

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

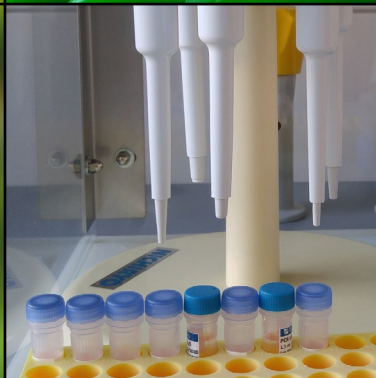


**Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu**

Radek Čmejla, Lucie Valentová



**CERTIFIKOVANÁ  
METODIKA  
2018**





# **Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu**

Radek Čmejla, Lucie Valentová



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

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

Datum  
vypracování: 21. 6. 2018

Aktualizace: 20. 9. 2018

Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu/ podpory MŠMT v rámci programu NPU I č. LO1608 s názvem: Výzkumné ovocnářské centrum.

#### Ochrana

autorských práv: Použité sady pro PCR detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu jsou právně chráněny užitným vzorem č. 32 045 a patentem (Příhláška PV 2017-162, v řízení) a jejich použití je možné se souhlasem Přihlašovatele (VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ OVOCNÁŘSKÝ ÚSTAV HOLOVOUSY, s.r.o.).

Oponenti: Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně  
RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D., ÚKZÚZ

Další informace: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský schválil publikaci jako certifikovanou metodiku a doporučil ji provyužití v zemědělské praxi. Publikaci bylo uděleno Osvědčení UKZUZ 117978/2018 v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumu a vývoje.

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Úvod</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2. Cíl metodiky</b>  | <b>8</b>  |
| <b>3. Vlastní popis metodiky</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>3.1 Pre-analytická fáze</b>                                    | <b>9</b>  |
| 3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků                               | 9         |
| 3.1.2 Příjem vzorků do laboratoře                                 | 9         |
| <b>3.2 Analytická fáze</b>  | <b>9</b>  |
| 3.2.1 Izolace RNA   | 10        |
| 3.2.2 Příprava cDNA   | 12        |
| 3.2.3 Real-time PCR detekce                                       | 13        |
| 3.2.3.1. Úvod   | 13        |
| 3.2.3.2. Materiál   | 14        |
| 3.2.3.3. Sestavení vlastní real-time PCR reakce                   | 15        |
| 3.2.3.4. Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cykleru | 18        |
| <b>3.3 Post-analytická fáze</b>                                   | <b>20</b> |
| 3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat                                  | 20        |
| 3.3.1.1. Vyhodnocení PCR běhu u přístroje Rotor-Gene Q            | 20        |
| 3.3.1.2. Vyhodnocení systému kontrol kvality                      | 21        |
| 3.3.1.3. Akceptace a interpretace výsledků                        | 22        |
| 3.3.2 Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cykleru    | 22        |
| <b>3.4 Validace metodiky</b>                                      | <b>22</b> |
| 3.4.1 Stanovení analytické specificity                            | 23        |
| 3.4.2 Stanovení analytické senzitivity                            | 24        |
| 3.4.3 Stanovení opakovatelnosti                                   | 24        |
| 3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti                               | 25        |
| 3.4.5 Zjednodušený validační protokol                             | 26        |
| <b>4. Srovnání novosti postupů</b>                                | <b>27</b> |
| <b>5. Popis uplatnění certifikované metodiky</b>                  | <b>27</b> |
| <b>6. Ekonomické aspekty</b>                                      | <b>28</b> |
| <b>7. Seznam použité související literatury</b>                   | <b>29</b> |
| <b>8. Seznam publikací, které předcházejí metodice</b>            | <b>30</b> |



## 1. ÚVOD

Pěstování třešňí a višňí má v České republice dlouhodobou tradici. K 31. 5. 2017 zaujímaly produkční sady třešňí 847 ha a višňí 1 375 ha. V roce 2016 se v České republice vyprodukovalo celkem 9 926 tun třešňí a 9 436 tun višňí (Český statistický úřad, Situační a výhledová zpráva, Ovoce 12/2017). Pro zajímavost, výnos u třešňí dosahoval 7,12 kg/strom a u višňí 8,96 kg/strom.

Významným patogenem snižujícím výnos třešňí (*Prunus avium* L.) a višňí (*Prunus cerasus* L.) jsou viry z čeledi *Closteroviridae*, LChV-1 (rod *Velarivirus*) a LChV-2 (rod *Ampelovirus*), které jsou původci virového onemocnění maloplodost třešně (LChD – Little Cherry Disease). Maloplodost třešně byla zaznamenána ve všech světových oblastech pěstování třešňí včetně Evropy se sporadickými záchyty i v České republice (Schlesingerová 2012).

Viry maloplodosti třešně se v rostlině často vyskytují v latentní formě, kdy se neprojevují na rostlině žádné zřetelné příznaky. Příznaky na plodech se mohou projevovat krátce před jejich dozráváním, kdy dochází ke zpomalení vývoje plodů, plody jsou menší velikosti, trojúhelníkovitého tvaru, nedochází k jejich úplnému dozrání a mají typicky nahořklou chuť, která snižuje jejich kvalitu. Plody nejsou potom vhodné ke konzumaci a dochází tak k výrazným ekonomickým ztrátám. Projev příznaků na plodech ovlivňují např. klimatické podmínky (nízké jarní teploty) nebo také použitá podnož (Büttner *et al.* 1994, Harms *et al.* 1996). V celkovém habitu nemusí napadený strom v porovnání se zdravým projevovat zvláštní symptomy. V případě projevu příznaků dochází k menším přírůstkům a celkově menšímu vzrůstu napadeného stromu. Dále se onemocnění může projevovat předčasným zbarvením listů do červenofialové až bronzové barvy zejména na nejstarších listech ke konci léta (Welsh, Cheney 1976). Vzhledem k postupnému šíření virů v rostlině se příznaky nemusí objevovat v celé koruně stromu rovnoměrně, mohou být napadeny jen určité části.

Přenos viru LChV-1 byl prokázán pouze vegetativním množením podnoží, očkovaním a roubováním, přenos viru LChV-2 byl také ještě popsán pomocí vektoru - červce javorového (*Phenacoccus aceris*) (Raine *et al.* 1986), který je široce polyfágním druhem a v České republice se nejčastěji vyskytuje na javoru, olši, jasanu, jabloni, hlohu, jírovci, moruši a révě (Schlesingerová 2012).

Protože se oba viry přenáší především při vegetativním množení rostlin, účinná ochrana proti těmto virům je převážně preventivního charakteru spočívající zejména v produkci a používání bezvirózního rozmnožovacího materiálu. Viry maloplodosti třešně jsou uvedeny jednak na seznamu virů a virům podobných škodlivých organismů, na které se testuje rozmnožovací materiál ovocných rodů a druhů v České republice, a také na seznamu certifikačního schématu pro testování třešňí PM 4/29(1) dle EPPO. Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány zákonem č. 219/2003 Sb. a navazující vyhláškou č. 332/2006 Sb., o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu chmele, révy, ovocných rodů a druhů a okrasných druhů a jeho uvádění do oběhu (Příloha 10: Seznam virů a virům podobných škodlivých organismů, na které se testuje rozmnožovací materiál ovocných rodů a druhů

a seznam specifických škodlivých organismů ovocných rodů a druhů snižujících jakost). Dle této platné legislativy je testování množitelského materiálu třešň a višň povinné.

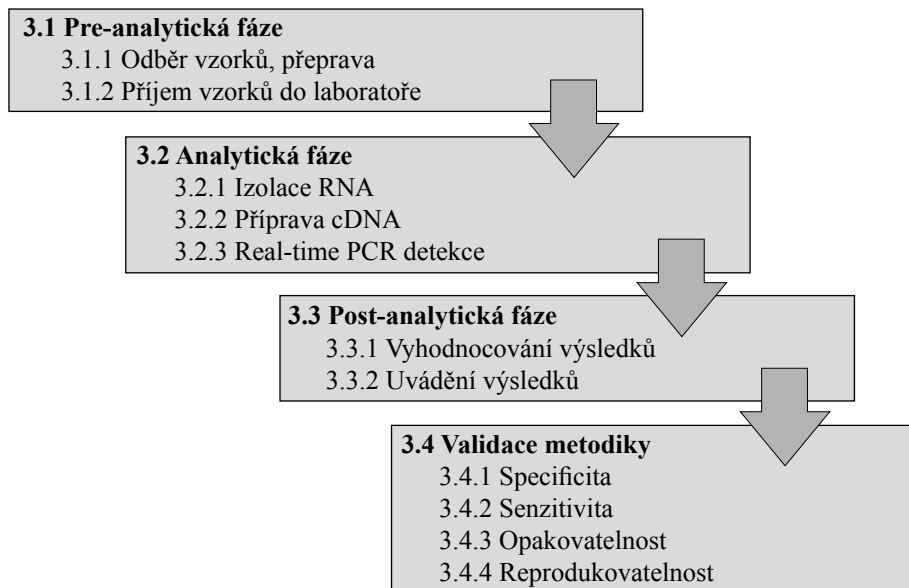
## 2. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je zavedení nového detekčního systému pro rutinní diagnostiku rostlinných virů LChV-1 a LChV-2, které jsou původci virového onemocnění maloplodost třešň (LChD – Little Cherry Disease). Hostitelskými rostlinami těchto virů jsou zejména třešň a višň. Výskyt LChV-1 byl popsán také na slivoních, broskvoních a mandloních (Matic *et al.* 2007). Choroba způsobuje významné ztráty na výnosu zejména třešň a višň.

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 simplexním/multiplexním uspořádání pro použití s cyklem Rotor-Gene Q (Qiagen) dle validačního schématu metodiky EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) PM7/98(2) 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.

## 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Vlastní metodika sestává z několika kroků (Obrázek 1):



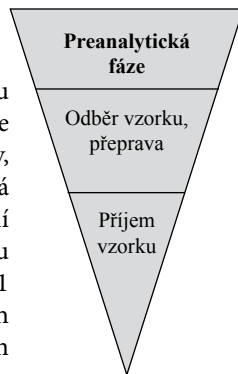


Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů molekulárně-biologických metod a principů správné laboratorní praxe. Metodika byla testována a validována s použitím konkrétních reagensí, souprav a přístrojů (viz níže), odborník v oboru však bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení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

### 3.1 Pre-analytická fáze

#### 3.1.1 Odběr vzorků, přeprava vzorků

Nejvhodnějším rostlinným materiálem a dobou odběru pro detekci virů z hlediska jejich koncentrace a lokalizace v hostiteli jsou na jaře (březen - květen) narašené pupeny, květy a listy, v pozdějších měsících zejména listy (Ludvíková *et al.* 2011). Termín odběru by měl odpovídat účelu testování a typu testovaného materiálu. Pro rutinní testování jsou nejvhodnějším materiálem listy. Protože se viry LChV-1 a LChV-2 maloplodosti třešně mohou vyskytovat v rostlinách nerovnoměrně, doporučuje se odebírat vzorky po celém obvodu koruny (8–12 listů), pokud možno ze všech světových stran, čímž se získá průměrný směsný vzorek. Odebrané a řádně označené vzorky je nutné uchovávat v chladu a dopravit co nejdříve 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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 nekrotou pletiv
- Dalšími faktory, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky.

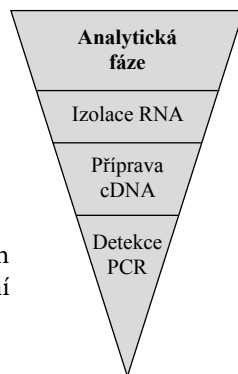
### 3.2 Analytická fáze

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:

- Kvalita izolované RNA a připravené cDNA
- Dodržování zásad dekontaminace a hygieny platných pro laboratoř molekulární biologie pro vyloučení možných kontaminací.
- Dodržování všech zásad správné laboratorní praxe.



### 3.2.1 Izolace RNA

Metodika je validována s využitím následujícího postupu a reagensí 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            |

- Izolovaná RNA by měla mít čistotu (hodnota poměru absorbcí A260/A280) alespoň 1,8.
- Purifikovanou RNA je možné pro další analýzy (např. příprava cDNA) krátkodobě uchovat při 4 °C nebo dlouhodobě skladovat při -80 °C.
- Izolace RNA probíhá v prostorách k tomu určených v rámci laboratoře molekulární biologie (pre-PCR area) v souladu s principy správné laboratorní praxe.
- Všechny centrifugační kroky se provádějí ve stolní centrifuze s rotorem pro mikrozkušavky 2 ml při pokojové teplotě při otáčkách minimálně 10 000 g (u běžných centrifug zpravidla 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 dusíku utře dostatečné množství rostlinného pletiva na jemný prášek. Standardně se 50 mg natřeného vzorku přeneso do 2ml mikrozkušavky (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 přeneso pomocí 1ml špičky s filtrem s ustríženou 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. Proteklý lyzát se opatrně bez narušení pelety přeneso 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.
8. Maximálně 700 µl směsi z kroku 7 se přeneso 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 otre 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 otre buničitou vatou. W kolona se opět vsune do sběrné zkumavky.

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

Odborníkoví v oboru jsou známy další postupy 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 reverzní transkriptáza: M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/ $\mu$ l (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.).
- 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  $\mu$ g izolované RNA.
- 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 10mM dNTPs
  - 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 zcentrifugují.
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 dají do cykleru.
7. Vzorky projdou následujícími teplotními fázemi:
  - a. Inkubace při 37 °C po dobu 2 minuty.
  - 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.

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

#### **3.2.3.1. Úvod**

Metodika je validována jak pro současnou detekci virů LChV-1 a LChV-2 v jedné reakci (multiplexní uspořádání), tak pro separátní detekci každého viru zvlášť.

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* (interní pozitivní kontrola, IPC).

Vlastní detekce je založena na použití specifických primerů a sond, které je možné zakoupit zvlášť nebo použít LChV qPCR detekční kit, který obsahuje všechny reagentie pro real-time PCR detekci pro cykly Rotor-Gene Q [Qiagen] nebo StepOne/Plus [ThermoFisher Scientific] (k.č. LChV\_qPCR-RG; LChV\_qPCR-SO; výrobce a dodavatel: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.). Sondy musí být vhodně označeny vzhledem k zamýšlenému použití a detekčním možnostem konkrétního real-time cykleru. Pro detekci v simplexovém uspořádání je možné všechny sondy značit fluoroforem FAM, pro multiplexní 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 reagentií, analyzačních software a dalších faktorů je níže uvedený postup pouze ukázkový a odborník v oboru si tento postup přizpůsobí ke konkrétním podmínkám technického a materiálního vybavení laboratoře.

### 3.2.3.2. *Materiál*

Metodika real-time PCR detekce virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu je validována pro přístroj Rotor-Gene Q (Qiagen; dodává Dynex spol. s r.o.), s využitím následujícího materiálu a reagentií:

- Pro simplexní detekci viru LChV-1 se používají následující primery a sonda:  
Forward primer: GCYACTGATACTGATACGTCTAGCTCG,  
Reverse primer 1: TTTCTCCTACCGCGACGTGG,  
Reverse primer 2: CTAATTTCTTCTACCTCGACGTGG,  
Sonda: AATACTTGCGAAACATGAAGAGCTCC,  
kde sonda je značená FAM.
- Pro simplexní detekci viru LChV-2 se používají následující primery a sonda:  
Forward primer: TCTTTAAGTTGAGTTTGGAGYTGGG,  
Reverse primer: CACACGCCCCAACTTCGTAC,  
Sonda: CACCTGTTGCAACTCCATACTTTTGTAG,  
kde sonda je značená HEX.
- Pro současnou multiplexní detekci virů LChV-1 a LChV-2 se použije směs primerů a sond, které se používají pro simplexní detekci jednotlivých virů.
- 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: CCACAATTAACATCACTACGGTCGGGCTA,  
kde sonda je značená FAM.

- 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 LChV 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.
- Použitý spotřební materiál: Sterilní zkumavky 1,5 ml; PCR stripy pro Rotor-Gene Q; stojánek na zkumavky; špičky s filtrem; PCR voda.

### 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 dubletu.
- 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 zvortexováním a dle potřeby stočit na minicentrifuze.
- Pro zajištění validity výsledků se používá systém minimálně následujících kontrol:
  - Netemplátovaná kontrola (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 LChV-1 a LChV-2. Ředěním syntetické pozitivní kontroly lze však získat standardní kalibrační křivku, podle které je možné provádět vyhodnocení kvantitativně.

\*\*\*\*\*

1. V PCR boxu se do kovového stojáčku připraví potřebný počet 0,1ml stripů včetně mikrozkušavek pro NTC (netemplátovaná kontrola) a syntetickou

pozitivní kontrolu, případně další různé ředěné standardy pro tvorbu kalibrační křivky pro kvantitativní stanovení.

- Podle počtu současně míchaných PCR mastermixů se do stojánku připraví 1,5ml mikrozkušavky, do kterých se připraví adekvátní množství PCR mastermixu dle typu reakce:

### Simplexové reakce

#### *Rozpis pro LChV-1*

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

#### *Rozpis pro LChV-2 a IPC*

| LChV-2 nebo IPC                    | Na 1 vzorek  | Finální konc. |
|------------------------------------|--------------|---------------|
| PCR voda                           | 5,6 µl       |               |
| LChV-2 (IPC) forward primer (10µM) | 1 µl         | 0,5µM         |
| LChV-2 (IPC) reverse primer (10µM) | 1 µl         | 0,5µM         |
| LChV-2 (IPC) sonda (10µM)          | 0,4 µl       | 0,2µM         |
| qPCR 2× Blue Master Mix            | 10 µl        | 1×            |
| <b>Celkem</b>                      | <b>18 µl</b> |               |

### Multiplexová reakce

#### *Rozpis pro současnou detekci LChV-1 a LChV-2*

| LChV-1+LChV-2                  | Na 1 vzorek | Finální konc. |
|--------------------------------|-------------|---------------|
| PCR voda                       | 3,2 µl      |               |
| LChV-1 forward primer (10µM)   | 1 µl        | 0,5µM         |
| LChV-1 reverse primer 1 (10µM) | 0,5 µl      | 0,25µM        |
| LChV-1 reverse primer 2 (10µM) | 0,5 µl      | 0,25µM        |
| LChV-1 sonda (10µM)            | 0,4 µl      | 0,2µM         |
| LChV-2 forward primer (10µM)   | 1 µl        | 0,5µM         |
| LChV-2 reverse primer (10µM)   | 1 µl        | 0,5µM         |
| LChV-2 sonda (10µM)            | 0,4 µl      | 0,2µM         |



|                         |              |    |
|-------------------------|--------------|----|
| qPCR 2× Blue Master Mix | 10 µl        | 1× |
| <b>Celkem</b>           | <b>18 µl</b> |    |

Pro IPC se použije rozpis pro simplexovou reakci (viz výše).

### *Multiplexová reakce s využitím LChV qPCR-RG detekčního kitu pro Rotor-Gene Q PCR cykler*

- Dodavatel: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.
- Kit obsahuje v základním balení komponenty pro provedení 100 testů:
  - UniPmxI: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci.
  - LChV PmxII: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci virů LChV-1, LChV-2
  - IPC PmxII: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA.
  - PCR vodu
  - Pozitivní kontrola pro detekci LChV-1 o koncentraci 500 000 kopií/µl
  - Pozitivní kontrola pro detekci LChV-2 o koncentraci 500 000 kopií/µl
  - Pozitivní kontrola pro detekci IPC o koncentraci 500 000 kopií/µl

| <b>LChV-1+ LChV-2 (IPC)</b> | <b>Na 1 vzorek</b> |
|-----------------------------|--------------------|
| PCR voda                    | 7 µl               |
| LChV PmxII (nebo IPC PmxII) | 1 µl               |
| UniPmxI                     | 10 µl              |
| <b>Celkem</b>               | <b>18 µl</b>       |

3. Připravený mastermix se promíchá krátkým zvortexováním a krátce se zcentrifuguje.
4. Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů po 18 µl.
5. K mastermixu se postupně pipetuje 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 LChV-1, LChV-2 a IPC.
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 LChV-1 a IPC; čtení ve žlutém kanálu pro LChV-2
  - 72 °C 20 s;
 Celý proces amplifikace trvá cca 2 hodiny.

8. PCR produkty je možné uchovávat při teplotě  $\leq -18$  °C po dobu minimálně jednoho roku.

#### 3.2.3.4. Poznámka pro uživatele jiného typu real-time PCR cyklieru

Uživatelé jiných real-time PCR cyklierů než Rotor-Gene Q se musí před objednáním sond (detekčního kitu) seznámit s možnostmi detekce různých fluoroforů na svém PCR cyklieru a s možnostmi příslušného analyzačního softwaru. Dále je nutné posoudit možnosti přístroje pro multiplexování a naprogramovat příslušný PCR protokol.

#### Doporučení pro real-time PCR cyklier StepOne/Plus (ThermoFisher Scientific)

- Použít pasivní referenční barvivo ROX pro normalizaci fluorescence.
- Používat transkript pro mitochondriální gen *Nad5* jako interní pozitivní kontrolu (IPC).
- Označit sondy dle zamýšleného typu detekce podle následujícího schématu:

##### *Simplexová detekce:*

|         |     |         |     |
|---------|-----|---------|-----|
| LChV-1: | FAM | LChV-2: | FAM |
| IPC:    | JOE | IPC:    | JOE |

##### *Multiplexová detekce pouze u cyklieru StepOnePlus (ThermoFisher Scientific):*

|         |     |
|---------|-----|
| LChV-1: | FAM |
| LChV-2: | NED |
| IPC:    | JOE |

- Na základě dlouhodobého testování se doporučuje provádět simplexovou detekci jako experiment typu Presence/Absence, případně pro kvantitativní detekci lze využít Standard Quantitation – Standard Curve experiment. U těchto typů experimentů nelze však využít softwarové vybavení cyklieru pro provádění multiplexní detekce.
- Pro PCR reakci se použijí komponenty a spotřební materiál kompatibilní se StepOne/Plus cyklieru, doporučení lze nalézt v manuálech výrobce. Primery a sondy se použijí v koncentracích uvedených výše pro cyklier Rotor-Gene Q.
- Pro detekci lze také využít LChV qPCR-SO kit (Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.), který obsahuje předmíchané PCR premixy a systém kontrol pro snadné a rychlé sestavení PCR reakce pro StepOne/Plus cyklier.
  - Dodavatel: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.
  - Kit se používá pro simplexovou detekci virů LChV-1 a LChV-2, premixy obsahují i komponenty pro detekci interní pozitivní kontroly (IPC). Toto uspořádání je vyžadováno StepOne softwarem v2.3 pro automatické vyhodnocení Presence/Absence experimentu.

- Kit obsahuje v základním balení komponenty pro provedení 100 testů:
  - UniPmxI: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro PCR amplifikaci včetně pasivního referenčního barviva ROX.
  - LChV-1 PmxII: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci viru LChV-1 a interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA.
  - LChV-2 PmxII: Premix obsahující všechny nezbytné komponenty pro specifickou detekci viru LChV-2 a interní pozitivní kontroly (IPC), která slouží jako kontrola kvality izolované RNA a připravené cDNA
  - PCR vodu
  - Pozitivní kontrola pro detekci LChV-1 o koncentraci 500 000 kopií/μl
  - Pozitivní kontrola pro detekci LChV-2 o koncentraci 500 000 kopií/μl
  - Pozitivní kontrola pro detekci IPC o koncentraci 500 000 kopií/μl
- Rozpis PCR mastermixu na jeden vzorek

| LChV-1 (LChV-2) + IPC | Na 1 vzorek |
|-----------------------|-------------|
| PCR voda              | 7 μl        |
| LChV-1 (LChV-2) PmxII | 1 μl        |
| UniPmxI               | 10 μl       |
| Celkem                | 18 μl       |

- Připravený mastermix se promíchá krátkým zvertexováním a krátce se zcentrifuguje.
- Mastermix se rozpipetuje do PCR stripů/amplifikační destičky po 18 μl.
- K mastermixu se postupně pipetuje 2 μl neředěné cDNA testovaného vzorku.
- Po uzavření všech zkumavek/jamek se vzorky se v post-PCR místnosti přidávají 2 μl syntetické pozitivní kontroly (tedy 1 milion kopií/reakci) pro detekci LChV-1, LChV-2 a IPC.
- Programování StepOne/Plus PCRcyklu: Před použitím je nutné seznámit se s obsluhou přístroje a principem jednotlivých typů analýz (viz příslušné průvodce výrobce [Guides]). Před použitím by též měly být aktuální všechny doporučené kalibrace přístroje (Background Calibration, Spatial Calibration, Dye Calibration).
- Experiment Properties: Pro kvalitativní detekci LChV virů se doporučuje provést experiment typu Presence/Absence, pro kvantitativní detekci lze využít Standard Quantitation – Standard Curve. Na základě vybraného typu experimentu je třeba počítat s doporučeným počtem a typem příslušných kontrol/standardů.
- Plate Setup: V záložce „Define Targets and Samples“ se provede následující nastavení:

| Target Name | Reporter | Quencher |
|-------------|----------|----------|
| LChV-1      | FAM      | NFQ-MGB  |
| LChV-2      | FAM      | NFQ-MGB  |
| IPC         | JOE      | NFQ-MGB  |

a v záložce „Assign Targets and Samples“ se provede přiřazení vzorků (Samples), cílů (Targets) a úkolů (Tasks). V této záložce se také vybere ROX jako pasivní referenční barvivo (LChV qPCR-SO detekční kit referenční barvivo ROX obsahuje).

- Run Method se nastaví následujícím způsobem:

|                |             |                      |
|----------------|-------------|----------------------|
| Pre-PCR read:  | 60 °C 30 s; | Collect Data On Hold |
| Holding stage: | 94 °C 5 min |                      |
| Cycling stage: | 50 cyklů    |                      |
| Step 1:        | 94 °C 20 s  |                      |
| Step 2:        | 58 °C 20 s; | Collect Data On Hold |
| Step 3:        | 72 °C 20 s  |                      |
| Post-PCR read: | 60 °C 30 s; | Collect Data On Hold |

- Celý proces amplifikace trvá cca 2 hodiny.

### 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:

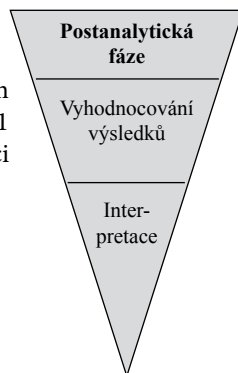
- Správné vyhodnocení systému kontrol zajišťujících validitu výsledků.

#### 3.3.1 Vyhodnocování, analýza dat

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

Po ukončení běhu se provádí vyhodnocení odečtením hodnoty Ct v zeleném kanálu pro detekci viru LChV-1 a interní kontroly kvality (IPC), a ve žlutém kanálu pro detekci viru LChV-2. Použité parametry:

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| 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 LChV-1 nebo LChV-2 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 LChV qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložený IPC standard očekávat Ct v rozpětí 18–19,6 pro 1 milion kopií v PCR reakci.

#### **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 LChV qPCR-RG detekčního kitu v přístroji Rotor-Gene Q lze pro přiložený LChV-1 standard očekávat Ct v rozpětí 17,6–18,6 a pro LChV-2 lze očekávat Ct v rozpětí 19,4–20,2 pro 1 milion kopií v PCR reakci.

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 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.

### 3.3.1.3. 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 metodiky

Validace metodiky byla provedena podle výše uvedených postupů izolace RNA, přípravy cDNA a real-time PCR s využitím kitu LChV 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. Uživatelé PCR cyklieru StepOne/Plus mohou pro tento účel využít LChV qPCR-SO detekční kit, ve kterém jsou všechny potřebné standardy v koncentraci 500 000 kopií na  $\mu$ l.

Validace předkládané metodiky byla provedena podle směrnice EPPO č. PM 7/98(2): 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:

- Analytická specifita
- Analytická senzitivita
- Opakovatelnost
- Reprodukovatelnost

### 3.4.1 Stanovení analytické specifity

#### *Metodika*

Specifita je zajištěna ve dvou krocích:

#### **A) Specifita definovaná in silico**

Pro výběr vhodné oblasti pro návrh primerů byla provedena multiple-alignment analýza dostupných sekvencí virů LChV-1 a LChV-2. 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 sonda v oblasti, která je specifická pouze pro LChV-1 a LChV-2.

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

#### **B) Specifita ověřená na pozitivních a negativních vzorcích**

Navržený detekční systém byl vyzkoušen na již dříve ověřených pozitivních vzorcích a negativních vzorcích různého původu (třešně, višně). Pozitivní nálezy u LChV-1 byly verifikovány nezávislým detekčním systémem s využitím primerů LCH1\_7634F a LCH1\_7942R (Jelkmann *et al.* 2008). Pozitivní nálezy u LChV-2 byly verifikovány nezávislým detekčním systémem s využitím primerů LCV2LO2 a LCV2UP2 (Rott a Jelkmann 2001).

Specifita detekčního systému byla dále ověřena přímým sekvenováním získaných ampliconů z real-time PCR cyklieru a potvrzena pro oba viry.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

- Očekává se 100% specifita detekční metody.

#### *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.

#### *Závěr*

Analytická specifita metody je stanovena na 100%.

### 3.4.2 Stanovení analytické senzitivity

#### Metodika

Syntetické pozitivní kontroly pro LChV-1 a LChV-2 identické s cílovými místy detekce o známé koncentraci 1 µg/µl byly postupně desítkově nařaděny až na koncentraci 1 ag/µl (odpovídá cca 23,4 kopiím/µl u LChV-1; a 13 kopiím/µl u LChV-2). 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 třech ředících řad.

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

#### Očekávaná hodnota parametru

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

#### Výsledky

Pro analýzu vlivu multiplexování byly porovnány výsledky detekce virů LChV-1 a LChV-2 v simplexovém a multiplexovém uspořádání při různých koncentracích syntetické pozitivní kontroly. Výsledky detekce jsou pro oba viry v obou provedeních srovnatelné.

Pro metodu detekce LChV-1 bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 500 kopií/reakci.

Pro metodu detekce LChV-2 bylo nejnižší dosažené ředění, při kterém byly všechny výsledky pozitivní, 650 kopií/reakci.

#### Závěr

- Multiplexování nemá negativní vliv na výkonnost testu; výsledky jsou srovnatelné se simplexovým uspořádáním pro LChV-1 i LChV-2.
- Analytická senzitivita metody detekce LChV-1 je stanovena na 500 kopií/reakci.
- Analytická senzitivita metody detekce LChV-2 je stanovena na 650 kopií/reakci.

### 3.4.3 Stanovení opakovatelnosti

#### Metodika

Opakovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce LChV-1 stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly. Pro LChV-2 byla opakovatelnost určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo stanoveno na 650 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 LChV-1 a LChV-2 v jedné reakci. U každé série je stanoven variační koeficient a celkový průměrný variační koeficient, který vyjadřuje míru shody naměřených Ct při limitním ředění mezi jednotlivými sériemi.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

Variační koeficient pro limitní ředění  $\leq 5\%$ .

#### *Výsledky*

LChV-1: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0059 \pm 0,0015$ , tj. 0,59%.

LChV-2: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií měřená průměrným variačním koeficientem je  $0,0107 \pm 0,005$ , tj. 1,07%.

#### *Závěr*

- Opakovatelnost metody detekce LChV-1 při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 0,59 %.
- Opakovatelnost metody detekce LChV-2 při limitním ředění je stanovena jako průměrný variační koeficient s hodnotou 1,07 %.

### **3.4.4 Stanovení reprodukovatelnosti**

#### *Metodika*

Reprodukovatelnost byla určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo u detekce LChV-1 stanoveno na 500 kopií/reakci pomocí syntetické pozitivní kontroly. Pro LChV-2 byla reprodukovatelnost určena při limitním ředění syntetického standardu, které bylo stanoveno na 650 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.

#### *Očekávaná hodnota parametru*

Variační koeficient pro limitní ředění  $\leq 10\%$ .

#### *Výsledky*

LChV-1: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0087, tj. 0,87%.

LChV-2: Míra shody mezi hodnotami z jednotlivých sérií provedených různými pracovníky v různých PCR bězích měřená variačním koeficientem je 0,0171, tj. 1,71%.

## Závěr

- Reprodukovatelnost metody detekce LChV-1 při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 0,87 %.
- Reprodukovatelnost metody detekce LChV-2 při limitním ředění je stanovena jako variační koeficient s hodnotou 1,71 %.

### 3.4.5 Zjednodušený validační protokol

\*\*\*\*\*

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Název zkušebního postupu:        | Detekce virů LChV-1 a LChV-2 metodou real-time PCR                                   |
| Identifikace zkušebního postupu: | SOP_LMB_02; PP_LMB_12  |
| Předmět zkoušky:                 | Rostlinný materiál   |
| Poznámky:                        | Multiplexní reakce; Rotor-Gene Q<br>LChV-1 v zeleném kanálu, LChV-2 ve žlutém kanálu |

| Výkonnostní parametry         | Hodnota, komentář  |
|-------------------------------|--|
| Analytická specifita LChV-1   | 100%   |
| Analytická specifita LChV-2   | 100%   |
| Analytická senzitivita LChV-1 | 500 kopií/reakci   |
| Analytická senzitivita LChV-2 | 650 kopií/reakci   |
| Opakovatelnost LChV-1         | Průměrný variační koeficient 0,59%<br>pro limitní ředění |
| Opakovatelnost LChV-2         | Průměrný variační koeficient 1,07%<br>pro limitní ředění |
| Reprodukovatelnost LChV-1     | Variační koeficient 0,87% pro limitní<br>ředění          |
| Reprodukovatelnost LChV-2     | Variační koeficient 1,71% pro limitní<br>ředění          |

Na základě analýzy reprodukovatelnosti byly hranice semi-quantitativního vyhodnocování pro **LChV-1** stanoveny následovně:

- +++ [silně pozitivní] pro  $Ct \leq 19,99$  (cca > 400 000 kopií/reakci)
- ++ [pozitivní] pro  $Ct$  20 až 26,50
- + [slabě pozitivní] pro  $Ct$  26,51 až 29,59 (cca 4 000–500 kopií/reakci)
- PP [potenciálně pozitivní] pro  $Ct$  29,6–35,99
- [negativní] pro  $Ct \geq 36$

Na základě analýzy reprodukovatelnosti byly hranice semi-quantitativního vyhodnocování pro **LChV-2** stanoveny následovně:

- +++ [silně pozitivní] pro  $Ct \leq 20,50$  (cca > 400 000 kopií/reakci)
- ++ [pozitivní] pro  $Ct$  20,51 až 27,29
- + [slabě pozitivní] pro  $Ct$  27,30 až 30,35 (cca 4 000–500 kopií/reakci)

- PP [potenciálně pozitivní] pro Ct 30,36–35,99  
– [negativní] pro Ct ≥ 36

Vypracoval dne: 28. 4. 2017 RNDr. Radek Čmejla, Ph.D., garant oboru  
\*\*\*\*\*Konec validačního protokolu\*\*\*\*\*

#### 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Pro detekci virů způsobujících maloplost třešně v hostiteli se nejčastěji používají metody založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR). Existují i jiné metody, např. metoda vizuálního monitoringu symptomů, která je však z důvodů latentních a nezřetelných příznaků infekce nedostačující. Biologické testování využívající princip dvojitého očkování je metoda časově náročná a zdlouhavá, i když poměrně spolehlivá, nelze však s její pomocí určit konkrétní typ viru. Později se navíc ukázalo, že tato metoda testování je spolehlivá pouze pro LChV-2, protože při testování izolátů LChV-1 se příznaky projevovaly velice slabě nebo vůbec (Schlesingerová 2012). Imunoenzymatické metody typu ELISA nebyly zatím pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 vyvinuty.

Klasickou RT-PCR pro detekci virů LChV-1, LChV-2 se zabývali např. Rott a Jelkmann (2001), Jelkmann *et al.* (2008) a Schröder a Petruschke (2010). Bajet *et al.* (2008) se zaměřuje na detekci viru LChV-1, jehož kompletní sekvence a návrh detekčního systému byly zveřejněny již v roce 1997 (Jelkmann *et al.* 1997, resp. Vitushkina *et al.* 1997). Detekce viru LChV-2 vychází z jeho částečné charakterizace v roce 2001 (Rott a Jelkmann 2001). Další modifikací PCR metod pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 je nested RT-PCR, kterou ve své práci uvádí Katsiani *et al.* (2014) nebo real-time PCR založená na použití interkalačního barviva (Jelkmann *et al.* 2008; Zong *et al.* 2015). Identita viru LChV-1 byla v nedávné době ověřena také pomocí next generation sequencing (Candresse *et al.* 2013, Marais *et al.* 2016).

Nevýhodou výše zmíněných přístupů je obecně nízká specifita, neboť publikované metody nejsou dle výsledků srovnávací analýzy sekvencí z dostupných databází schopny zachytit všechny izoláty příslušných virů. Další nevýhodou je nutnost separátní PCR reakce pro každý virus zvlášť, což analýzu prodlužuje a prodražuje. Tyto nevýhody odstraňuje předložená metodika, která je založená na využití různých značených sond pro současnou kvalitativní/kvantitativní real-time PCR detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu.

#### 5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu může být využita v celé řadě aplikací, např.:

- Rutinní diagnostika virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu
- Testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu
- Monitoring přítomnosti virů LChV-1 a LChV-2 na daném území
- Studium šíření virů LChV-1 a LChV-2
- Základní výzkum biologie virů LChV-1 a LChV-2

Validovaná metodika real-time PCR detekce virů LChV-1 a LChV-2 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)
- Referenční laboratoře
- Laboratoře v akademické sféře a dalších výzkumných institucích

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Validovaná metodika pro diagnostiku virů způsobujících maloplodost třešně LChV-1 a LChV-2 metodou real-time PCR je optimalizována pro současnou detekci obou virů v jedné PCR reakci. Metodika tedy zrychluje, zpřesňuje a zlevňuje diagnostiku onemocnění maloplodost třešně, které je způsobeno virem LChV-1 a LChV-2. 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 testů 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 laboratořích, 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 5 000 Kč), případně celého kitu. Laboratoře, které by uvažovaly o kompletním zavedení metodiky bez předchozích zkušeností a přístrojového vybavení, 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 | 5 000 Kč     |
| PCR reagentie         | 1 000 reakcí | 10 000 Kč    |
| Real-time PCR cyklyer | 1 ks         | > 800 000 Kč |

Další spotřební materiál pro laboratoře molekulární biologie

## 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

BAJET, N.B., UNRUH, T.R., DRUFFEL, K.L. a EASTWELL, K.C. Occurrence of two little cherry viruses in sweet cherry in Washington State. *Plant Disease*. 2008, 92(2): 234–238. DOI: 10.1094/PDIS-92-2-0234

BÜTTNER, C., JELKMANN, W., a GRAF, H. Zum Auftreten der Kleinfürchtigkeit der Süßkirsche (little cherry disease) in deutschen Erwerbsobstanlagen. *Erwerbsobstbau*. 1994, 1: 10–13.

CANDRESSE, T., MARAIS, A., FAURE, C., a GENTIT, P. Association of Little cherry virus 1 (LChV1) with the Shirofugen stunt disease and characterization of the genome of a divergent LChV1 isolate. *Phytopathology*. 2013, 103(3): 293–298. DOI: 10.1094/PHYTO-10-12-0275-R

HARMS, M., BUTTNER, C., GRAF, H., a SCHICKEDANZ, F. Untersuchungen zur Ausbreitung der virosen Kleinfürchtigkeit der Süsskirsche (Little cherry disease) in norddeutschen Erwerbsobstanlagen. *Erwerbsobstbau*. 1996, 38: 2–7.

PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPP0 Bulletin*. 2014, 44: 117–147. DOI:10.1111/epp.12118

JELKMANN, W., FECHTNER, B. a AGRANOVSKY, A.A. Complete genome structure and phylogenetic analysis of little cherry virus, a mealybug-transmissible closterovirus. *Journal of General Virology*. 1997, 78(8): 2067–2071. DOI: 10.1099/0022-1317-78-8-2067

JELKMANN, W., LEIBLE, S. a ROTT, M. Little Cherry Closteroviruses-1 and -2, their genetic variability and detection by real-time-PCR. *Acta Horticulturae*. 2008, (781): 321–330. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.781.47

KATSIANI, A. T., MALIOGKA, V.I., AMOUTZIAS, G. D., EFTHIMIOU, K.E., a KATIS, N.I. Insights into the genetic diversity and evolution of Little cherry virus 1. *Plant Pathology*. 2014, 64: 817–824. DOI:10.1111/ppa.12309

LUDVÍKOVÁ, H., SUCHÁ, J., KŘIVOHLÁVKOVÁ, L. a JELKMANN, W. Diagnostics of Little (Cherry) Disease (LChD). *Vědecké Práce Ovocnářské*. 2011, (22): 129–133. ISSN 0231-6900.

MARAIS, A., FAURE, C., THEIL, S., SVANELLA-DUMAS, L., BRANS, Y., MAURICE, I., BLIN, V. a CANDRESSE, T. First Report of Little cherry virus 1 on Plum in France. *Plant Disease*. 2016, 100(12): 2544. DOI: 10.1094/PDIS-06-16-0915-PDN

MATIC, S., MYRTA, A. a MINAFRA, A. First report of little cherry virus 1 in cherry, plum, almond and peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*. 2007, 89(Supplement 3): 69–76.

RAINE, J., MCMULLEN, R.D. a FORBES, A.R. Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1986, 8(1): 6–11. DOI: 10.1080/07060668609501834

ROTT, M.E., a JELKMANN, W. Detection and partial characterization of a second closterovirus associated with little cherry disease, Little cherry virus-2. *Phytopathology*. 2001, 91(3), 261–267. DOI: 10.1094/PHYTO.2001.91.3.261

SCHLESINGEROVÁ, G. Maloplodost třešně [online]. Ministerstvo zemědělství, 2012. [cit. 26.9.2018]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/177973/Listovka\\_maloplodost\\_tresne.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/177973/Listovka_maloplodost_tresne.pdf)

SCHRÖDER, M. a PETRUSCHKE, M. Occurrence of Little cherry virus-1 on *Prunus* species in the State of Baden-Württemberg, Germany. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010, 427: 268.

VITUSHKINA, M., FECHTNER, B., AGRANOVSKY, A. a JELKMANN, W. Development of an RT-PCR for the detection of little cherry virus and characterization of some isolates occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 1997, 103(9): 803–808. ISSN: 0929-1873.

WELSH, M. F. a CHENEY P.W. Little cherry. In GILMER R. M., J. D. MOORE and G. NYLAND (ed.). *Virus Diseases and Noninfectious Disorders of Stone Fruits in North America*. Washington, D. C. (USA) : U. S. Government Printing Office, 1976, 231–237.

ZONG, X., WANG, W., WEI, H., WANG, J., YAN, X., HAMMOND, R.W. a LIU, Q. Incidence of sweet cherry viruses in Shandong province, China and a case study on multiple infection with five viruses. *Journal of Plant Pathology*. 2015, 97: 61–68. ISSN: 1125-4653.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Užitečný vzor číslo 32 045: Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu
- Patent, číslo přihlášky PV 2017-162: Sada pro detekci virů LChV-1 a LChV-2 v biologickém materiálu (v řízení na Úřadu průmyslového vlastnictví)



Poznámky:



Poznámky:

**Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1)  
a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu**

Autoři: Radek Čmejla, Lucie Valentová

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

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Repopaint s.r.o.

Počet kopií: 20

**ISBN 978-80-87030-57-8**



