantitativní stanovení musí být variační koeficient pro limitní ředění  $\leq 5\%$ .

Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (reprodukovatelnost 100%).

### *Výsledky*

BRV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR běžích měřená variačním koeficientem je 0,0131, tj. 1,31 %.

GVBaV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR běžích měřená variačním koeficientem je 0,0067, tj. 0,67 %.

Pro oba testované viry (BRV a GVBaV) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, reprodukovatelnost je 100%.

### *Závěr*

- Reprodukovatelnost metody detekce BRV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 1,31 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce GVBaV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,67 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce virů BRV a GVBaV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

### 3.4.5 Zjednodušený validační protokol

\*\*\*\*\*

<b>Název zkušebního postupu:</b>	Detekce virů BRV a GVBaV metodou real-time PCR
<b>Identifikace zkušebního postupu:</b>	SOP_LMB_02; PP_LMB_12
<b>Předmět zkoušky:</b>	Rostlinný materiál
<b>Poznámky:</b>	Multiplexní reakce; Rotor-Gene Q BRV v zeleném kanálu, GVBaV ve žlutém kanálu

<b>Výkonnostní parametry</b>	<b>Hodnota, komentář</b>
Diagnostická specificita BRV	100%
Diagnostická specificita GVBaV	100%
Analytická senzitivita BRV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita GVBaV	500 kopií/reakci
Opakovatelnost BRV	Průměrný variační koeficient 0,45 % pro limitní ředění
Opakovatelnost GVBaV	Průměrný variační koeficient 0,57 % pro limitní ředění
Opakovatelnost metody detekce virů BRV a GVBaV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.	

Reprodukovatelnost BRV                      Variační koeficient 1,31 % pro limitní ředění  
Reprodukovatelnost GVbAV                Variační koeficient 0,67 % pro limitní ředění  
Reprodukovatelnost metody detekce virů BRV a GVbAV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

#### **Závěr:**

Na základě uvedených výkonnostních parametrů je možné zkušební postup používat pro detekci Detekce virů BRV a GVbAV metodou real-time PCR v rostlinném materiálu.

#### **Dokumentace**

Zpráva\_z\_validace\_RibesVir\_200212.doc

Vypracovala dne: 12. 2. 2020 Mgr. Lucie Valentová

Schválil dne: 12. 2. 2020 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vedoucí laboratoře

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

## **4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ**

Pro detekci BRV a GVbAV v hostiteli se nejčastěji používají metody založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). Existují i jiné metody, např. metoda vizuálního hodnocení symptomů, která je však z důvodů latentních a nezřetelných příznaků infekce nedostačující. Biologický indexing využívající princip očkování testovaného materiálu na citlivou rostlinu jako indikátor, je metoda časově náročná a zdoluhavá, i když poměrně spolehlivá. Výběr vhodných indikátorů pro viry BRV a GVbAV je uveden v certifikačním schématu PM 4/9 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for Ribes. Imunoenzymatické metody typu ELISA nebyly zatím pro detekci virů BRV a GVbAV vyvinuty.

Problematikou detekce viru BRV se zabývali Latvala *et al.* (1997) a Lemmetty *et al.* (1997), kteří virus diagnostikovali detekční metodou IC-RT-PCR (Immuno-capture reverse-transcriptase PCR). Jones a McGavin (2002) převzali z Lemmettyho metodiky jejich publikovanou sekvenci, pro jejíž analýzu navrhli nové primery s vyšší teplotou annealingu. Pro zvýšení citlivosti metody použili modifikovanou metodu nested PCR a v rámci optimalizace metody upravili protokol pro izolaci RNA. Virus zvratu rybízu detekovali Příbylová *et al.* (2002), ti pro ověření viru BRV využili klasickou RT-PCR, virus dále zkoumali elektronovou mikroskopií a v roce 2008 sekvenovali (Příbylová *et al.* 2008). Také Besse *et al.* (2010) využili k prokázání přítomnosti viru BRV v rostlinách rybízu RT-PCR. Ti zároveň ve vzorcích detekovali virus GVbAV metodou elektronové mikroskopie, PCR a sekvenováním. Další modifikací PCR pro detekci viru BRV byla metoda real-time PCR s využitím barviva SYBR Green (Zurn *et al.* 2019). Výskyt virů BRV a GVbAV byl v nedávné době také ověřen pomocí NGS (Rajamäki *et al.* 2019)

Virus GVBaV klasickou metodou PCR s využitím DNA jako vstupního materiálu pro testování analyzovali Jones *et al.* (2001). Variabilitu genomu viru GVBaV studovali Petržík *et al.* (2012), kteří provedli kompletní genomovou sekvenaci jednoho českého izolátu z červeného rybízu a hodnotili variabilitu různých genů. Pro lepší porozumění genetické rozmanitosti viru GVBaV a jeho fylogenetického zařazení mezi badnaviry, zkoumali Xu *et al.* (2011) virus sekvenováním a klonováním.

Nevýhodou výše zmíněných PCR přístupů může být nepoužitelnost pro současné kvalitativní/kvantitativní stanovení obou virů a obecně nízká citlivost, neboť real-time PCR je obecně citlivější metoda. Real-time PCR s využitím SYBR Green zase neumožňuje jednoduché multiplexování, i když kvantitativní stanovení umožňuje. Další nevýhodou je nutnost separátní izolace nukleové kyseliny, kdy je pro detekci viru BRV izolována RNA a pro GVBaV izolována DNA. V případě předkládané metodiky jsou oba viry detekovány pouze z RNA. Analýzy popsané v literatuře také prodlužuje a prodražuje skutečnost, že oba viry jsou detekovány PCR reakcí pro každý virus zvlášť. Využití elektronové mikroskopie je pak nevhodné pro rutinní diagnostiku.

Výše uvedené nevýhody odstraňuje předložená metodika, která je založená na využití různě značených sond pro současnou kvalitativní/kvantitativní real-time PCR detekci virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu.

## 5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu může být využita v celé řadě aplikací, např.:

- Rutinní diagnostika virů BRV a GVBaV v biologickém materiálu
- Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu
- Monitoring přítomnosti virů BRV a GVBaV na daném území
- Studium šíření virů BRV a GVBaV
- Základní výzkum biologie virů BRV a GVBaV
- Studium vektorů daných virů a jejich přirozených hostitelů
- Analýza hospodářské škodlivosti virů pro produkci rybízu

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů BRV a GVBaV 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, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin)
- Referenční laboratoře
- Laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Validovaná metoda pro diagnostiku virů BRV a GVBaV metodou real-time PCR je optimalizována pro současnou detekci obou virů v jedné PCR reakci. Metodika tedy zrychluje, zpřesňuje a zlevňuje diagnostiku onemocnění rybízu, které je způsobeno virem BRV a GVBaV. Díky tomu mohou laboratoře zpracovat s vyšší citlivostí za stejný čas větší množství vzorků za nižší cenu než doposud, což se samozřejmě promítne do ekonomiky laboratoře např. snížením nákladů na jednu analýzu, zvýšením příjmů z diagnostické činnosti nebo uvolněním kapacity laboratoře pro další testy. Finanční přínos je však těžko odhadnutelný, bude záležet na aktivitách konkrétní laboratoře.

Rychlejší odezva laboratoře bude mít též pozitivní dopad na ekonomiku žadatele o vyšetření zdravotního stavu ovocných plodin, 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 šíření virů množitelským materiálem a tím i budoucím ztrátám na výnosu v dalších letech.

V laboratorních 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 reagentie	1 000 reakcí	10 000 Kč
Real-time PCR cyklyer	1 ks	> 800 000 Kč

Pro ilustraci je v tabulce níže uvedeno srovnání nákladů na provedení testu ELISA (pro viry BRV a GVBaV nejsou zatím k dispozici) a real-time PCR detekce provedené v simplexním a multiplexním uspořádání. Celkové částky pro provedení imunoenzymatické metody ELISA a pro jednotlivé kombinace testování real-time PCR představují finanční náklady spojené pouze s nákupem potřebných reagentů a spotřebního materiálu.

Pro srovnání jsou uvedeny tři varianty testování real-time PCR. V první variantě byly započítány náklady na jednu izolaci RNA, následný přepis do cDNA a provedení real-time PCR reakce v multiplexním uspořádání. Ve druhém případě je vyčíslena jedna izolace RNA, jeden přepis do cDNA, ale PCR reakce je kalkulována pro provedení v simplexním uspořádání. Třetí varianta představuje náklady na dvě

izolace RNA, dva přepisy RNA do cDNA a PCR v simplexním uspořádání. Jedná se o nejnákladnější variantu, která v praxi nebude využívána, ale je zde uvedena pro srovnání.

*Porovnání finančních nákladů navrženého diagnostického systému real-time PCR s metodou ELISA.*

<b>Metoda</b>	<b>Cena za testování dvou virů (vč. spotřebního materiálu)</b>
ELISA - 115 Kč/test	230 Kč
<b>Real-time PCR v <u>multiplexním uspořádání</u></b> (1 izolace + 1 přepis)	319 Kč
<b>Real-time PCR v <u>simplexním uspořádání</u></b> (1 izolace + 1 přepis)	375 Kč
<b>Real-time PCR v <u>simplexním uspořádání</u></b> (2 izolace + 2 přepisy)	566 Kč

Vzhledem k tomu, že metoda ELISA není pro viry BRV a GVBaV dostupná, je pro jejich současné testování ekonomicky nejvýhodnější metoda real-time PCR v multiplexním uspořádáním.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

BESSE, S., GUGERLI, P., RAMEL, M.E., BALMELLI, C. Characterisation of mixed virus infections in *Ribes* species in Switzerland. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010, 427: 214.

BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2019. ISBN 978-80-7434-526-5.

JONES, A.T. Important virus diseases of *Ribes*, their diagnosis, detection and control. *Acta Horticulturae*. 2002, 585: 279-285.

JONES, A.T., MCGAVIN, W., GEERING, A.D.W., LOCKHART, B.E.L. A new badnavirus in *Ribes* species, its detection by PCR, and its close association with gooseberry vein banding disease. *Plant Disease*. 2001, 85(4): 417-422.

JONES, A.T., MCGAVIN, W.J. Improved PCR detection of Blackcurrant reversion virus in *Ribes* and further evidence that it is the causal agent of reversion disease. *Plant Disease*. 2002, 86(12): 1333-1338.

LATVALA, S., SUSI, P., LEMMETTY, A., COX, S., JONES, A.T., LEHTO, K. *Ribes* host range and erratic distribution within plants of blackcurrant reversion associated virus provide further evidence for its role as the causal agent of reversion disease. *Annals of Applied Biology*. 1997, 131(2): 283-295.

LEMMETTY, A., LATVALA, S., JONES, A.T., SUSI, P., MCGAVIN, W.J., LEHTO, K. Purification and properties of a new virus from black currant, its affinities with nepoviruses, and its close association with black currant reversion disease. *Phytopathology*. 1997, 87(4): 404-413.

MAZEIKIENE, I., JUSKYTE, A. D., STANYS, V. Application of marker-assisted selection for resistance to gall mite and Blackcurrant reversion virus in *Ribes* genus. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2019, 106(4): 359-366. DOI: 10.13080/z-a.2019.106.046

PETRZIK, K., PRIBYLOVÁ, J., ŠPAK, J. Molecular analysis of gooseberry vein banding associated virus. *Acta Virologica*. 2012, 56(2): 119. DOI: 10.4149 / av\_2012\_02\_119

PM 4/9 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for *Ribes*. *EPPO Bulletin* 2008, 38: 14-17. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2008.01177.x

PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*. 2019, 49(3), 530-563. DOI: 10.1111/epp.12629

PRIBYLOVÁ, J., ŠPAK, J., PETRZIK, K., KUBELKOVÁ, D., ŠPAKOVÁ, V. Sequence comparison and transmission of Blackcurrant reversion virus isolates in black, red and white currants with black currant reversion disease and full blossom disease symptoms. *European Journal of Plant Pathology*. 2008, 121(1): 67-75. DOI: 10.1007/s10658-007-9245-2

PRIBYLOVÁ, J., ŠPAK, J., KUBELKOVÁ, D. Mixed infection of black currant (*Ribes nigrum* L.) plants with Blackcurrant reversion associated virus. *Acta Virologica*. 2002, 46: 253-256.

RAJAMÄKI, M.L., LEMMETTY, A., LAAMANEN, J., ROININEN, E., VISHWAKARMA, A., STRENG, J., VALKONEN, J.P. Small-RNA analysis of pre-basic mother plants and conserved accessions of plant genetic resources for the presence of viruses. *PloS One*. 2019, 14(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0220621

SOURAL, I., ŠNURKOVIČ, P., BIENIASZ, M. l-Ascorbic acid content and antioxidant capacity in less-known fruit juices. *Czech Journal of Food Sciences*. 2019, 37(5): 359-365. DOI: 10.17221/305/2018-CJFS

Vyhláška č. 95/2018 Sb. O množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu chmele, révy, ovocných rodů a druhů a okrasných druhů a jeho uvádění do oběhu.

XU, D., MOCK, R., KINARD, G., LI, R. Molecular analysis of the complete genomic sequences of four isolates of Gooseberry vein banding associated virus. *Virus Genes*. 2011, 43(1):130-137. DOI: 10.1007/s11262-011-0614-8

ZULGE, N., GOSPODARYK, A., MOROČKO-BIČEVSKA, I. Occurrence and genetic diversity of Blackcurrant reversion virus found on various cultivated and wild *Ribes* in Latvia. *Plant Pathology*. 2018, 67(1): 210-220. DOI: 10.1111/ppa.12716

ZURN, J.D., HO, T., LI, R., BASSIL, N.V., TZANETAKIS, I.E., MARTIN, R.R., POSTMAN, J.D. First Report of Blackcurrant Reversion Virus in *Ribes nigrum* Germplasm in the United States. *Plant Disease*. 2019, 103(5): 1051. DOI: 10.1094/PDIS-03-18-0526-PDN

## **8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

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



Ústřední kontrolní  
a zkušební ústav zemědělský  
Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2  
656 06 Brno

www.ukzuz.cz  
ID DS: ugbaiq7

IČO: 00020338  
DIČ: CZ00020338

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

UKZUZ 205304/2020

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV) a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV) v biologickém materiálu**

Autor/autoři: **Mgr. Lucie Valentová; RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.**

Název organizace/cí: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.**  
Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2020**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu TA ČR TJ02000159 „Vývoj a validace souprav pro diagnostiku vybraných rostlinných virů.

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **NE**

Brno 4. 11. 2020

Razítko odborného orgánu státní správy

Osvědčení ze dne 23. 10. 2020, pod čj.: UKZUZ 199177/2020 se **ruší**.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel ústavu

.....  
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

**Jan Radoš**

Digitální podpis: 05.11.2020 17:14

V ..... dne .....

.....  
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.



Poznámky:

**Real-time PCR detekce virů Blackcurrant reversion virus (BRV)  
a Gooseberry vein banding associated virus (GVBaV)  
v biologickém materiálu**

Autoři: Lucie Valentová, Radek Čmejla

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

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Reprint s.r.o.

**ISBN 978-80-87030-74-5**



