

## VERIFIKACIJA METODE PCR ZA DOLOČANJE GLIVE *Verticillium nonalfalfae* IN *Verticillium dahliae*

Tanja GUČEK<sup>1</sup> in Sebastjan RADIŠEK<sup>2</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific paper

Prispelo / received: 15. 10 2021

Sprejeto / accepted: 28. 11 2021

### Izvleček

Z namenom pridobitve akreditacije za diagnostično metodo »PCR za določanje glive *Verticillium nonalfalfae* in *Verticillium dahliae*« (MDL 02) smo izvedli njeno verifikacijsko preskušanje. Metoda je del EPPO standarda PM7/78 (2) »*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*«, zato je že bila delno validirana. V skladu z EPPO smernicami za validacijo metod PM 7/98 (4) smo analizirali rezultate predhodnih raziskav, izvedli oceno tveganja in pripravili plan za verifikacijo metode. V sklopu verifikacije metode smo analizirali analitično občutljivost, ponovljivost, obnovljivost ter vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate. Pri analitični občutljivosti smo mejo zaznavnosti (LOD) določili pri 1 pg in mejo določljivosti (LOQ) pri 0,1 ng. Ponovljivost in obnovljivost metode smo analizirali s kombinacijo primerjave 5 analitikov, 2 kompletov DNA polimeraz in 2 PCR inštrumentov na setu 14 vzorcev. Skupno smo analizirali 338 vzorcev in jih določili z 98,8 % natančnostjo. Dodatno smo analizirali 96 vzorcev izoliranih s CTAB reagentom in potrdili negativen vpliv izolacije na rezultate v primeru večjih odstopanj od protokola. Z raziskavo smo potrdili, da je verifikacija oziroma validacija metod ključna za zagotavljanje zanesljivih rezultatov.

**Ključne besede:** verticilijska uvelost hmelja, verifikacija, analitična občutljivost, ponovljivost, obnovljivost, CTAB reagent

## VERIFICATION OF PCR FOR DETECTION OF FUNGI *Verticillium nonalfalfae* AND *Verticillium dahliae*

### Abstract

In order to apply for accreditation of in-house method "PCR for detection of *Verticillium nonalfalfae* and *Verticillium dahliae*" (MDL 02) verification of method was performed. The method is part of EPPO standard PM 7/78 (2) "*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*", so it has been partially validated. In accordance with EPPO guidelines for the validation of methods PM 7/98 (4) we

---

<sup>1</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

<sup>2</sup> Dr., isti naslov, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

analyzed the results of previous research, performed a risk analysis and prepared a verification plan for the method. In the scope of verification we analyzed the analytical sensitivity, repeatability, reproducibility and the influence of nucleic acid isolation on the results. In the case of analytical sensitivity, the detection limit (LOD) was determined at 1 pg and the limit of quantification (LOQ) at 0.1 ng. The repeatability and reproducibility of the method were analyzed by comparing 5 operators, 2 kits and 2 PCR instruments on a set of 14 samples. A total of 338 samples were analyzed and determined with 98.8 % accuracy. Additional 95 samples isolated with CTAB reagent were analyzed and the negative impact of isolation on the results in the case of major deviations from protocol was confirmed. Our research confirmed that verification or validation of methods is crucial to obtain reliable results.

**Key words:** hop verticillium wilt disease, verification, analytical sensitivity, repeatability, reproducibility, CTAB reagent

## 1 UVOD

Za validacijo in verifikacijo metod, ki so v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 so na voljo EPPO smernice PM 7/98 (4) »Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity« (EPPO, 2019). Pri vsaki diagnostični metodi za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je potrebno določiti analitično občutljivost, specifičnost (vključenost in ekskluzivnost), selektivnost, ponovljivost in obnovljivost. Del obnovljivosti je lahko tudi analiza robustnosti, ki kaže na stopnjo neobčutljivosti metode na odstopanja v izvedbi, okoliščinah in kakovosti materialov (starost in stanje vzorca, različni reagenti,...). Ločeno določanje robustnosti pogosto ni potrebno, ker je to že del razvoja metode (EPPO, 2019).

V postopku akreditacije izbrane metode je potrebno izvesti oceno tveganja in identificirati katera merila uspešnosti morajo biti ocenjena in v kakšnem obsegu. V sklopu ocene tveganja se pregleda namen uporabe metode (glede na potrebe naročnika), določi kriterije za uspešno izvedbo, pregleda podatke o validaciji in drugih predhodnih rezultatih. V primeru, da podatkov o izvedbi validacije ni, se izvede celotna validacija. Ko podatki niso zadostni se izvede delna validacija oziroma verifikacija. V primeru, da je uporabljena metoda predhodno že ustrezno validirana pa se lahko izvede samo verifikacija (EPPO, 2019).

Verifikacija zagotavlja objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo validirane metode v skladu z določenimi merili uspešnosti. Verifikacijo se lahko izvede z uspešnim sodelovanjem v med-laboratorijskih primerjavah, če so pri tem izpolnjene zahteve iz preglednice 1. Selektivnosti navadno v okviru verifikacije ni potrebno določati, razen če gre za serološke metode (EPPO, 2019).

V primeru, da je metoda predhodno že validirana se pripravi plan verifikacije pri katerem je potrebno upoštevati izid ocene tveganja. Nato se izvede verifikacijo glede na posamezno merilo uspešnosti v skladu z navodili v preglednici 1. Odstopanja od validirane metode so dovoljena v primeru proizvajalcev reagentov in uporabljene opreme, razen ko je le-to točno določeno (EPPO, 2019).

**Preglednica 1:** Navodila za izvedbo verifikacije metode (EPPO, 2019).

<b>Merila uspešnosti</b>	<b>Metoda verifikacije</b>
Analitična občutljivost	Analiziraj vsaj osem vzorcev pri določeni meji zaznavnosti (LOD).
Analitična specifičnost (vključenost in ekskluzivnost)	Izberi nekaj glavnih tarč (različne izolate) za določitev vključenosti in ne-tarč za določitev ekskluzivnost. Analiza mora biti izvedena na optimalni/srednji koncentraciji tarče.
Ponovljivost	Izvedi vsaj tri sočasne teste na istih vzorcih z nizko koncentracijo tarče.
Obnovljivost	Enako kot ponovljivost, samo da v različnih časovnih okvirih, če mogoče z različnimi analitiki in če je to pomembno z različno opremo.

Po izvedbi verifikacije se oceni ali laboratorij ustreza kriterijem določenim v validirani metodi. Rezultate se poda v verifikacijskem poročilu in določi ustreznost metode. V primeru, da verifikacija metode ni uspešna se odpravi napake in ponovno izvede verifikacijo oziroma validacijo. Če rezultati tudi po opravljenih modifikacijah metode niso ustrezni in v skladu z določenimi kriteriji, laboratorij ne more izvajati metode glede na uveljavljena merila uspešnosti (EPPO, 2019).

V Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) na IHPS je v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 diagnostična metoda MDL 02, ki omogoča molekularno identifikacijo gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* na hmelju in ostalih gostiteljskih rastlinah. Metoda MDL 02 omogoča na nivoju izolatov *V. nonalfalfae* iz hmelja dodatno določitev letalnega patotipa (PV), ki povzroča bolezen letalno obliko verticilijske uvelosti hmelja. Metoda je del EPPO standarda PM7/78 (2) »*Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*«, zato je predhodno že bila delno validirana (EPPO, 2020).

Po pregledu dosedanjih raziskav molekularne identifikacije gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* smo zbrali podatke o validaciji metode. V okviru analitične specifičnosti so bili v predhodnih raziskavah testirani specifični začetni oligonukleotidi (ZO) (preglednica 2). Analitično specifičnost je bila za *Verticillium nonalfalfae* testirana na 9 izolatih (Inderbitzin in sod., 2013) in dodatno na 50

izolatih Genske banke na IHPS (Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019) v okviru vključenosti (inclusivity). Ekskluzivnost (exclusivity) metode je bila testirana na izolatih drugih gliv (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019). Za *Verticillium dahliae* je bila vključenost testirana na 6 izolatih (Inderbitzin in sod., 2013) in dodatno na 12 izolatih iz Genske banke na IHPS (Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019). Ekskluzivnost je bila testirana na izolatih drugih gliv (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019).

Specifičnost je bila testirana tudi za ZO, ki določajo letalni patotip (4CHR4-F/R), v okviru vključenosti je bilo testirano 50 izolatov *V. nonalfalfae* iz hmelja, od tega je bilo 33 letalnih izolatov in 17 blagih. Ekskluzivnost je bila testirana na drugih gostiteljih *V. nonalfalfae* in netarčnih vrstah rodu *Verticillium*. Potrjeni so bili nespecifični signali pri *V. dahliae*, zato je potrebno predhodno določiti prisotnost *V. nonalfalfae* (NoF/NuR) in naknadno letalni patotip (EPPO, 2020).

Analitična občutljivost je bila analizirana v okviru raziskave Inderbitzin in sod., 2013. V raziskavi je bila določena meja zaznavnosti (LOD) 1 pg DNA na reakcijo. Analitična selektivnost je bila testirana v okviru specifičnosti, ko so bili testirani izolati iz različnih sort hmelja in različnih gostiteljev (hmelj, paprika, krizanteme, kumare, vinska trta) (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019).

V pregledani literaturi podatkov o ponovljivosti in obnovljivosti metode nismo zasledili, zato je bil namen naše analize, da jo sami izvedemo. Prav tako smo se odločili, da dodatno izvedemo analitično občutljivost, ki se lahko zaradi vpliva posameznih uporabljenih materialov razlikuje od določene. Hkrati smo želeli določiti tudi vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate, ker jo izvajajmo z lastno razvito CTAB metodo. Z izvedbo delne validacije oziroma verifikacije metode MDL 02 je bil naš namen, da zagotovimo objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo akreditirane metode.

## 2 MATERIAL IN METODE

Glede na rezultate predhodnih raziskav (Inderbitzin in sod., 2013; Jeseničnik, 2014; Grgič, 2019) in EPPO standarda PM 7/78 (2) (EPPO, 2020) smo izvedli oceno tveganja in pripravili plan za verifikacijo metode. V okviru verifikacije smo izvedli analizo analitične občutljivosti, ponovljivosti, obnovljivosti ter vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate.

Metoda MDL 02 obsega izolacijo DNA iz namnožene glivne kulture z uporabo CTAB metode, ki ji sledi PCR analiza z ZO, ki so specifični za določitev vrste ali patotipa. Namnožene PCR produkte analiziramo z agarozno gelsko elektroforezo.

## 2.1 Izolati gliv

Izolati uporabljeni v raziskavi so del Referenčne zbirke škodljivih organizmov IHPS. Za *V. nonalfalfae* smo uporabili izolat T2 (šifra IHPS referenčne zbirke - 1VD (letalni patotip)), izolat T6 (šifra IHPS referenčne zbirke - 3VD (letalni patotip)) in izolat ZUPANC (šifra IHPS referenčne zbirke - 33VD (blagi patotip)). Za *V. dahliae* smo uporabili izolat PAP2008 (šifra IHPS referenčne zbirke - 45VD) in izolat krizantem (šifra IHPS referenčne zbirke - 188VD). Za negativno kontrolo izolacije (gliva, ki ni iz rodu *Verticillium*) smo uporabili izolat *Fusarium equiseti* (šifra IHPS referenčne zbirke - 33 F).

## 2.2 Izolacija nukleinskih kislin

Vzorec nam je predstavljala kultura glive na trdnem gojišču. Za DNA izolacijo smo s skalpelom postrgali približno 1 cm<sup>2</sup> kulture, ki smo jo prenesli v terilnico. V skladu z modificiranim protokolom CTAB izolacije (Kump in Javornik, 1996) smo dodali 2 mL CTAB pufra, ki je ogret na temperaturo 68 °C ter 0,5 g kremenčevega peska (očiščen karborundum 0,1–0,5 mm), ki ob trenju dodatno pospeši homogenizacijo tkiva. Mešanico smo trli toliko časa, da smo dobili tekočo homogenizirano zmes. Iz terilnice smo nato odpipetirali dva pod-vzorca volumna 700 µL v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Te smo nato 1 h inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 68 °C. Izolacijo smo nato nadaljevali v skladu s protokolom CTAB izolacije (Kump in Javornik, 1996).

Z namenom testiranja vpliva izolacije nukleinskih kislin na rezultat metode MDL 02 smo primerjali več različnih postopkov CTAB izolacije. Namen primerjave različnih postopkov je bil, da ugotovimo, če uporabljamo optimalno kombinacijo in kakšna odstopanja od standardnega postopka so še sprejemljiva. Po izolaciji smo izvedli PCR s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R).

Posamezni postopki (standardni postopek) so se razlikovali glede na:

1. uporabo različnih reagentov (samostojna priprava/ komercialni),
2. merjenje vzorca (1 cm<sup>2</sup>/ 2 cm<sup>2</sup>/brez merjenja),
3. tehtanje kremenčevega peska (0,5 g/ 1 g),
4. čas in temperatura inkubacije vzorcev v vodni kopeli (1 h pri 60 °C/ 1,5 h pri 60 °C/ 1 h pri 68 °C/ 1,5 h pri 68 °C/ 1 h pri 72 °C/ 1,5 h pri 72 °C),
5. čas precipitacije pri -20 °C (1 h/ 2h/ preko noči).

Pri vsakem od postopkov smo analizirali 6 vzorcev:

- 2 vzorca glive *Verticillium nonalfalfae* (1 VD, 33 VD)
- 2 vzorca glive *Verticillium dahliae* (45 VD, 188 VD)
- 1 negativen vzorec glive (33 F)
- NIC= negativna kontrola izolacije (samo CTAB pufer)

## **2.3 Verifikacija metode**

### **2.3.1 Analitična občutljivost**

Analitično občutljivost molekularne identifikacije gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* s specifičnimi ZO je bila analizirana v okviru raziskave Inderbitzin in sod., 2013. V raziskavi je bila določena meja zaznavnosti (LOD) 1 pg DNA na reakcijo.

Dodatno smo opravili analize serij redčitev (5-kratna do  $10^{-7}$ ) DNA vzorcev izoliranih iz različnih izolatov gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae*. Za vsak ZO smo pripravili serijo redčitev dveh vzorcev, skupno 16 vzorcev (NoF/NuR: 33 VD, 1 VD; ITS1/4: 1 VD, 45 VD; Df/r: 45 VD, 188 VD; 4CHR4-F/R: 1 VD, 3 VD). V okviru analize občutljivosti smo z ZO za interno kontrolo (ITS1/4) primerjali tudi dva različna kompleta reagentov DNA polimeraz (Promega in NEB), da bi ugotovili ali je trenutno uveljavljen postopek najbolj optimalen in ali je na voljo kakšna ustrezna alternativa.

### **2.3.2 Ponovljivost in obnovljivost**

Ponovljivost in obnovljivost metode MDL 02 smo analizirali s primerjavo 5 analitikov, 2 kompletov DNA polimeraz (Promega, NEB) in 2 PCR inštrumentov (Eppendorf, Roche). Analizo vzorcev so različni analitiki izvedli na istem setu 14 vzorcev, od izolacije DNA do PCR analize s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R) (preglednica 2). Vzorce smo analizirali pri optimalni koncentraciji in pri LOQ.

## **2.4 PCR reakcija**

### **2.4.1 Začetni oligonukleotidi (ZO)**

PCR analizo smo izvedli s pari ZO, ki so specifični za posamezno vrsto oz. v primeru *V. nonalfalfae* za letalni patotip (preglednica 2). Vsak vzorec smo najprej namnožili z ZO za interno kontrolo (ITS1/4), ki služi za preverjanje uspešnosti DNA izolacije (preglednica 2), nato pa z ZO za glive (EPPO, 2020).

**Preglednica 2:** Zaporedja ZO za določanje vrste in patotipov gliv *Verticillium nonalfalfae* in *V. dahliae* (EPPO, 2020).

Oznaka ZO	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Temperatura prileganja [°C]	Par identificira vrsto/patotip	Dolžina PCR produkta (bp)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55 °C	Interna kontrola	650
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
NoF	CCTCGAAAAATCCACCAGCTCTA	64 °C	<i>V. nonalfalfae</i>	1310
NoNuR	GTGGTTGAGATCCTCACGCTTC			
4CHR4-F	CGAGGGCCCTTATACATCAA	64 °C	<i>V. nonalfalfae</i> (letalni patotip)	585
4CHR4-R	CTAATGAAGGCGGTG GGTA			
Df	CCGGTCCATCAGTCTCTCTG	67 °C	<i>V. dahliae</i>	490
Dr	CTGTTGCCGCTTCACTCG			

## 2.4.2 PCR reakcija

Verifikacijo smo izvedli na inštrumentu Mastercycler nexus GSX 1 (Eppendorf, Nemčija) in LightCycler96 (Roche, Švica) z uporabo kompleta DNA polimeraz GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega, ZDA) in OneTaq DNA Polymerase (NEB, ZDA). Reakcijska mešanica in PCR program za določanje vrste in patotipov gliv *V. nonalfalfae* in *V. dahliae* z različnimi pari ZO je bil kot predhodno opisano v EPPO (2020). PCR produkte smo analizirali na 1,5 % agaroznem gelu v 1x TBE pufu obarvanem z etidijevim bromidom (0,5 µg/mL). Pogoji med elektroforezo so bili naslednji: 170 V in 180 mA, 60 min. Po končani elektroforezi smo agarozni gel analizirali na UV transiluminatorju sistema za slikanje gelov (Syngene, ZDA).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Izolacija nukleinskih kislin

V primerjavo različnih načinov izvedbe CTAB izolacije smo vključili velika odstopanja od standardnega postopka (2-kratna količina vzorca in kremenčevega peska, ± 8/4 °C nižje/ višje temperature inkubacije,...), ki jih pri rutinskih analizah ne izvajamo. Na ta način smo želeli dobiti širšo sliko kako lahko skrajne spremembe postopka vplivajo na rezultate in kakšne smiselne limite oziroma odstopanja si lahko postavimo. Pri analizi vpliva izolacije nukleinskih kislin smo analizirali 6 vzorcev (1VD, 33VD, 45VD, 188 VD, 33F, NIC) s petimi različnimi postopki, skupno 96 vzorcev (preglednica 3). Vse vzorce smo analizirali s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R). Pri ZO, ki določajo *V. dahliae* (Df/r) smo zaradi neustreznega začetnega materiala (starost izolata 45 VD) dobili več lažno negativnih rezultatov pri vseh postopkih, zato jih nismo vključili v primerjavo.

Pri različnih ZO (NoF/NuR, ITS1/4, 4CHR4-F/R) so bila med načini izvedbe odstopanja, v več primerih pa smo dobili tudi lažno negativne rezultate (preglednica 3). Pri treh parih ZO smo prisotnost glive določili s 93 % uspešnostjo (268 ustreznih določenih od 288 vseh). Negativen vpliv na rezultat smo potrdili v primeru, da so bila znotraj določenega koraka odstopanja med različnimi načini izvedbe.

Pri uporabi reagentov nismo potrdili vpliva, ker smo pri samostojno pripravljenih in komercialno dostopnih reagentih dobili enak rezultat. Negativen vpliv na končni rezultat smo potrdili (uspešna določitev glive v 89 %) pri povečani začetni količini analizirane glive (2 cm<sup>2</sup>), ker razmerje med količino glive in CTAB reagenta ni bilo ustrezno (preglednica 3). Zaradi prevelike količine micelija glivnih kultur je prišlo do slabše homogenizacije in prekomerne izolacije inhibitorjev PCR reakcije, kar se je izrazilo v obliki lažno negativnih rezultatov.

Prav tako smo negativen vpliv potrdili pri povečani količini (1 g) kremenčevega peska, pri kateri smo porušili ustrezno razmerje za uspešno homogenizacijo tkiva. Glede na le 60 % uspešnost določitve glive v vzorcu je pri CTAB izolaciji ustrezno doziranje kremenčevega peska ključno (preglednica 3).

Negativen vpliv na rezultate je imela tudi nižja temperatura inkubacije vzorcev v vodni kopeli pri 60 °C namesto 68 °C (uspešna določitev glive v 83 %). V tem primeru zaradi prenizke temperature v kombinaciji z 1 h inkubacijo ni prišlo do ustrezne lize celic in ponovno do lažno negativnih rezultatov (preglednica 3). V primeru, da smo čas inkubacije pri 60 °C podaljšali na 1,5 h so bili rezultati ustrezní. Na rezultate povišanje temperature iz 68 °C na 72 °C ni imelo negativnega vpliva, ker DNA ni tako termično nestabilna. Tudi pri primerjavi različnih časov precipitacije pri -20 °C nismo potrdili negativnega vpliva na določitev glive v vzorcu.

S primerjavo različnih načinov izvedbe CTAB izolacije smo tako določili negativen vpliv na rezultate pri 2-kratnem povečanju začetne količine glive (2 cm<sup>2</sup>) in kremenčevega peska (1 g) ter zmanjšani temperaturi inkubacije (1 h pri 60 °C). Rezultati se ujemajo z opažanji predhodnih analiz določanja gliv iz rodu *Verticillium* (Radišek in sod., 2003, 2004, 2006) in več letnim delom na optimizaciji postopka CTAB izolacije. S to analizo smo dobili podatke kateri koraki so v postopku bistveni in v katerih so dovoljena manjša odstopanja. V vsakem primeru je za uspešno izvedbo potrebno upoštevati protokol in vedno poleg vzorcev uporabiti tudi ustrezne kontrole izolacije in kvaliteten referenčni material.



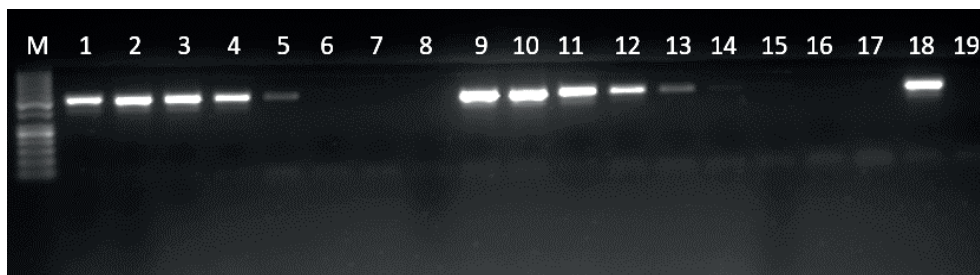
**Preglednica 3:** Vpliv izolacije nukleinskih kislin na rezultate MDL 02.

Postopek	Primerjava CTAB izolacije*	Ustrezni rezultat/vsi vzorci			Vpliv na rezultat
		NoF/NuR	ITS1/4	4CHR4-F/R	
1	Samostojna priprava	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
	Komercialni reagenti	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
2	1 cm <sup>2</sup> kulture	6/6	6/6	5/6	Ni vpliva
	2 cm <sup>2</sup> kulture	5/6	6/6	5/6	Negativen
	Brez tehtanja/merjenja	5/6	6/6	6/6	Ni vpliva
3	0,5 g kremenčevega peska	5/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1 g kremenčevega peska	4/6	2/6	5/6	Negativen
4	1 h pri 60 °C	4/6	6/6	5/6	Negativen
	1,5 h pri 60 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	1 h pri 68 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	1,5 h pri 68 °C	6/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1 h pri 72 °C	6/6	5/6	6/6	Ni vpliva
	1,5 h pri 72 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
5	1 h pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	2 h pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
	Preko noči pri -20 °C	6/6	6/6	6/6	Ni vpliva
<b>Skupaj</b>		<b>89/96</b>	<b>89/96</b>	<b>90/96</b>	

\*s krepkimi črkami so označeni standardni postopki

### 3.2 Analitična občutljivost

Analitična občutljivost metode MDL 02 je bila predhodno že določena (Inderbitzin in sod., 2013), v okviru verifikacije smo zato želeli določiti LOD in LOQ glede na naše reagente, opremo in izolate. Pri ZO NoF/NuR in Df/r smo vzorce zaznali do redčitve  $10^{-4}$  (1 pg) in pri ITS1/4 in 4CHR4-F/R do redčitve  $10^{-3}$  (0,01 ng). Na sliki 1 so podani rezultati za serijo redčitev (5-krat do  $10^{-7}$ ) za dva vzorca pomnožena z ZO Df/r. Iz slike je razvidno padanje intenzitete signala, ki je pri redčitvi  $10^{-4}$  še komaj viden.



**Slika 1:** Analiza občutljivosti za ZO Df/r. Serija redčitev (5-kratna do  $10^{-7}$ ) za dva vzorca (45 VD od 1 do 8; 188 VD od 9 do 16) in kontrole (NIC= 17, PAC= 18, NAC= 19). M= velikostni standard, 50 bp.

Mejo zaznavnosti (LOD, koncentracija pri kateri z več kot 50 % zanesljivostjo zaznamo glivo) smo določili pri 1 pg oziroma 0,01 ng, kar se ujema z rezultati raziskave Inderbitzin in sod. (2013). Po opravljenih analizah vzorcev pri nizkih koncentracijah smo mejo določljivosti (LOQ, koncentracija pri kateri še dobimo pozitiven signal s 100 % zanesljivostjo) metode MDL 02 določili pri 0,1 ng oziroma redčitvi  $10^{-2}$ .

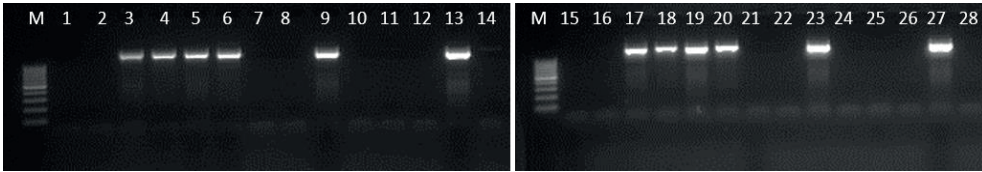
V primeru ZO za interno kontrolo ITS1/4 smo iste vzorce analizirali z dvema kompletoma DNA polimeraz (Promega in NEB) in dobili pri Promegi ustrezne rezultate, pri NEB pa v primeru višjih koncentracij tarče (5-kratna in  $10^{-1}$  redčitev) lažno negativne rezultate. Primerjavo med kompleti DNA polimeraz smo izvedli tudi v okviru ponovljivosti in prav tako dobili lažno negativne rezultate v primeru 5-kratne redčitve, kar je bila najverjetneje posledica inhibicije. Zaradi nezanesljivih rezultatov smo se odločili, da NEB ni primeren za analizo višjih koncentracij in zato preostali del verifikacije izvedli samo s Promega kompletom reagentov.

### 3.3 Ponovljivost in obnovljivost

Rezultati analize ponovljivosti in obnovljivosti metode MDL 02 so bili primerljivi v enakih in različnih časovnih točkah, med analitiki in inštrumenti. V končno analizo rezultatov primerjave med kompleti DNA polimeraz nismo vključili, ker smo pri kompletu NEB potrdili vpliv inhibicije. Vsak analitik je na istem setu 14 vzorcev izvedel CTAB izolacijo in PCR s štirimi pari ZO (NoF/NuR, ITS1/4, Df/r, 4CHR4-F/R). Vzorce smo analizirali pri optimalni koncentraciji (5-kratna redčitev) in pri LOQ (redčitev  $10^{-2}$ ).

Pri treh analitikih smo dobili primerljive rezultate pri vseh analiziranih vzorcih pri vseh štirih parih ZO. Na sliki 2 so prikazani rezultati primerjave med dvema analitikoma za par ZO NoF/NuR, ki identificira vrsto *V. nonalfalae*. Iz slike je

razvidno, da so rezultati pri obeh analitikih enaki, razlika je le v intenziteti signalov, kar je posledica ločene CTAB izolacije.



**Slika 2:** Primerjava seta 14 vzorcev z ZO NoF/NuR med dvema analitikoma (1. analitik: od 1 do 14, 2. analitik: od 15 do 28). Vzorci od 3 do 6 (od 17 do 20) so pozitivni na *V. nonalfalae*, vzorci 1 in 2 (15 in 16) ter 7 in 8 (21 in 22) so *V. dahliae*. Vzorec 9 (23) je PIC 1= 1VD, vzorec 13 (27) je PAC 1= 1VD, preostale kontrole (PIC 2= 45 VD, NIC, PAC 2= 45 VD, NAC) so negativne. M= velikostni standard, 50 bp.

Pri dveh analitikih smo pri treh ZO dobili lažno negativen rezultate pri 4 vzorcih. Ko smo analizo ponovili so bili rezultati ustrezni. Lažno negativne rezultate smo dobili pri 5-kratni redčitvi vzorcev, medtem ko so bili pri  $10^{-2}$  rezultati ustrezni. Prav tako samo za te vzorce dobili ustrezne pozitivne signale pri interni kontroli, zato sklepamo da ni bila težava v CTAB izolaciji ampak v inhibiciji PCR reakcije. Skupno smo s Promega komercialnim kompletom in štirimi pari začetnih oligonukleotidov analizirali 338 vzorcev, od tega smo dobili lažno negativen rezultat pri 4 vzorcih (1 vzorec pri NoF/NuR, 1 vzorec pri Df/r, 2 vzorca pri 4CHR4-F/R), tako da je natančnost pri pogojih ponovljivosti in obnovljivosti 98,8 %.

#### 4 ZAKLJUČEK

Uporabnost metod za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je odvisna od zanesljivosti, občutljivosti, ponovljivosti, hitrosti, zahtevnosti in cene. V primeru, da je metoda akreditirana je poleg omenjenih faktorjev ključna tudi validacija metode. Da lahko zagotovimo zanesljive rezultate je potrebno v laboratoriju vzpostaviti ustrezen sistem kakovosti, delati v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2017 in EPPO smernicami (EPPO, 2019). Pri molekularnih metodah, kot je PCR, je podajanje rezultatov kvalitativno (negativno/pozitivno), zato je zagotavljanje ustreznih rezultatov še pomembnejše. Prisotnost škodljivih organizmov v vzorcu je mogoče zanesljivo določiti le z uporabo ustreznega referenčnega materiala in kontrol. Zelo pomembno pa je tudi vsakoletno sodelovanje v med-laboratorijskih primerjavah.

Z delno validacijo oziroma verifikacijo diagnostične metode za molekularno identifikacijo gliv *V. nonalfalae* in *V. dahliae* smo določili analitično občutljivost

metode (LOD pri 1 pg in LOQ pri 0,1 ng), ponovljivost in obnovljivost (98,8 % natančnost). Prav tako smo analizirali vpliv izolacije nukleinskih kislin na PCR rezultate in potrdili negativen vpliv pri 2-kratnem povečanju začetne količine glive (2 cm<sup>2</sup>) in kremenčevega peska (1 g) ter zmanjšani temperaturi inkubacije (1 h pri 60 °C). S to analizo smo dobili podatke kateri koraki so v postopku bistveni in v katerih so dovoljena manjša odstopanja. Z verifikacijo metode MDL 02 smo zagotovili objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo metode v skladu z določenimi merili uspešnosti.

**Zahvala.** Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Upravi RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Zahvala za odlično tehnično izvedbo verifikacije metode gre osebju v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin na IHPS: Silviji Žgajner, Sabini Gobec, Mariji Grašinar in Maji Dobrajc.

## 5 VIRI

- EPPO. Diagnostics protocol PM 7/78 (2) *Verticillium nonalfalfae* and *V. dahliae*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2020; 50(3): 462-476.
- EPPO. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2019; 49 (3): 530-563.
- Grgič, Z. Razvoj metode z zanko posredovanega izotermalnega pomnoževanja za določanje gliv rodu *Verticillium*. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2019: 140 strani.
- Inderbitzin, P., Davis, R.M., Bostock, R.M., Subbarao, K.V. Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR Assays. PLoS ONE. 2013; 8: e65990. doi:10.1371/journal.pone.0065990.
- Jeseničnik, T. Identifikacija in diferenciacija patogenih gliv rodu *Verticillium* z uporabo novih enostavnih in multipleks PCR označevalcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 2014: 120 strani.
- Kump B. in Javornik B. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. Plant Science. 1996; 114: 149–158.
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Development of pathotype specific SCAR markers for the detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. Plant Disease. 2004; 88: 1115-1122.
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. European Journal of Plant Pathology. 2006; 116: 301-314.
- Radišek, S., Jakše, J., Simončič, A., Javornik, B. Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Disease. 2003; 87: 633-638.