Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu

Lucie Valentová
Martina Rejlová
Radek Čmejla

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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu

Lucie Valentová
Martina Rejlová
Radek Čmejla

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2022

Autoři: Mgr. Lucie Valentová, Ing. Martina Rejlová, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Hořice

Název: Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

Vydáno v roce: 2022

Oponenti: RNDr. Markéta Bohunická, Ph.D., Univerzita Hradec Králové,
RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., ÚKZÚZ

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský schválil publikaci jako certifikovanou metodiku. Metodice bylo vydáno Osvědčení č. UKZUZ 219681/2022 o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací.

Iceland Liechtenstein Norway grants

T A
Č R

Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Technologické agentury ČR (TAČR) TO01000295 – Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku.

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2022

www.vsuo.cz

ISBN 978-80-87030-87-5

OBSAH

1. ÚVOD 5
2. CÍL METODIKY 7
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY 8
3.1. Popis detekčního systému 8
3.2. Validace metody 10
3.2.1 Stanovení specificity 10
3.2.2 Stanovení analytické senzitivity 11
3.2.3 Stanovení opakovatelnosti 12
3.2.4 Stanovení reprodukovatelnosti 14
3.2.5 Zjednodušený validační protokol 15
3.3. Vlastní popis metodiky 17
3.3.1 Pre-analytická fáze 17
3.3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků 17
3.3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře 17
3.3.2 Analytická fáze 18
3.3.2.1 Izolace RNA 18
3.3.2.2 Příprava cDNA 21
3.3.2.3 Real-time PCR detekce 23
3.3.3 Post-analytická fáze 26
3.3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat 27
3.3.3.2 Akceptace a interpretace výsledků 30
3.4. Porovnání s metodou ELISA 31
3.4.1 Postup 31
3.4.1.1 Úvod 31
3.4.1.2 Analýza citlivosti obou metod 32
3.4.2 Výsledky pro jednotlivé viry 32
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ 35
5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 36
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY 36
7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 38
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 40
9. OSVĚDČENÍ O UZNÁNÍ METODIKY 41

1. ÚVOD

Maliník (*Rubus idaeus* L.) patří do čeledi *Rosaceae.* Pro svoji příjemnou chuť a nutriční hodnotu mají plody maliníku významné místo ve výživě člověka. Čerstvé plody jsou určeny k přímé konzumaci a dále pro konzervárenský a mrazírenský průmysl. Maliníky jsou využívány nejen v potravinářském, ale i ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. V České republice má pěstování maliníku dlouholetou tradici zejména u zahrádkářů. V ovocnářství se maliník pěstuje jen okrajově, ale v poslední době se zájem o něj zvyšuje a výsadby tohoto drobného ovoce přibývají (Němcová a Buchtová 2021).

Pro zajištění kvalitní a zdravé výsadby je důležité, aby byl při zakládání nových produkčních výsadeb maliníku použit zdravý certifikovaný rozmnožovací materiál. Požadavky na zdravotní stav rozmnožovacího materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 96/2018 o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu. Dle této platné legislativy je povinná kontrola množitelského materiálu maliníku na přítomnost virů apple mosaic virus (ApMV), arabis mosaic virus (ArMV), black raspberry necrosis virus (BRNV), cucumber mosaic virus (CMV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry vein chlorosis virus (RVCV), raspberry yellow spot (RYS), rubus yellow net virus (RYNV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV) a tomato black ring virus (TBRV). Všechny zmíněné viry jsou součástí certifikačního schématu pro rod *Rubus* PM 4/10 (2) Schemes for the production of healthy plants for planting, Certification scheme for Rubus dle European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Pro účely této metodiky byly vybrány čtyři viry, které významně ovlivňují zdravotní stav rostlin: virus černé nekrózy maliníku (BRNV), virus kroužkovitosti maliníku (RpRSV), virus keříčkové zakrslosti maliníku (RBDV) a virus latentní kroužkovitosti jahodníku (SLRSV).

Virus černé nekrózy maliníku (BRNV) patří do čeledi *Secoviridae* (do rodu zařazen zatím nebyl) a může vyvolávat onemocnění mozaika maliníku (Raspberry Mosaic Disease; RMD). BRNV se často vyskytuje v komplexu s dalšími viry, které napadají maliník: raspberry leaf mottle virus (RLMV), raspberry leaf spot virus (RLSV) a rubus yellow net virus (RYNV). Jak uvádí McMenemy *et* al. (2009), právě virus BRNV je často první, který infikuje maliníky, a rostlina je pak náchylnější k nákaze jinými viry, jako je např. RLSV. Samostatné příznaky viru BRNV byly popsány jako malé zesvětlené skvrny na listech. Přítomnost viru vede k omezení růstu rostliny a snížení výnosu ovoce. Diagnostika na základě symptomů je obtížná, virus nevykazuje specifické příznaky, proto se doporučuje virus diagnostikovat pomocí biologického indexingu nebo metodou na principu PCR. Jako indikátorová

rostlina se používá *R. occidentalis* L., na které se příznaky vyznačují epinastickou a apikální nekrózou (Jones a Wood 1979, Martin *et* al. 2013). Virus přenáší semiperzistentně mšice *Amphorophora agathonica*, *A. idaei*, *A. rubicumberlandii* a *Illinoia rubicola*.

Virus kroužkovitosti maliníku (RpRSV) byl v 50. letech minulého století nejprve identifikován ve Skotsku jako pravděpodobný původce kadeřavosti listů maliníku (Cadman 1956). Virus patří do čeledi *Secoviridae*, rod *Nepovirus*, a je rozšířen zejména v Evropě. Existují ale i záznamy ze západní části Asie - Íránu, Kazachstánu, Turecka a Uzbekistánu (Tang *et* al. 2020). Virus napadá širokou škálu ekonomicky významných plodin, jako je např. drobné ovoce (maliník, jahodník, rybíz), třešeň a vinná réva. Přítomnost viru v rostlině vede k závažným chorobám, které snižují růst rostlin a výnos plodů. V případě, že se RpRSV nachází v rostlině v koinfekci s jinými nepoviry, mohou být příznaky závažnější (Tang *et* al. 2020). Kultivary maliníku se vyznačují různou náchylností k onemocnění. U náchylných kultivarů dochází k celkovému nebo částečnému odumření rostlin v zimě, případně rostlina produkuje zakrslé a křehké výhony se srolovanými listy, výhony od špičky odumírají a nekrotizují. U méně citlivých odrůd se symptomy objevují na listech nově rašících výhonů, na plodonosných výhonech jsou jen mírné nebo zcela chybí. Na listech se vytváří nápadné žlutozelené kroužky, chlorotické skvrny nebo síťovitá chloróza podél menších listových žilek (Murant 1970). Na dlouhou vzdálenost se virus přirozeně může šířit infikovanými semeny nebo pylem. Na krátké vzdálenosti jej rozšiřují také háďátka *Longidorus elongatus* a *Longidorus macrosoma* (Wetzel a Krczal 2007). RpRSV je zařazen jako karanténní organismus na A2 list EPPO. Virus lze detekovat kromě biologického indexingu také metodou ELISA a RT-PCR (EPPO 2009, Martin *et* al. 2013).

Virus keříčkové zakrslosti maliníku (RBDV) patřící do rodu *Idaeovirus* (čeleď *Bromoviridae*) je celosvětově nejrozšířenějším virem napadající rostliny rodu *Rubus*. Infikuje červené maliny, černé maliny, různé hybridy a ostružiny (Martin 2001). Virus může způsobovat vysoké ztráty na výnosu maliníku, kdy dochází k projevům na rostlině připomínajícím „drolivé plody“, což znemožňuje sklizeň ovoce (Barbara *et* al. 2001). Na rostlinách napadených tímto virem se nemusí vyskytovat žádné symptomy, většinou až při směsné infekci s dalšími viry se objevují první symptomy, např. zakrslý růst, zmnožování postranních výhonů, opad listů, chlorózy a mozaiky listů, svinování listů, nekrotizace pletiv, plody se rozpadávají nebo opadávají (Martin *et* al. 2013). RBDV se přenáší semeny a pylem. Rychlost přenosu semeny se zvyšuje, pokud jsou oba rodiče infikováni (Martin 2001). Laboratorní diagnostika viru se provádí metodou ELISA nebo RT-PCR.

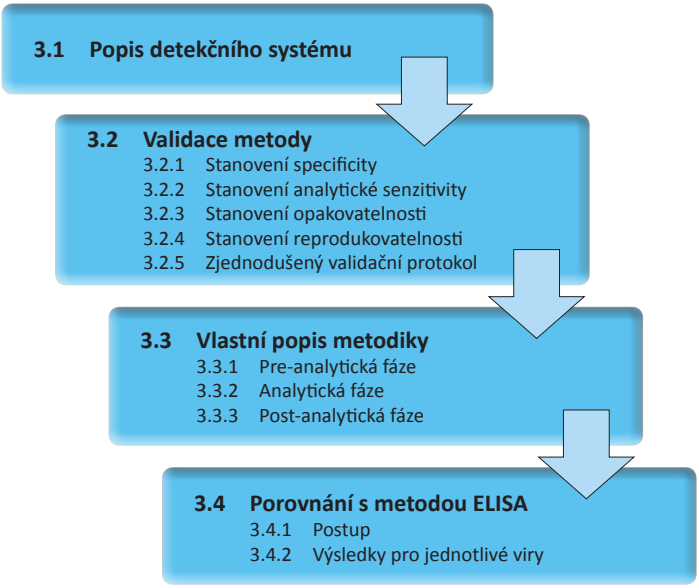
Virus latentní kroužkovitosti jahodníku (SLRSV) byl poprvé identifikován na malinících a jahodnících ve Skotsku v roce 1964 (Lister 1964). Murant (1970) uvádí, že je virus přenášen půdními háďátky *Xiphinema diversicaudatum*, proto byl virus původně klasifikován jako nepovirus. V roce 2005 byl SLRSV přesunut do rodu *Sadwavirus* (Mayo 2005). Nakonec fylogenetická analýza odhalila, že SLRSV sdílí charakteristiky se zástupci rodů *Cheravirus*, *Fabavirus*, *Comovirus* a *Sadwavirus*, které svědčí o jedinečnosti SLRSV (Tzanetakis 2006), a proto byl virus přesunut z rodu *Sadwavirus* a klasifikován jako předběžný člen v nově vytvořené čeledi *Secoviridae* (King 2011). SLRSV je polyfágním virem, infikuje širokou škálu hostitelů, včetně mnoha ekonomicky důležitých ovocných plodin, jako jsou např. drobné ovoce (jahodník, maliník, ostružiník, černý a červený rybíz) nebo peckoviny (třešeň, broskvoň a slivoň). Virus je rozšířen téměř po celém světě, přesto je v mnoha zemích stále považován za regulovaný škodlivý organismus (Tang *et* al. 2013). Přítomnost viru na malinících a ostružinících se projevuje symptomy, jako jsou žloutnutí a zakrslost rostlin (Martin 2013). Pro detekci viru jsou zavedeny metody ELISA a RT-PCR.

2. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout nový detekční systém pro rutinní diagnostiku rostlinných virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV), původců virových onemocnění u rostlin rodu *Rubus*. Navržená metodika detekce virů je založena na principu multiplexní real-time PCR a umožňuje současnou kvalitativní/kvantitativní detekci všech čtyř virů v jedné reakci. Navržený detekční systém byl validován pro použití s cyklerem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu obsaženého v EPPO PM 7/98 (5) 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. Součástí metodiky je i porovnání diagnostických metod ELISA a nového detekčního systému pro viry RpRSV, RBDV a SLRSV, pro které jsou ELISA soupravy komerčně dostupné. Pro tyto viry lze diagnostický systém použít pro konfirmaci nálezů získaných metodou ELISA.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Popis metodiky je rozdělen do několika částí:



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

3.1. Popis detekčního systému

Metodika real-time PCR detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v biologickém materiálu byla validována pro přístroj Rotor-Gene Q (Qiagen) s využitím následujícího materiálu a reagencií:

» Pro multiplexní detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV se používají následující primery a sondy:

BRNV:	Forward primer 1:	GATAACCCTCYTGCAGTAGGC
	Forward primer 2:	GATAACCCTCTTGCAGAAGGC
	Reverse primer:	TGATCGGGCGAACATAAACAAG
	Sonda 1:	6-FAM- CTTTTCTGTCGGCGGTAGCGTCCC -BHQ1
	Sonda 2:	6-FAM- CTYTTCTGTCGGCGGTAGCGTCCC-BHQ1

RpRSV:	Forward primer:	TTWCYTTCTGTWGCTCCCTCT
	Reverse primer:	HAAATGCATATTTTTGTGTGCTTG
	Sonda:	HEX-AGGTYGTGCCTTTAGCAAGC-BHQ1

RBDV:	Forward primer:	TGGTWGAYTCCATACCATCGCT
	Reverse primer:	GCCGAAACTTCCTGAAGGAAG
	Sonda:	ROX-TGGAAGACACACACCTTACGCTCAT-BHQ2

SLRSV:	Forward primer:	GAGAATATCCCTGGYCCAG
	Reverse primer:	AACCATGTARTTCCATGGTAGTG
	Sonda:	Cy5-AGGCRAGCCGGTGRACTTYGT-BHQ3

» Jako marker pro kontrolu kvality izolace RNA a přípravy cDNA se používá test na přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5* (interní pozitivní kontrola; IPC). Pro jeho detekci se používají následující primery a sonda:

Forward primer:	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT
Reverse primer:	IRDye700-ACATAAATCGAGGGCTATGCGG
Sonda:	IRDye700-CCACAATTAACATCACTACGGTCGGGCTA-BHQ3

» IPC je detekována současně s viry ve stejné reakci.

» Přesný rozpis složení PCR premixu je uveden v kapitole 3.3.2.3 Real-time PCR detekce.

» 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 použít jednotlivé PCR komponenty nebo diagnostickou soupravu **RubusVir I qPCR-RG** (výrobce a dodavatel: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.), která obsahuje připravené PCR premixy a systém kontrol pro snadné a rychlé sestavení PCR reakce. Souprava obsahuje:

UniPmxI:	premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci
RubusVir I PmxII:	premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV a pro detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA
BRNV Ctrl [500 000 kopií/µl]:	pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru BRNV
RpRSV Ctrl [500 000 kopií/µl]:	pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru RpRSV
RBDV Ctrl [500 000 kopií/µl]:	pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru RBDV
SLRSV Ctrl [500 000 kopií/µl]:	pozitivní kontrola pro ověření správnosti PCR pro detekci viru SLRSV
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.
» Real-time PCR cykler Rotor-Gene Q (Qiagen) nebo obdobný, který je schopen detekovat použité fluorofory u sond.

3.2. Validace metody

Validace metody byla provedena podle níže uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s využitím kitu RubusVir I qPCR-RG (multiplexní detekce) s přístrojem Rotor-Gene Q. Uživatelé jiných postupů a jiných real-time PCR cyklerů si musí provést verifikaci metody a ověření výkonnostních charakteristik na svém pracovišti podle svých postupů s ohledem na své laboratorní vybavení. Validace detekční metody byla provedena podle protokolu EPPO č. PM 7/98 (5): 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

3.2.1 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 BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV. 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. Bylo navrženo několik zkušebních párů primerů v oblasti, která je specifická pouze pro viry BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV.

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 virus BRNV byla vybrána oblast 3'UTR; pro RpRSV oblast 3'UTR; pro RBDV oblast obalového proteinu (Co) a pro SLRSV oblast 3'UTR.

B) Specificita ověřená na pozitivních a negativních vzorcích

Pomocí navržených primerů bylo provedeno testování souboru vzorků rostlin (zástupci rodu *Rubus* subgen. *Idaeobatus* a *Rubus* subgen. *Rubus*) odebraných na území České republiky, aby byla zajištěna co největší variabilita izolátů virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV. Pro stanovení genetické variability vybraných oblastí genomu jednotlivých virů byly získané amplikony sekvenovány. Na základě těchto analýz byly poté navrženy finální primery a sondy pro detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV. Tyto byly následně zpětně testovány na souboru původních vzorků maliníku a výsledky porovnány s původními nálezy. Výjimkou byly viry RpRSV a SLRSV, které se nepodařilo v přirozených vzorcích nalézt. Detekční systém byl proto rigorózně testován pouze s použitím syntetických standardů a pozitivních kontrol používaných pro detekci metodou ELISA.

Všechny podstatné kroky vývoje detekčního systému byly verifikovány sekvenačně. Specificita byla též ověřena na negativních vzorcích a na směsných 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 nebo metodou ELISA. U vzorků, které byly koiinfikovány více viry (BRNV, RBDV, RYNV), byla ve všech případech specificky potvrzena přítomnost daného viru a nebyl zaznamenán žádný případ křížové nespecifické reakce.

Závěr

Diagnostická specificita metody je stanovena na 100% pro viry BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV.

3.2.2 Stanovení analytické senzitivity

Metodika

Syntetické pozitivní kontroly pro BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV identické s cílovými místy detekce o známé koncentraci 1 µg/µl byly postupně naředěny ve třech ředících

řadách až na koncentraci 5 kopií/reakci (vypočítáno s pomocí DNA Calculator; http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html). Cílem bylo nalézt nejnižší koncentraci ředění, pro kterou budou všechny vzorky u všech ředících řad v opakování po osmi pozitivní (celkem tedy 24 vzorků).

Protože se jedná o multiplexní reakci se současnou detekcí čtyř různých 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 1 000 kopií/reakci.

Výsledky

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů v simplexním a multiplexním uspořádání při různých koncentracích syntetické pozitivní kontroly. Výsledky detekce jsou pro všechny viry v obou provedeních srovnatelné.

Pro metodu detekce testovaných virů RpRSV, RBDV a SLRSV bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 500 kopií/reakci, pro BRNV, 1 000 kopií/reakci. Obecně byl limit detekce nižší: pro BRNV 500 kopií/reakci; pro RpRSV 50 kopií/reakci; pro RBDV 50 kopií/reakci a pro SLRSV 50 kopií/reakci.

Závěr

» Multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu; výsledky jsou srovnatelné se simplexním uspořádáním pro BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV.
» Analytická senzitivita metody detekce BRNV je stanovena na 1 000 kopií/reakci.
» Analytická senzitivita metody detekce RpRSV je stanovena na 500 kopií/reakci.
» Analytická senzitivita metody detekce RBDV je stanovena na 500 kopií/reakci.
» Analytická senzitivita metody detekce SLRSV je stanovena na 500 kopií/reakci.

3.2.3 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 virů RpRSV, RBDV a SLRSV stanoveno na 500 kopií/reakci a pro BRNV 1 000 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 BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v jedné reakci. U každé série se stanoví variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených hodnot Ct při limitním ředění mezi jednotlivými sériemi.

Pro kvalitativní analýzu se opakovatelnost stanoví jako procento pozitivních nálezů ze všech provedených testů pro každý virus při jeho limitním ředění, tj. 500 kopií/reakci (RpRSV, RBDV a SLRSV) nebo 1 000 kopií/reakci (BRNV).

Očekávaná hodnota parametru

- Pro kvantitativní stanovení musí být variační koeficient pro limitní ředění ≤ 2,5 %.
- Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (opakovatelnost 100%).

Výsledky

BRNV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je 0,0192 ± 0,0094, tj. 1,92 %.

RpRSV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je 0,0187 ± 0,0045, tj. 1,87 %.

RBDV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je 0,0222 ± 0,0074, tj. 2,22 %.

SLRSV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je 0,0143 ± 0,0031, tj. 1,43 %.

Pro všechny testované viry (BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích při limitním ředění, opakovatelnost je 100%.

Závěr

- Opakovatelnost metody detekce BRNV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 1,92 %.
- Opakovatelnost metody detekce RpRSV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 1,87 %.
- Opakovatelnost metody detekce RBDV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 2,22 %.
- Opakovatelnost metody detekce SLRSV při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 1,43 %.

» Opakovatelnost metody detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

3.2.4 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 virů RpRSV, RBDV a SLRSV stanoveno na 500 kopií/reakci a pro BRNV 1 000 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 hodnot 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 ≤ 5%.
» Pro kvalitativní stanovení musí být výsledky testů pro limitní ředění pozitivní u všech vzorků (reprodukovatelnost 100%).

Výsledky

BRNV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0248, tj. 2,48 %.

RpRSV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0174, tj. 1,74 %.

RBDV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0252, tj. 2,52 %.

SLRSV: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0233, tj. 2,33 %.

Pro všechny testované viry (BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV) byly zaznamenány pozitivní nálezy ve všech vzorcích, reprodukovatelnost je 100%.

Závěr

- » Reprodukovatelnost metody detekce BRNV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 2,48 %.
- » Reprodukovatelnost metody detekce RpRSV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 1,74 %.
- » Reprodukovatelnost metody detekce RBDV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 2,52 %.
- » Reprodukovatelnost metody detekce SLRSV při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 2,33 %.
- » Reprodukovatelnost metody detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

3.2.5 Zjednodušený validační protokol

Validace byla provedena v Laboratoři molekulární biologie, Laboratorním komplementu VŠÚO, který je akreditován dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 – Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Validace probíhala podle schválených interních postupů a všechny činnosti byly dokumentovány.

Zjednodušený validační protokol

Název zkušebního postupu:	Detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV metodou real-time PCR
Identifikace zkušebního postupu:	SOP_LMB_02; PP_LMB_12
Validace provedena dle:	SOP_LMB_05
Předmět zkoušky:	Rostlinný materiál
Poznámky:	Multiplexní reakce; Rotor-Gene Q BRNV v zeleném kanálu RpRSV ve žlutém kanálu RBDV v oranžovém kanálu SLRSV v červeném kanálu
Výkonnostní parametry	**Hodnota, komentář**
Specificita	
Diagnostická specificita BRNV	100%
Diagnostická specificita RpRSV	100%

Diagnostická specificita RBDV	100%
Diagnostická specificita SLRSV	100%

Senzitivita

Analytická senzitivita BRNV	1 000 kopií/reakci
Analytická senzitivita RpRSV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita RBDV	500 kopií/reakci
Analytická senzitivita SLRSV	500 kopií/reakci

Opakovatelnost

Opakovatelnost BRNV	Průměrný variační koeficient 1,92 % pro limitní ředění
Opakovatelnost RpRSV	Průměrný variační koeficient 1,87 % pro limitní ředění
Opakovatelnost RBDV	Průměrný variační koeficient 2,22 % pro limitní ředění
Opakovatelnost SLRSV	Průměrný variační koeficient 1,43 % pro limitní ředění

Opakovatelnost metody detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost BRNV	Variační koeficient 2,48 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost RpRSV	Variační koeficient 1,74 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost RBDV	Variační koeficient 2,52 % pro limitní ředění
Reprodukovatelnost SLRSV	Variační koeficient 2,33 % pro limitní ředění

Reprodukovatelnost metody detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV při limitním ředění pro kvalitativní účely je 100%.

Závěr:

Na základě uvedených výkonnostních parametrů je možné zkušební postup používat pro detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV metodou real-time PCR v rostlinném materiálu dle SOP_LMB_02 a PP_LMB_12.

Dokumentace

Zpráva_z_validace_RubusVirI_220818.doc

Vypracoval dne: 18. 8. 2022 Mgr. Lucie Valentová

Schválil dne: 18. 8. 2022 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., Vedoucí laboratoře

Konec validačního protokolu

3.3. Vlastní popis metodiky

» Vlastní postup dle metodiky lze rozdělit do třech fází:
» Pre-analytická (odběry vzorků a jejich příjem do laboratoře, uchování do doby analýzy)
» Analytická fáze (zpracování vzorků v laboratoři, homogenizace, izolace RNA, příprava cDNA, sestavení PCR reakce)
» Post-analytická fáze (vyhodnocení a intepretace nálezů, uvádění výsledků)

3.3.1 Pre-analytická fáze

3.3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Nejvhodnějšími rostlinami pro odběr jsou ty, které vykazují symptomy, nebo na nich byla prokázána přítomnost vektorů. Pro rutinní testování jsou doporučeným materiálem listy. Protože se viry BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV mohou vyskytovat v rostlinách nerovnoměrně, je vhodné pro získání reprezentativního vzorku odebírat 3–4 listy z různých částí rostliny. Odebrané části rostlin se vloží do plastového 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 chladící vložky.

3.3.1.2 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 °C. Při této teplotě je možné vzorky skladovat bez ztráty kvality nejméně 1 rok.

Ke zpracování se přijímají pouze vzorky, které:

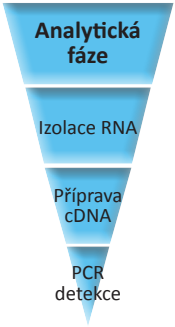
» nejsou znehodnoceny plísní,
» nejsou znehodnoceny hnilobným procesem,
» nevykazují pokročilou nekrózu pletiv,
» neobsahují savý ani jiný hmyz,
» nejsou ovlivněny dalšími faktory, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky (např. aplikace postřiků)

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

3.3.2 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 doporučovaných pro laboratoře molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací
» Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe v laboratoři molekulární biologie
» Zařazování extrakčních kontrol (kontrola čistoty používaných reagencií při izolaci RNA)
» Dodržování standardní navážky vstupního materiálu
» Kvalita izolované RNA a připravené cDNA

3.3.2.1 Izolace RNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagencií 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 dle výrobce:

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 udávané výrobcem pro různé typy vstupního materiálu

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

- Typický výtěžek RNA z 50 mg listů ***Rubus* subgen. *Idaeobatus* a subgen. *Rubus*** je 16,7 µg (vlastní laboratorní výsledky).
- Izolovaná RNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbancí A260/A280) alespoň 1,8. Pokud je čistota nižší, nelze vyloučit negativní dopad na citlivost analýz.
- Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. okamžitá 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 laboratorní teplotě při otáčkách minimálně 10 000 g (u běžných centrifug zpravidla >13 000 otáček za minutu [RPM]).
- Jako kontrolu kvality přípravy RNA a ověření čistoty reagencií 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 reagencií 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 izolačního kitu).
2. Přidá se 450 µl 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 laboratorní teplotě.
4. Lyzát se přenese pomocí 1ml špičky s filtrem s ustřiženou špičkou na EzPure™ kolonu (žlutá barva). V případě gelovitější konzistence je možné lyzát přesunout přímo na kolonu pomocí tenké kovové špachtličky (ve špičce zůstává značná část materiálu).
5. Vzorky se centrifugují 2 minuty. V případě, že kolonou proteče pouze málo vzorku, lze centrifugaci opakovat nebo provést předčištění lyzátu ihned po kroku 3, a to centrifugací vzorků 1 minutu. Na kolonu se poté nanáší supernatant.
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. Supernatant 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 každý vzorek se počítá 70 µl pufru DRB a 2 µl DNase I. Do středu W kolony se nanese 70 µl DNase I reakční směsi, nechá se inkubovat minimálně 10 min. při laboratorní 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 centrifugaci 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 laboratorní 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 výchozího materiálu nebo izolace RNA, které mohou vést ke stejnému výsledku.

3.3.2.2 Příprava cDNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagencií 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 $p(dN)_6$ (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 mikrozkumavek 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
    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 stejnému výsledku.

3.3.2.3 Real-time PCR detekce

Úvod

Metodika je validována pro současnou detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v jedné reakci (multiplexní uspořádání). Metodiku lze použít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní detekci přítomnosti jednotlivých virů. Jako indikátor kontroly 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), která je detekována ve stejné reakci.

Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond, které je možné zakoupit zvlášť nebo použít RubusVir I qPCR-RG detekční kit, který obsahuje všechny reagencie pro real-time PCR detekci pro cykler Rotor-Gene Q [Qiagen] (k.č. RubusVir I_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 používaného real-time PCR cykleru. 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 cykleru.

Vzhledem k rozmanitosti používaných real-time PCR cyklerů, PCR reagencií, 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.

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 laboratorní 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 BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV. 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 některých nebo všech syntetických standardů BRNV, RpRSV, RBDV, SLRSV a IPC.

****

1. V PCR boxu se do kovového stojánku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkumavek pro NTC (kontrola bez přidané cDNA) 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 mikrozkumavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce a rozpisu:

Rozpis pro současnou detekci virů BRNV, RpRSV, RBDV, SLRSV a IPC s využitím základních PCR komponent

BRNV + RpRSV + RBDV + SLRSV + IPC	Na 1 vzorek	Finální konc.
PCR voda	5,424 µl	
BRNV forward primer 1 (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
BRNV forward primer 2 (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
BRNV reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
BRNV sonda 1 (50 µM)	0,06 µl	0,15 µM
BRNV sonda 2 (50 µM)	0,066 µl	0,165 µM
RpRSV forward primer (50 µM)	0,4 µl	1 µM
RpRSV reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RpRSV sonda (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
RBDV forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RBDV reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
RBDV sonda (50 µM)	0,07 µl	0,175 µM
SLRSV forward primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SLRSV reverse primer (50 µM)	0,2 µl	0,5 µM
SLRSV sonda (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC forward primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC reverse primer (50 µM)	0,1 µl	0,25 µM
IPC sonda (50 µM)	0,08 µl	0,2 µM
qPCR 2x Blue Master Mix	10 µl	1x
Celkem	**18 µl**	

Rozpis pro současnou detekci BRNV, RpRSV, RBDV, SLRSV a IPC s využitím ***RubusVir I 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.

RubusVir I qPCR-RG detekční kit	Na 1 vzorek
PCR voda	7 µl
RubusVir I PmxII	1 µl
UniPmxI	10 µl
Celkem	**18 µl**

3. Připravený mastermix se krátce vortexuje a krátce se centrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
5. K mastermixu se postupně pipetují 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 BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV.

7. Po zapnutí Rotor-Gene Q se 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 BRNV
   - čtení ve žlutém kanálu pro RpRSV
   - čtení v oranžovém kanálu pro RBDV
   - čtení v červeném kanálu pro SLRSV
   - čtení v karmínovém kanálu pro IPC

   72 °C 20 s

   - Pro použité fluorofory se doporučuje nastavit „Gains“ na následující hodnoty.
     Green: 5,67; Yellow: 6,33; Orange: 8,33; Red: 7,67; Crimson: 7,67.
     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: LMB@vsuo.cz
   - Celý proces amplifikace trvá cca 2 hodiny.
   - 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 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.

3.3.3 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.

3.3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q

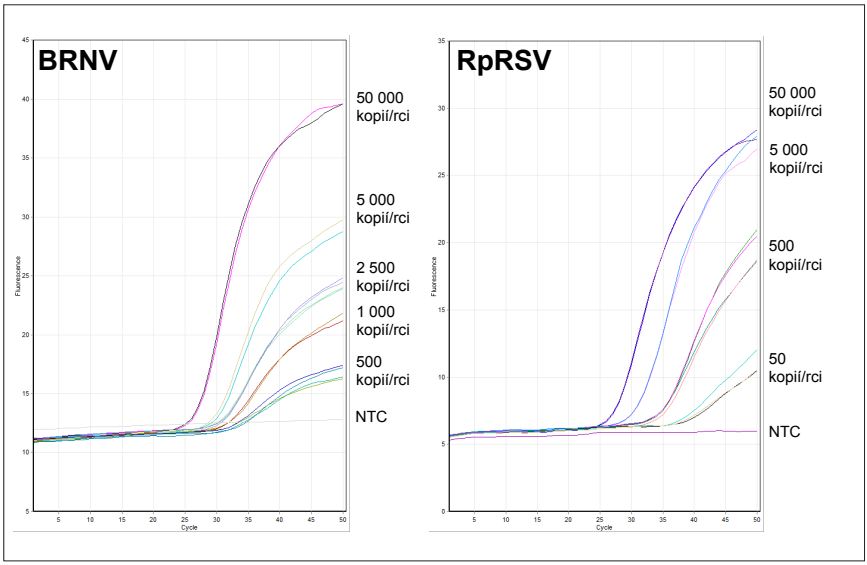
Pro vyhodnocení PCR běhu se používá identický software jako pro ovládání cykleru. Přesný postup vyhodnocování různých typů experimentů je uveden v příručce výrobce cykleru nebo přímo v nápovědě tohoto softwaru.

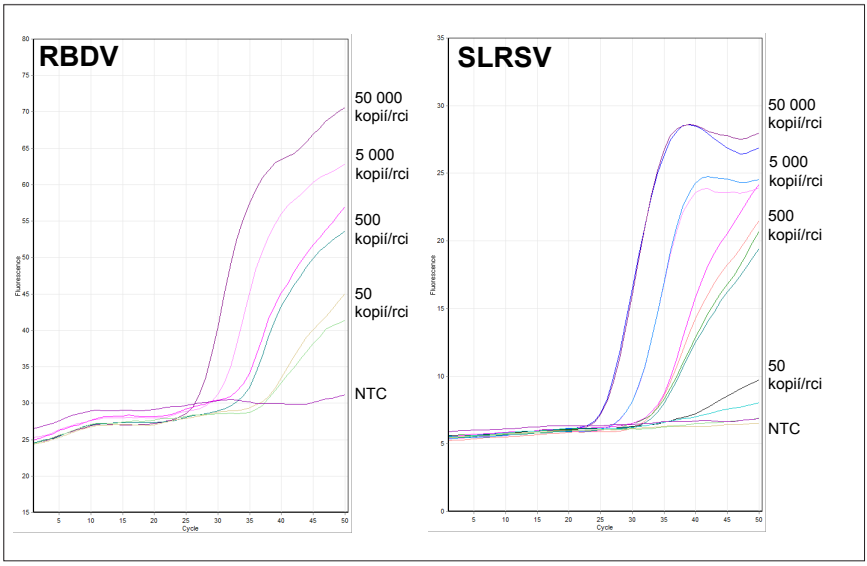
Po ukončení běhu se provádí vyhodnocení odečtením hodnoty Ct v zeleném kanálu pro detekci viru BRNV; ve žlutém kanálu pro detekci viru RpRSV; v oranžovém kanálu pro detekci viru RBDV; v červeném kanálu pro detekci viru SLRSV a v karmínovém kanálu pro detekci IPC. Použité parametry:

Dynamic tube:	ANO
Slope correct:	ANO
Ignore first:	Fakultativně. Doporučuje se použít v případech, kdy fluorescence během první cca 10 cyklů vykazuje průběh ve tvaru písmena „U“. Zpravidla se stává v oranžovém kanálu pro sondy značné ROX.
Threshold:	0,01
Eliminate cycles before:	Dle potřeby

Pokud se provádí kvantitativní hodnocení výsledků, software vytvoří na základě hodnot sérií různě ředěných standardů a zadaných údajů kalibrační křivku a provede absolutní kvantifikaci přítomnosti viru BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v požadovaných jednotkách.

Ukázka výstupu detekce jednotlivých virů z 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. Dle vlastních laboratorních výsledků jsou pro čerstvé listy hodnoty Ct zpravidla 19 ± 2 cykly.

Při použití RubusVir I 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 dle následující tabulky.

*Přehled očekávaných výsledků pro systém kontrol, které jsou součástí **RubusVir I qPCR-RG** detekčního kitu. Rozmezí představuje průměr ± 2 směrodatné odchylky.*

Standard [1mil. kopií/rci]	Očekávaná hodnota Ct
BRNV	19,73 – 21,49
RpRSV	18,73 – 19,40
RBDV	18,66 – 20,18
SLRSV	17,72 – 18,27
IPC	17,81 – 18,46

Poznámka: 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 RubusVir I qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložené standardy BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV při použití v koncentraci 1 milion kopií v PCR reakci očekávat rozpětí hodnot Ct dle tabulky výše.

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

Další kontroly

Pro kontrolu případné kontaminace reagencií 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.

3.3.3.2 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.

3.4. Porovnání s metodou 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 konfirmovány další metodou využívající jiný princip detekce.

ELISA soupravy na detekci viru RBDV, SLRSV a RpRSV nabízí několik firem (např. Bioreba, Agdia, Loewe). Dalším cílem předkládané metodiky tedy bylo vzájemně porovnat metodu ELISA (primární metoda detekce RBDV, SLRSV a RpRSV) s nově vyvinutou metodou na principu real-time PCR (konfirmační metoda).

3.4.1 Postup

3.4.1.1 Úvod

Pro porovnání obou metod byly využity detekční soupravy firmy Bioreba. Pro detekci viru RBDV detekční sada k.č. 152065 a pro detekci SLRSV detekční sada k.č. 151665. U viru RpRSV se vyskytují sérologicky velmi odlišné izoláty, které nelze zachytit pomocí jedné univerzální detekční soupravy. Pro detekci viru v ovocných dřevinách a drobném ovoci výrobce doporučuje použít detekční soupravu RpRSV-ch, zatímco pro detekci viru v révě vinné výrobce doporučuje použít oba detekční kity (RpRSV-ch a RpRSV-g). K detekci viru RpRSV byly použity obě sérologicky odlišné detekční soupravy,

a to RpRSV-g (k.č. 120565) a RpRSV-ch (k.č. 150465). Uvedené soupravy obsahují všechny potřebné reagencie a kontroly.

Metoda ELISA byla provedena podle návodu výrobce s využitím originálních reagencií. Z dodaných pozitivních kontrol byla izolována RNA a připravena cDNA, která byla použita pro paralelní detekci metodou real-time PCR podle kapitoly 3.3.2.3. Byla provedena srovnávací analýza citlivosti obou metod využitím ředicích řad pozitivních kontrol.

3.4.1.2 Analýza citlivosti obou metod

Metodika

Pro srovnání obou metod byly použity pozitivní kontroly, které jsou součástí ELISA souprav: RBDV (k.č. 152053; Bioreba); RpRSV-ch (k.č. 150453; Bioreba); RpRSV-g (k.č. 120553; Bioreba) a SLRSV (k.č. 151653; Bioreba). 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. Pro detekci viru metodou ELISA i real-time PCR bylo shodně použito 200 µl rekonstituovaného identického lyofilizátu dle postupů výše a dle doporučení výrobce (u ELISA).

Očekávaná hodnota parametru

» Metoda real-time PCR musí pro detekci všech výše testovaných virů poskytovat stejné pozitivní výsledky v celém rozsahu koncentrací patogenu jako metoda ELISA.

» Metoda real-time PCR musí pro detekci všech výše testovaných virů vykazovat srovnatelný limit detekce jako metoda ELISA, aby mohla být považována za konfirmační.

3.4.2 Výsledky pro jednotlivé viry

Analýza metodou ELISA byla provedena v technických duplikátech a detekce metodou real-time PCR v simplexu u nízkých ředění a technických triplikátech pro vysoká ředění. Analýzy byly prováděny do takového ředění, kdy jedna z metod vykazovala negativní výsledek (tabulka níže).

Srovnání citlivosti metody ELISA a real-time PCR pro detekci virů RBDV, RpRSV a SLRSV. *ELISA: uvedena průměrná hodnota absorbance po odečtení pozadí ± směrodatná odchylka. Real-time PCR: uvedena průměrná hodnota Ct ± směrodatná odchylka; údaj v závorce vyjadřuje procento pozitivních nálezů z testovaného triplikátu. (-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek; (PP): potenciálně pozitivní výsledek.*

RBDV pozitivní kontrola (Bioreba)		
Ředění	**ELISA kit RBDV**	**Real-time PCR**
neředěno	(+) 2,037 ± 0,020	(+) 28,99 ± 0,25 (100 %)
2×	(+) 2,101 ± 0,089	(+) 29,45 ± 0,49 (100 %)
4×	(+) 1,123 ± 0,044	(+) 30,45 ± 0,54 (100 %)
8×	(+) 0,600 ± 0,031	(+) 31,45 ± 0,35 (100 %)
16×	(+) 0,281 ± 0,017	(+) 34,44 ± 1,06 (100 %)
32×	(PP) 0,169 ± 0,003	(+) 32,95 ± 2,00 (66,6 %)
64×	(-) 0,107 ± 0,002	(-)

RpRSV-ch pozitivní kontrola (Bioreba)		
Ředění	**ELISA kit RpRSV-ch**	**Real-time PCR**
neředěno	(+) 3,691 ± 0,089	(+) 21,58
2×	(+) 3,748 ± 0,125	(+) 21,73
4×	(+) 2,933 ± 0,061	(+) 23,44
8×	(+) 2,030 ± 0,367	(+) 24,04
16×	(+) 0,866 ± 0,091	(+) 25,61 ± 0,04 (100 %)
32×	(PP) 0,165 ± 0,004	(+) 26,21 ± 0,12 (100 %)
64×	(-) 0,087 ± 0,001	(+) 27,24 ± 0,30 (100 %)

RpRSV-g pozitivní kontrola (Bioreba)		
Ředění	**ELISA kit RpRSV-g**	**Real-time PCR**
neředěno	(+) 1,667 ± 0,188	(+) 23,85
2×	(+) 0,813 ± 0,112	(+) 24,57 ± 0,07 (100 %)
4×	(+) 0,466 ± 0,106	(+) 25,45 ± 0,18 (100 %)
8×	(+) 0,288 ± 0,001	(+) 26,45 ± 0,13 (100 %)
16×	(PP) 0,105 ± 0,000	(+) 26,32 ± 0,22 (100 %)
32×	(PP) 0,096 ± 0,003	(+) 29,15 ± 0,05 (100 %)
64×	(-) 0,079 ± 0,002	(+) 28,79 ± 0,54 (100 %)

SLRSV pozitivní kontrola (Bioreba)		
Ředění	**ELISA kit SLRSV**	**Real-time PCR**
neředěno	(+) 3,661 ± 0,037	(+) 19,79
2×	(+) 3,749 ± 0,075	(+) 22,51
4×	(+) 2,923 ± 0,459	(+) 23,87
8×	(+) 1,351 ± 0,185	(+) 23,80
16×	(+) 1,060 ± 0,024	(+) 23,55 ± 0,26 (100 %)

32×	(+) 0,465 ± 0,030	(+) 26,28 ± 0,23 (100 %)
64×	(PP) 0,200 ± 0,015	(+) 25,47 ± 0,24 (100 %)
128×	(PP) 0,130 ± 0,003	(+) 28,74 ± 0,47 (100 %)
256×	(PP) 0,121 ± 0,002	(+) 29,67 ± 1,48 (100 %)
512×	(-) 0,113 ± 0,003	(+) 29,84 ± 0,18 (100 %)

U viru RBDV vykazovala metoda real-time PCR stejné pozitivní výsledky pro detekci v celém rozsahu koncentrací viru jako metoda ELISA. Virus SLRSV a obě sérologické varianty RpRSV byly metodou real-time PCR bez problémů detekovány s vyšší senzitivitou, než jakou vykazovala metoda ELISA. Křížovým testem bylo také ověřeno, že detekční kit RpRSV-ch nezachytí pozitivní kontrolu RpRSV-g a naopak, testovací souprava RpRSV-g není schopna detekovat pozitivní kontrolu RpRSV-ch, takže pro věrohodnou detekci tohoto viru je nezbytné použít obě soupravy.

Pokud by se však senzitivita vyvinutého real-time PCR systému přepočítala na stejnou navážku, byla by PCR metoda teoreticky ještě 100× citlivější, neboť v průběhu přípravy cDNA a následné PCR reakce dochází k několikerému ředění detekovaného cíle.[1] Případné zvýšení citlivosti PCR 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 v celém rozsahu koncentrací patogenů (RBDV, RpRSV a SLRSV) jako metoda ELISA.
- Metoda real-time PCR vykazovala vyšší senzitivitu detekce pro viry RpRSV a SLRSV ve srovnání s metodou ELISA.
- Na základě výsledků lze metodu real-time PCR pro detekci RBDV, RpRSV a SLRSV používat jako konfirmační.
- Uživatelům testovacích souprav pro detekci viru RpRSV od firmy Bioreba lze doporučit primární použití metody real-time PCR pro testování přítomnosti RpRSV v biologickém materiálu, protože tato metoda je schopna zachytit všechny testované kmeny viru v jedné PCR reakci, tudíž není nezbytné použít dva detekční kity jako u metody ELISA od firmy Bioreba.

[1] Z původního objemu 200 µl extraktu pro ELISA byla RNA izolována do 50 µl (1 µl RNA ~ 4 µl extraktu pro ELISA) a pro přípravu 20 µl cDNA bylo použito 5 µl RNA (~ 20 µl extraktu pro ELISA; 1 µl cDNA ~ 1 µl extraktu pro ELISA); do PCR reakce byly použity 2 µl cDNA, což odpovídá 2 µl původního extraktu pro ELISA. Vzhledem k tomu, že pro testování metodou ELISA se používá celý objem 200 µl extraktu, je validovaná real-time PCR metoda teoreticky až 100× citlivější při stejné navážce.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V laboratorní diagnostice virů infikujících maliník se preferuje imunoenzymatická metoda ELISA a metody založené na principu PCR. Pro detekci mohou být využívány i další metody: elektronová mikroskopie, diagnostika na základě hodnocení symptomů nebo testování s využitím biologického indexingu, tyto metody však nejsou pro rutinní testování vhodné. Elektronová mikroskopie je využívána primárně pro základní výzkum, symptomatologie vyžaduje vysoce kvalifikované odborníky a biologický indexing je metoda prostorově a časově náročná. V případě, že je pro vybraný virus maliníku zavedena metoda ELISA, je v rutinní diagnostice upřednostněna před metodou RT-PCR. A to hlavně z důvodů, že testování je levnější nebo lze touto metodou testovat více vzorků najednou. Kritickým bodem pro metodu ELISA je, že při testování může docházet ke zkřížené reaktivitě nebo k nespecifickým reakcím, což může vést k falešné pozitivitě výsledků (Kfir a Genthe 1993). Metoda na principu PCR má své výhody v citlivosti reakce, kdy lze oproti ELISA detekovat nižší koncentrace virů ve vzorku, a v případě multiplexního uspořádání je možno provést současně detekci více virů v jedné reakci a tím tak snížit finanční náklady na testování.

V literatuře jsou pro diagnostiku vybraných virů maliníku (BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV) dostupné metody na principu PCR, ale jedná se většinou o simplexní uspořádání, kdy je testován pouze vybraný virus. Multiplexní detekci virů RpRSV a SLRSV (spolu s TBSV; tomato bushy stunt virus) u jahodníku klasickou PCR metodou s gelovou vizualizací popsal Wei *et* al. (2008). Předkládaná detekční metoda je navržena v multiplexním real-time PCR uspořádání, kdy jsou současně detekovány čtyři viry a pro ověření kvality testování také interní kontrola kvality (IPC). Na základě literární rešerše je v současné době pro testování BRNV a SLRSV využívána klasická metoda na principu RT-PCR. PCR metodu pro detekci BRNV s použitím specifických primerů (417 nt) navržených na oblast RdRp ve své práci popisují Jevremović *et* al. (2019). Problematiku testování SLRSV klasickou metodou RT-PCR řešil Kheder (2021). Pro metodu použil primery navržené do oblasti genu pro obalový protein v RNA 2, které amplifikovaly úsek dlouhý 497 bp. Primery pro detekci BRNV a SLRSV byly ve vyvíjeném multiplexním uspořádání navrženy do oblasti genu UTR. Tang *et* al. (2020) pro rychlou a citlivou detekci RpRSV vyvinuli metodu na principu real-time RT-PCR s využitím TaqMan sond. Primery a sondy, které amplifikovaly fragment velký 229 bp, navrhli v co nejvíce konzervované oblasti genu pro pohybový protein (Mo). Detekční limit cílové oblasti RpRSV byl hodnocen vytvořením standardní křivky za použití plazmidové DNA a byl odhadnut na 61–98 kopií/reakci v závislosti na kmeni RpRSV. Citlivost byla asi 100krát vyšší než u klasické RT-PCR s použitím stejných primerů.

V předkládané metodice byla citlivost metody pro RpRSV stanovena na 500 kopií/reakci se 100% reprodukovatelností a detekční limit na 50 kopií na reakci. Detekcí RBDV metodou real-time RT-PCR se zabývali Quito-Avilaa a Martin (2011). Primery navrhli do oblasti obalového proteinu s cílem, aby byly schopny detekovat co nejvíce izolátů viru. Primery a sondy amplifikovaly úsek dlouhý 94 bp s mezí detekce 30 virových kopií, což je srovnatelné s citlivostí předkládané metodiky (50 kopií/reakci).

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v rostlinném materiálu může být využita v celé řadě aplikací, např.:

- Rutinní diagnostika virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV
- Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu pro zajištění požadavků certifikace
- Sledování výskytu virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV na vybraném území
- Výzkum šíření virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV
- Základní výzkum biologie virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV
- Studium vektorů daných virů
- Studium přirozených hostitelů
- Testování hospodářské škodlivosti daných virů

Metodika real-time PCR detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV v rostlinném materiálu je určena pro laboratoře molekulární biologie, které se věnují diagnostice virových onemocnění nebo virologickému výzkumu, 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

Metodika pro diagnostiku virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV metodou real-time PCR je validována pro současnou detekci všech virů v jedné PCR reakci, není nutno připravovat čtyři nezávislé PCR reakce pro detekci těchto virů. Tato skutečnost je pozitivně hodnocena v případě testování rozmnožovacího materiálu v certifikačním stupni SE (Superelita), kdy je dle platné legislativy požadováno každé dva roky sledovat více než 10 patogenů. Metodika tak zrychluje a zlevňuje diagnostiku virů maliníku. 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, nebo uvolněním kapacity laboratoře pro další testy. Finanční přínos je však těžko odhadnutelný, bude záležet na aktivitách konkrétní laboratoře.

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

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.

V laboratořích, kde se rutinně provádí real-time PCR vyšetření přítomnosti RNA virů, souvisejí náklady pouze s nákupem primerů/sond (cena cca 45 000 Kč/ 1 000 reakcí), případně celého kitu. Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení, musí počítat s následujícími náklady (orientační ceny jednotkového balení, uvedeno bez DPH):

Izolace RNA:	50 izolací	8 000 Kč
Příprava cDNA:	200 reakcí	10 000 Kč
Primery+sondy	1 000 reakcí	45 000 Kč
PCR reagencie	1 000 reakcí	10 000 Kč
Real-time PCR cykler	1 ks	> 800 000 Kč

Další spotřební materiál pro laboratoře molekulární biologie (rukavice, špičky, laboratorní plastik, aj.).

Pro metodu ELISA a navržený diagnostický systém na principu real-time PCR byly porovnány finanční náklady, které zahrnovaly pouze nákup potřebných reagencií a spotřebního materiálu; do ceny nebyly započítány další náklady, které jsou odlišné pro každou laboratoř (energie, mzdy, režie, amortizace, atd.). Při porovnání byla zohledněna ještě skutečnost, že pro viry RpRSV, RBDV a SLRSV je dostupná metoda ELISA. Pro zajištění vyššího záchytu různých variant RpRSV je vhodné pro testování tohoto viru metodou ELISA použít dva diagnostické kity (RpRSV-ch a RpRSV-g). Pokud by se pro detekci virů RpRSV (RpRSV-ch a RpRSV-g), RBDV a SLRSV použila metoda ELISA a pro BRNV real-time PCR, částka za detekci čtyř virů byla vypočítána na cca 1 150 Kč. V případě, že by byla analýza čtyř maliníkových virů provedena multiplexní real-time PCR, částka by byla

860 Kč. Závěrem lze konstatovat, že vhledem k tomu, že analýza virů BRNV, RpRSV, RBDV a SLRSV multiplexní metodou real-time PCR je finančně výhodnější, protože se provádí jednou metodou, jedním pracovním postupem, jedním pracovníkem a náklady na její provedení jsou o 290 Kč nižší.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

BARBARA, D. J., MORTON, A., RAMCHARAN, S., COLE, I. W., PHILLIPS, A., KNIGHT, V. H. Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial Rubus plantations in England and Wales. Plant pathology, 2001, 50(6): 747-754. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00642.x.

CADMAN, C. H. Studies on the relationship between soil-borne viruses of the ringspot type occurring in Britain and Continental Europe. Virology. 1960, 11(4): 653-664. DOI: 10.1016/0042-6822(60)90112-4.

JEVREMOVIĆ, D., LEPOSAVIĆ, A., PAUNOVIĆ, S. A. Molecular and biological characterization of Black raspberry necrosis virus on red raspberry in Serbia. In Scientific-Experts Conference of Agriculture and Food Industry. 2019, 82-87. DOI: 10.1007/978-3-030-40049-1_10.

JONES, A. T., WOOD, G. A. The virus status of raspberries (Rubus idaeus L.) in New Zealand. New Zealand journal of agricultural research, 1979, 22(1): 173-182. DOI: 10.1080/00288233.1979.10420857.

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. DOI: 10.2166/wst.1993.0353.

KHEDER, A. A. Developed one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) assay for detection of Strawberry Latent Ring Spot Virus. Journal of Virological Sciences. 2021, 9(1): 1-13. DOI: 10.17582/journal.jvs/2021/9.1.1.13.

KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B. Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. 2011, 9.

LISTER, R. M. Strawberry latent ringspot: a new nematode-borne virus. Annals of Applied Biology. 1964, 54(2): 167-176. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1964.tb01180.x.

MARTIN, R. R. Virus diseases of Rubus and strategies for their control. In VIII International Rubus and Ribes Symposium. 2001, 585: 265-270. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.585.43

MARTIN, R. R., MACFARLANE, S., SABANADZOVIC, S., QUITO, D., POUDEL, B., TZANETAKIS, I. E. Viruses and virus diseases of Rubus. Plant disease. 2013, 97(2): 168-182. DOI:10.1094/PDIS-04-12-0362-FE.

MAYO, M. A. Changes to virus taxonomy 2004. Archives of virology. 2005, 150(1): 189. DOI: 10.1007/s00705-004-0429-1.

MCMENEMY, L. S., MITCHELL, C., JOHNSON, S. N. Biology of the European large raspberry aphid (Amphorophora idaei): its role in virus transmission and resistance breakdown in red raspberry. Agricultural and Forest Entomology. 2009, 11(1): 61-71. DOI: 10.1111/j.1461-9563.2008.00409.x.

MURANT, A.F. Soilborne viruses and diseases in Rubus. In: Virus diseases of small fruits and grapevines, a handbook (Ed. by Frazier, N.W.). University of California, Berkeley, California, USA. 1970, 132-142.

NĚMCOVÁ V., BUCHTOVÁ, I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Praha: Ministerstvo zemědělství. 2021. ISBN 978-80-7434-629-3.

PM 4/10 (2) Certification scheme for Rubus. OE PP/EPPO Bulletin. 2009, 39: 271–277. DOI: 0.1111/j.1365-2338.2009.02308.x.

PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity OE PP/EPPO Bulletin. 2021, 51:468–498. DOI: 10.1111/epp.12780.

QUITO-AVILA, D. F., MARTIN, R. R. Real-time RT-PCR for detection of Raspberry bushy dwarf virus, Raspberry leaf mottle virus and characterizing synergistic interactions in mixed infections. Journal of virological methods. 2012, 179(1): 38-44. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.09.016.

TANG, J., NG, F., KANCHIRAOPALLY, D., WARD, L. Development of TaqMan real-time RT-PCR for sensitive detection of diverse Raspberry ringspot virus isolates. Journal of Virological Methods. 2020, 278: 1-6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113821.

TANG, J., WARD, L. I., CLOVER, G. R. The diversity of strawberry latent ringspot virus in New Zealand. Plant disease. 2013, 97(5): 662-667. DOI: 10.1094/PDIS-07-12-0703-RE.

TZANETAKIS, I. E., POSTMAN, J. D., GERGERICH, R. C., MARTIN, R. R. A virus between families: nucleotide sequence and evolution of Strawberry latent ringspot virus. Virus research. 2006, 121(2): 199-204. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.06.001.

WEI, T., LU, G., CLOVER, G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. Journal of Virological Methods. (2008), 151(1): 132-139. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.03.003.

WETZEL, T., KRCZAL, G. Molecular biology of Raspberry ringspot nepovirus. Plant Viruses. 2007, 1(1): 45-51.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Metodika vznikla *de novo* na základě výzkumné a vývojové činnosti autorů a výsledky nebyly zatím publikovány. Část výsledků byla prezentována formou posteru „Survey of raspberry viruses and recovery of *in vitro* raspberry cultures in the Czech Republic and Norway“ na XXII. České a slovenské konferenci o ochraně rostlin (2022).

Ústřední kontrolní
a zkušební ústav zemědělský
Držitel certifikátu ISO 9001

Hroznová 2
603 00 Brno

www.ukzuz.cz
ID DS: ugbaiq7

IČO: 00020338
DIČ: CZ00020338

v y d á v á

O S V Ě D Č E N Í

UKZUZ 219681/2022

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 black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot (SLRSV) v rostlinném materiálu**

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

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.**

Místo vydání: **Holovousy**
Rok vydání: **2022**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace TAČR č. TO01000295 „Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku“.

Brno 16. 11. 2022

Ing. Daniel Jurečka
ředitel ústavu
……...……..
Podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V …… dne ……..

Mgr. Jan Radoš
Digitálně podpis:
22.11.2022 13:57

.....……
Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu

Autoři: Mgr. Lucie Valentová, Ing. Martina Rejlová, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

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

Grafická úprava a sazba: ŽAKET – KARTOGRAFICKÉ VYDAVATELSTVÍ A TISKÁRNA

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-87030-87-5

ISBN 978-80-87030-87-5

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

© 2022