

VALIDACIJA METODE duRT-qPCR ZA DOLOČANJE VIROIDA RAZPOKANOSTI SKORJE AGRUMOV (CBCVd) NA HMELJU Z UPORABO mRNA1192 INTERNE KONTROLE

Tanja GUČEK¹ in Sebastjan RADIŠEK²

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 15. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 5. 12. 2023

Izvleček

Z namenom širjenja obsega akreditacije v Diagnostičnem laboratoriju za varstvo rastlin (DL) na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) za diagnostično metodo »duRT-qPCR za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192« (MDL 12) smo izvedli njeno delno validacijo in analizirali analitično občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost. Analizo smo izvedli z uporabo dveh kompletov reagentov (SensiFast in AgPATH). Pri analitični občutljivosti smo mejo zaznavnosti (LOD) določili pri 5 pg in mejo določljivosti (LOQ) pri 50 pg. V okviru testiranja občutljivosti in selektivnosti smo primerjali različne sorte hmelja, načine okužbe, kombinacije viroidov in dve metodi izolacije nukleinskih kislin in v vseh primerih dobili ustrezne rezultate. Ponovljivost in obnovljivost smo testirali s štirimi analitiki v treh dneh, z dvema kompletoma reagentov, na setu 30 vzorcev. Skupno smo izvedli 12 analiz in analizirali 360 vzorcev in jih določili s 100 % natančnostjo. V primeru SensiFast kompleta smo dobili nižje C_q-vrednosti in ga določili kot optimalno izbiro za duRT-qPCR. Dodatno smo z metodo MDL12 izvedli tudi analizo vzorcev hmelja in RNA vključenih v med-laboratorijsko testiranje in bili 100 % uspešni. Z validacijo smo dokazali, da zagotavljamo zanesljive rezultate in da je metoda primerna za akreditacijo. Članek predstavlja validacijo diagnostične metode, ki prinaša nove ugotovitve na področju izvajanja RT-qPCR tehnike.

Ključne besede: CBCVd, analitična občutljivost, selektivnost, ponovljivost, obnovljivost

VALIDATION OF THE RT-qPCR METHOD FOR THE DETECTION OF CITRUS BARK CRACKING VIROID (CBCVd) ON HOPS INCLUDING mRNA1192 AS INTERNAL CONTROL

Abstract

In order to expand the scope of accreditation in the Diagnostic Laboratory for Plant Protection (DL) at the Slovenian Institute of Hop Research and Brewing (IHPS) for the diagnostic method "duRT-qPCR for detection of CBCVd and internal control

¹ Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: tanja.gucek@ihps.si

² Dr., IHPS, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

mRNA1192" (MDL 12), we performed its partial validation and analysed the analytical sensitivity, selectivity, repeatability and reproducibility. Analyses were performed using two sets of reagents (SensiFast and AgPATH). For analytical sensitivity, the limit of detection (LOD) was set at 5 pg and the limit of quantification (LOQ) at 50 pg RNA. As part of sensitivity and selectivity testing, we compared different hop cultivars, infection methods, viroid combinations and two nucleic acid isolation methods. In all tests we obtained accurate results. Repeatability and reproducibility were tested with four analysts over three days, with two sets of reagents, on set of 30 samples. We performed a total of 12 analyses and tested 360 samples, and determined them with 100 % accuracy. In the case of SensiFast kit, we obtained lower Cq values and chose it as the optimal choice for duRT-qPCR. In addition, with the MDL 12 method, we also performed an analysis of hop samples and RNA included in inter-laboratory testing and were 100 % successful. Through validation, we proved that we provide reliable results and that the method is suitable for accreditation. The paper presents the validation of the diagnostic method, which brings new findings in the field of RT-qPCR method implementation.

Key words: CBCVd, analytical sensitivity, selectivity, repeatability, reproducibility

1 UVOD

Za določanje viroidov so vedno pogosteje v rutinski uporabi metode na osnovi določanja nukleinskih kislin, kot je RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) (Guček in sod., 2023). Metoda RT-qPCR je zelo hitra, občutljiva, z manj možnostmi za kontaminacijo (brez gela), vendar z omejitvami kot so dragi reagenti, oprema in visoka kakovost izolirane RNA (Boonham in sod., 2004). Pomnoževanje produkta vodi do povečanja fluorescence, ki jo spremljamo med samim potekom reakcije, zato končna analiza na gelu ni potrebna. Zaznavanje pomnoženih PCR produktov je mogoče z uporabo nespecifičnih. (npr. SYBR Green I) ali specifičnih metod (npr. TaqMan) (Valasek in Repa, 2005). V primeru TaqMan kemije se med začetna oligonukleotida (ZO) na tarčno zaporedje komplementarno veže tudi sonda označena s fluorescentnima barviloma. Ob podaljševanju verige DNA-polimeraza razgradi sondo, zato se dušilec oddalji od poročevalca in poročevalski signal lahko izmerimo (Valasek in Repa, 2005). Na podoben način specifično zaznavo omogočajo tudi LNA-sonde (ang. Locked nucleic acids), ki omogočajo modifikacije posameznih nukleotidov, pri čemer se poveča talilna temperatura (T_m) sonde in specifičnost hibridizacije (Latorra in sod., 2003).

Metode na osnovi TaqMan kemije so pogosteje v uporabi za določanje viroidov (Boonham in sod., 2004; Botermans in sod., 2013; Luigi in Faggioli, 2011; Monger in sod., 2010; Mumford in sod., 2000) kot SYBR Green barvila (Parisi in sod., 2011; Rizza in sod., 2009). Uporaba več sond in različnih fluoroforov omogoča z RT-qPCR sočasno določanje več viroidov (ang. multiplex RT-qPCR, mRT-qPCR). Tarče za mRT-qPCR so lahko enakih velikosti, kar omogoča analizo večjega števila vzorcev, krajši čas analize in manjšo porabo reagentov, zaradi manjšega števila analiz (Lin in sod., 2013; Mumford in sod., 2000). Osman in sod. (2017) so razvili mRT-qPCR za

določanje HSVd (ang. hop stunt viroid), CEVd (ang. citrus exocortis viroid) in CBCVd (ang. citrus bark cracking viroid) v agrumih. Na hmelju so Seigner in sod. (2020) razvili RT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in interne kontrole na osnovi mRNA mitohondrijskega gena nad5 (ang. NADH dehydrogenase subunit 5) (ang. duplex RT-qPCR, duRT-qPCR). Uporaba interne kontrole je pri RT-qPCR ključna, saj nam poda informacijo o kvaliteti izolirane RNA in kakovosti reagentov, hkrati pa se lahko uporabi tudi za kvantifikacijo tarče (Guček, 2020).

Pred kratkim smo Guček in sod. (2023) razvili RT-qPCR in mRT-qPCR za določanje viroidov HSVd, HLVd (ang. hop latent viroid) in CBCVd v hmelju. V okviru raziskave smo objavili nove začetne oligonukleotide (ZO) za določanje CBCVd in interne kontrole na osnovi endogenov mRNA1192 in mRNA170 odkritih v transkriptomu z viroidi okuženega hmelja (Pokorn, 2017). Plod tega dela je tudi razvita metoda duRT-qPCR za določanje CBCVd z uporabo interne kontrole mRNA1192, ki je v DL v uporabi za raziskave že od leta 2018 (interna oznaka MDL 12), vendar še ni bila v celoti validirana. ZO so bili testirani *in situ* in na 35 vzorcih različnih izolatov viroida CBCVd, HLVd, HSVd in CEVd. Nespecifično pomnoževanje ni bilo potrjeno. Analitična občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost so bile predhodno že testirane za ZO CBCVd (Guček in sod., 2023). Uporabljeni so bili ZO v kombinaciji z drugimi tarčami kot pri duRT-qPCR (MDL 12), kar ima lahko vpliv na rezultate validacije. Z MDL 12 smo v zadnjih petih letih v okviru raziskav prav tako testirali več kot 1000 vzorcev in nespecifičnega pomnoževanja nismo potrdili. Zato smo v okviru ocene tveganja odločili, da izvedemo analitično občutljivost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost.

Za validacijo metod, ki so v postopku akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 so na voljo EPPO smernice PM 7/98 (5) »Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity« (EPPO, 2021). Pri vsaki diagnostični metodi za določanje rastlinskih škodljivih organizmov je potrebno določiti analitično občutljivost, specifičnost, selektivnost, ponovljivost in obnovljivost (dodatno lahko tudi robustnost). V postopku akreditacije izbrane metode je potrebno izvesti oceno tveganja, identificirati katera merila uspešnosti morajo biti ocenjena in v kakšnem obsegu ter določiti obseg validacije (celotna, delna, verifikacija). Po izvedbi validacije se oceni ali laboratorij ustreza kriterijem določenim v validirani metodi. Če zahteve niso dosežene tudi po modifikaciji metode, laboratorij ne sme izvajati metode glede na uveljavljena merila uspešnosti (EPPO, 2021).

Z namenom širitve obsega akreditacije po standardu ISO/IEC 17025:2017 smo izvedli delno validacijo za diagnostično metodo MDL 12 z namenom, da zagotovimo objektivne dokaze, da je DL kompetenten za izvedbo metode MDL 12 in da se metoda v prihodnosti lahko vključi v obseg akreditacije.

2 MATERIAL IN METODE

Pri pregledu dosedanjih raziskav (Guček, 2020; Guček in sod., 2023) smo zbrali podatke o validaciji metode in izvedli oceno tveganja. V okviru analitične specifičnosti so bili predhodno začetni oligonukleotidi (ZO) (preglednica 1) (Guček, 2020; Guček in sod., 2023) že testirani z metodo RT-qPCR in mRT-qPCR. Dodatno smo metodo MDL 12 vključili tudi v med-laboratorijsko testiranje vzorcev hmelja in RNA (skupno 14 vzorcev), organizirano s strani Nacionalnega referenčnega laboratorija iz Češke republike.

2.1 Izolacija nukleinskih kislin

Celokupne nukleinske kisline (TNA) smo iz vzorcev hmelja izolirali z uporabo CTAB reagenta kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017). Uporabili smo 100 mg tkiva (listi hmelja), ki smo ga homogenizirali v terilnicah v prisotnosti CTAB pufra. Vzorce smo raztopili v 50 μ l TE pufra (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) in jih shranili pri -20 °C. Da bi preprečili vpliv inhibitorjev, smo pred analizo izolirano TNA 10-krat redčili v vodi brez RNaz (RNase-free Water, Sigma-Aldrich, ZDA).

V oceno analitične občutljivosti smo vključili tudi vzorce hmelja izolirane s komercialno dostopnim kompletom Spectrum™ Plant Total RNA Isolation Kit (SPT, Sigma-Aldrich, ZDA), po A-protokolu z manjšimi modifikacijami (Jakše in sod., 2015). Vzorce listov hmelja (100 mg) smo zdrobili z uporabo terilnice in priloženega pufra. Izolirano RNA smo shranili pri -70 °C. Pred analizo smo izolirano RNA 10-krat redčili v vodi brez RNaz, da bi preprečili vpliv inhibitorjev.

2.2 duRT-qPCR reakcija

Analizo duRT-qPCR smo izvedli s specifičnimi ZO in sondo za viroid CBCVd in interno kontrolo mRNA1192 (preglednica 1). Za analizo smo pripravili 20 in 40 \times koncentrirano mešanico ZO in sond (20 \times PP mRNA1192, 40 \times PP CBCVd; ang. primer-probe mix). Mešanico smo pripravili iz 100 μ M raztopin smernih (F) (4 μ l/ 8 μ l) in protismernih (R) (4 μ l/ 8 μ l) ZO ter sonde (P) (4 μ l/ 8 μ l), ki smo jim do 100 μ l dodali vodo. Za viroid CBCVd smo uporabili končno koncentracijo 300 nM ZO in za sonde 150 nM. Uporabili smo LNA-sonde z reporterskimi barvili (CBCVd s FAM, mRNA1192 s HEX) in dušilcem BHQ1 (preglednica 1). Za pozitivno kontrolo reakcije duRT-qPCR smo uporabili referenčne vzorce hmelja okuženega s CBCVd in umetno sintetizirano cDNA zaporedje (gBlocks) viroida CBCVd (pristopna številka KM211546; podatkovna zbirka GenBank, NCBI) (PAC) (Guček in sod., 2023), kot negativne kontrole pa zdrave rastline (BVV hmelj) in vodo (NAC, negativna kontrola reakcije). Načrtovana zaporedja ZO, sonde in gBlocks nam je sintetiziralo podjetje IDT (Integrated DNA Technologies, ZDA).

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov in sond za CBCVd in mRNA1192 za MDL 12.

ZO/sonda*	Zaporedje 5'-3'**	Dolžina produkta [bp]	Barvilo	Dušilec	Vir
CBCVdq-F6	GAGGGAACATACCTG AAGAGGGA	88	FAM	BHQ1	Guček in sod., 2023
CBCVdq-R6	GGTGCTGGACGCCAG				
CBCVdq-P1	CCGGG+GAAATC+TCT TCA+GACTC+GTC				
mRNA1192_F1	GGTAGCAACACCCTT CTTCTACTT	96	HEX	BHQ1	Guček in sod., 2023
mRNA1192_R1S	ACCCGACTTTCCTCTA CTTTG				
mRNA1192_PL	CACAAAC+TCAACC+T CTT+AGCACTTG				

*F, smerni ZO; R, protismerni ZO; P, sonda

**modificirani nukleotidi pri LNA-sondah so označeni s + (pred nukleotidom)

Reakcijo duRT-qPCR smo izvedli z dvema kompletoma reagentov SensiFAST™ Probe No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) v kombinaciji z MultiScribe Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, TFS) in AgPath-ID™ One Step RT-PCR (TFS).

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice in programi pomnoževanja duRT-qPCR s kompletom reagentov SensiFast (Bioline) in AgPATH (TFS).

SensiFast		AgPATH	
Komponenta*	V [μL]	Komponenta*	V [μL]
H ₂ O	1,65	H ₂ O	1,35
2x Pufer	5	2x Pufer	5
40 x PP CBCVd	0,5	40 x PP CBCVd	0,5
20x PP mRNA1192	0,75	20x PP mRNA1192	0,75
RT-encim	0,1	RT-encim	0,4
vzorec (TNA/RNA)	2	vzorec (TNA/RNA)	2
Volumen reakcije	10	Volumen reakcije	10

Program pomnoževanja

45 °C 10 min

47 °C 10 min

95 °C 2 min

95 °C 5 min

95 °C 15 s 40 ciklov

95 °C 15 s 40 ciklov

60 °C 30 s

60 °C 30 s

*H₂O, sterilna voda brez nukleaz iz kompleta reagentov, Pufer, mešanica reagentov za qPCR iz kompleta reagentov; PP, mešanica ZO in sonde; RT-encim, encim reverzna transkriptaza iz kompleta reagentov, v primeru uporabe kompleta SensiFAST™ je bil uporabljen encim MultiScribe Reverse Transcriptase

Sestava reakcijske mešanice in program pomnoževanja (preglednica 2) sta bila podana za vsak komplet reagentov ločeno. Vzorce smo analizirali z reakcijami v enem koraku, v dveh tehničnih ponovitvah na ploščah za 96 vzorcev z detekcijskim sistemom LightCycler96 (Roche) in programom LightCycler96 Software 1.1.0.1320.

2.3 Validacija metode

2.3.1 Analitična občutljivost in selektivnost

Določanje analitične občutljivosti in selektivnosti smo izvedli hkrati na istem setu vzorcev z dvema kompletoma reagentov (SensiFast in AgPATH). Analitično občutljivost za duRT-qPCR smo določili iz serije redčitev (10^0 do 10^{-10}) šestih vzorcev okuženih s CBCVd. Za analizo smo izbrali vzorce odvzete v okviru sistematičnih pregledov hmeljišč iz okuženih rastlin (CBCVd in HLVd) sort Aurora, Bobek, Celeia, ter biolistično okuženega hmelja (CBCVd, sorta Celeia), na katerih smo izvedli dva načina izolacije nukleinskih kislin (CTAB in SPT). V analizo smo vključili tudi umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd (gBlocks). Program na detekcijskem sistemu LightCycler96 nam je samodejno izrisal standardno krivuljo serije redčitev, iz katere smo dobili podatke o vrednosti naklona krivulje in o koeficientu linearne regresije (R^2). Učinkovitost pomnoževanja vzorcev v reakciji duRT-qPCR smo določili s pomočjo vrednosti naklona umeritvene krivulje (enačba 1), kjer E pomeni učinkovitost pomnoževanja, ki je 100 %, če je naklon -3,32 in $E = 1$. Iz R^2 smo ugotovili, kako dobro se vrednosti meritev prilegajo krivulji linearne regresije, če je $R^2 = 1$, to pomeni 100 % prileganje (Pfaffl, 2001).

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon}}\right)}$$
$$E(\%) = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon}}\right)} - 1\right) \times 100 \quad (1)$$

Dodatno smo za analizo občutljivosti, glede na rezultate serije redčitev šestih vzorcev, testirali osem vzorcev pri minimalni redčitvi (10^{-4} in 10^{-5}). Pri čemer minimalna redčitev pomeni zadnjo oziroma najmanjšo redčitev, pri kateri še dobimo pozitiven rezultat. V analizo smo vključili vzorce z različnimi kombinacijami viroidov (CBCVd, CBCVd+HLVd, CBCVd+HSVd) in različnim načinom okužbe (naravno, mehansko, biolistično). V primeru kombinacije CBCVd in HSVd smo vzorec pripravili sami iz RNA ekstraktov (razmerje 1:1). Na osnovi serije redčitev in testiranja vzorcev pri minimalni redčitvi smo določili mejo detekcije (LOD), to je bila redčitev oziroma koncentracija, pri kateri smo v več kot 50 % izvedenih poskusov še lahko določili viroid (Boben, 2006). Koncentracijo, pri kateri smo lahko viroide zaznali v 100 % poskusov, smo določili kot mejo kvantifikacije (LOQ, ang. Limit of quantification) glede na rezultate testiranja vzorcev pri minimalni redčitvi. LOD in LOQ smo definirali kot število molekul viroida v vzorcu, ki smo jih izračunali glede na koncentracijo po Olmos in sod. (2005). Na osnovi vseh rezultatov analize občutljivosti smo določili mejno vrednost. Izračunali smo jo iz povprečja zadnje pozitivne Cq-vrednosti (najvišji Cq), ki smo ji dodali 0,5 cikla (Dreo, 2013). Iz mejne vrednosti smo lahko

določili občutljivost reakcij, ki smo jo primerjali z RT-qPCR za določanje viroida CBCVd (rezultati predhodnih raziskav; Guček, 2020).

2.3.2 Ponovljivost in obnovljivost

Za validacijo ponovljivosti in obnovljivosti smo duRT-qPCR analizo izvedli s štirimi analitiki (AN1-4), dvema kompletoma reagentov (SensiFast in AgPATH) v treh dneh. Analizo smo izvedli v treh ločenih dneh z namenom določitve vpliva različnih časovnih točk na ponovljivost testiranja. Za set sedmih vzorcev hmelja (CBCVd, CBCVd+HLVd, BVV) smo izvedli izolacijo nukleinskih kislin s CTAB reagentom za vsakega analitika. Za vsak vzorec smo z duRT-qPCR testirali dve redčitvi vzorcev (10^{-1} in 10^{-3}) in dve tehnični ponovitvi ter skupno analizirali 30 vzorcev na analitika na komplet reagentov.

Za ponovljivost in obnovljivost smo izvedli 12 ločenih analiz v treh dneh s štirimi analitiki (preglednica 3). V okviru ponovljivosti smo vzorce testirali v istem dnevu (1. dan) v dveh ločenih reakcijah, od tega smo na eni plošči vzorce ponovili dvakrat, torej tri analize za en komplet reagentov v enem dnevu z dvema analitikoma in enim inštrumentom. Poleg rezultatov ponovljivosti smo za analizo obnovljivosti testirali vzorce še v dveh ločenih dnevih, skupaj torej dvanajst analiz. Vsi analitiki niso izvedli enakega števila analiz, ker smo se zaradi velikega števila vzorcev omejili na izvedbo iste analize v enem dnevu z enim kompletom reagentov samo z enim analitikom. Analizo smo ovrednotili z izračunom koeficienta variance ($CV [\%] = (SD/Cq) * 100$) iz povprečja standardnih deviacij (SD) in Cq-vrednosti, glede na Osman in sod. (2017).

Preglednica 6: Seznam analitikov (AN1-4) za testiranje ponovljivosti in obnovljivosti glede na dan duRT-qPCR analize in komplet reagentov (SensiFast in AgPATH).

Komplet reagentov/ dan	1. dan*	2. dan	3. dan
SensiFast	AN1, 2x AN2	AN1, AN3	AN4
AgPATH	2x AN1, AN2	AN3, AN4	AN2

*2x, testiranje istega seta vzorcev v 2 ponovitvah

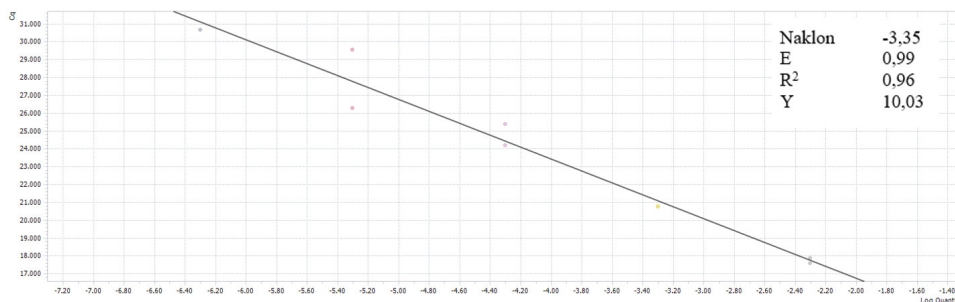
2.4 Med-laboratorijska primerjava

V validacijo metode MDL 12 smo vključili tudi vzorce hmelja in RNA vključene v med-laboratorijsko testiranje organizirano s strani NRL iz Češke republike. V testiranje je bilo vključeno 6 vzorcev liofiliziranega hmelja in 8 vzorcev RNA ekstraktov. V okviru med-laboratorijske primerjave smo v vzorcih določali prisotnost viroida CBCVd z akreditirano metodo RT-PCR (MDL 10), metodo duRT-qPCR (MDL 12) in metodo mRT-qPCR (MDL 13). Iz vzorcev liofiliziranega hmelja smo izvedli izolacijo nukleinskih kislin s CTAB reagentom kot že predhodno opisano (Kump in Javornik, 1996) z manjšimi modifikacijami (Pokorn, 2017) v dveh ponovitvah na vzorec. Za duRT-qPCR analizo smo vse vzorce redčili 10-krat, da bi se izognili inhibiciji qPCR reakcije. Analizo smo izvedli z uporabo SensiFast kompleta reagentov v dveh tehničnih ponovitvah.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Analitična občutljivost in selektivnost

Pri testiranju analitične občutljivosti in selektivnosti smo z obema kompletoma reagentov dobili primerljive rezultate. Učinkovitost pomnoževanja (E) standardne krivulje za gBlocks vzorec je bila za SensiFast komplet reagentov 99 % (slika 1), za AgPATH kit pa 118 %, kar ustreza sprejemljivim vrednostim za sočasno določanje več tarč (80 do 120 %) (preglednica 4). Pri sočasnem določanju več tarč je namreč sprejemljiva nižja/višja E kot pri RT-qPCR (90-110 %) (Broeders in sod., 2014).



Slika 3: Standardna krivulja za duRT-qPCR s kompletom SensiFast za vzorec gBlocks CBCVd. Za krivuljo viroida CBCVd so podani naklon, učinkovitost pomnoževanja (E), napaka, R² in Y.

Pri analizi vzorcev umetno sintetiziranega linearnega zaporedja gBlocks smo pri obeh kompletih reagentov viroid CBCVd določili do redčitve 10⁻⁷. Vse rezultate smo primerjali z RT-qPCR za CBCVd (Guček, 2020) in potrdili, da se občutljivost pri sočasnem določanju dveh tarč (CBCVd, mRNA1192) zmanjša 10-krat (preglednica 4).

Mejo detekcije oziroma zadnjo pozitivno redčitev, pri kateri v več kot 50 % izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal, smo za duRT-qPCR določili iz RNA ekstraktov hmelja okuženega s CBCVd na seriji redčitev petih vzorcev (preglednica 5). Ker je v primeru gBlocks vzorca umetno sintetizirano cDNA zaporedje viroida CBCVd in ne nativne RNA rezultatov, za LOD in LOQ rezultatov gBlocks nismo upoštevali. Glede na serijo redčitev smo dobili pri RNA pozitivne rezultate za vse vzorce do redčitve 10⁻⁵ kar je 5 pg RNA, kar smo določili kot LOD (preglednica 5). Mejo kvantifikacije (LOQ) oziroma zadnjo pozitivno redčitev, pri kateri v 100% izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal, smo določili pri redčitvi 10⁻⁴, kar je 50 pg RNA. Pri testiranju osmih vzorcev pri minimalni redčitvi (10⁻⁵ in 10⁻⁴) smo namreč pozitivne signale v primeru vseh vzorcev dobili samo pri redčitvi 10⁻⁴. Občutljivost vzorcev RNA izolirane iz hmelja smo primerjali tudi z metodo RT-qPCR in enako kot pri gBlocks dobili 10-krat nižjo LOD, medtem ko se LOQ ni spremenila (preglednica 5). LOD smo definirali kot število molekul viroida v vzorcu, ki smo jih izračunali glede na koncentracijo po Olmos in sod. (2005). V primeru mRNA1192 smo z obema kompletoma reagentov določili LOD in LOQ do enake redčitve kot za CBCVd. Na osnovi rezultatov serij

redčitev smo določili mejno vrednost ($Cq^{cut\ off}$). Izračunali smo jo iz povprečja zadnje pozitivne Cq -vrednosti (najvišji Cq), ki smo ji dodali 0,5 cikla (Dreo, 2013) in jo za CBCVd določili pri 31,2 za SensiFast in pri 33,7 za AgPATH komplet reagentov (preglednica 5). Pri AgPATH smo pri vseh vzorcih dobili višje Cq -vrednosti kot pri SensiFast kompletu, zato je posledično višja tudi mejna vrednost.

Preglednica 7: Določitev občutljivosti duRT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in mRNA1192 s SensiFast in AgPATH kompletom reagentov in RT-qPCR za določanje CBCVd in v vzorcih gBlocks CBCVd. Za vzorce je podana redčitev, Cq -vrednost, naklon, R^2 in učinkovitost pomnoževanja standardne krivulje (E).

Reakcija*	Reagent	CBCVd				
		redčitev	Cq	naklon	R^2	E (%)
duRT-qPCR	SensiFast	10^{-7}	30,67	-3,35	0,96	99
duRT-qPCR	AgPATH	10^{-7}	31,49	-2,95	0,96	118
RT-qPCR	SensiFast	10^{-8}	34,44	-3,40	0,98	97

* RT-qPCR, pomnožitev CBCVd s SensiFast kompletom reagentov (Guček, 2020); duRT-qPCR, pomnožitev CBCVd in mRNA1192 s SensiFast kompletom reagentov, duRT-qPCR AgPATH, pomnožitev CBCVd in mRNA1192 z AgPATH kompletom reagentov; vzorec gBlocks, umetno sintetizirano zaporedje cDNA CBCVd viroida; redčitev, zadnja redčitev, pri kateri še dobimo pozitiven signal; Cq , zadnja Cq -vrednost, pri kateri še dobimo pozitiven rezultat; naklon, vrednost naklona standardne krivulje; R^2 , kvadratni koeficient linearne regresije; E, učinkovitost pomnoževanja izražena v odstotkih.

V okviru občutljivosti smo hkrati testirali tudi selektivnost metode in viroid CBCVd uspešno določili ne glede na kombinacijo viroidov (samo CBCVd, CBCVd+HLVd, CBCVd+HSVd), način okužbe (mehansko, naravno, biolistično), sorto (Celeia, Bobek, Aurora) ali način izolacije (CTAB, SPT).

Preglednica 8: Določitev občutljivosti reakcij RT-qPCR za določanje CBCVd in duRT-qPCR za sočasno določanje CBCVd in mRNA1192 v vzorcih RNA izolirane iz hmelja okuženega s CBCVd z metodo CTAB in SPT. Za vzorce je podana LOD, LOQ, koncentracija, število molekul in mejna vrednost ($Cq^{cut\ off}$).

Reakcija*	Reagent	CBCVd				
		LOD	LOQ	Konc.	Št. molekul	$Cq^{cut\ off}$
duRT-qPCR	SensiFast	10^{-5}	10^{-4}	5 pg	$9 \cdot 10^7$	31,2
duRT-qPCR	AgPATH	10^{-5}	10^{-4}	5 pg	$9 \cdot 10^7$	33,7
RT-qPCR	SensiFast	10^{-6}	10^{-6}	0,5 pg	$9 \cdot 10^6$	34,1

*LOD, meja detekcije oziroma zadnja pozitivna redčitev, pri kateri v več kot 50 % izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal; LOQ, meja kvantifikacije oziroma zadnja pozitivna redčitev pri kateri v 100% izvedenih poskusov dobimo pozitiven signal; konc, koncentracija, ki jo še lahko določimo in je enaka LOD; št. molekul, število molekul pri dani koncentraciji; $Cq^{cut\ off}$, mejna vrednost, nad katero so vzorci negativni.

S primerjavo obeh metod izolacij (CTAB, SPT) smo dobili enake LOD in LOQ, kar pomeni, da metoda izolacije RNA na rezultate občutljivosti ni imela vpliva. Glede na to, da smo v analizo vključili različne kombinacije viroidov, smo hkrati izvedli tudi dodatno analizo specifičnosti in ponovno potrdili, da so ZO v kombinaciji z LNA sondami specifični, ker nespecifičnega pomnoževanja pri testiranju občutljivosti nismo zaznali.

3.2 Ponovljivost in obnovljivost

Rezultati analize ponovljivosti in obnovljivosti metode duRT-qPCR so bili primerljivi v enakih in različnih časovnih točkah, med analitiki in kompleti reagentov. Skupno smo izvedli 12 analiz na 360 vzorcih. Pri vseh analizah smo dobili ustrezne rezultate in vse vzorce določili s 100 % natančnostjo. V primeru AgPATH kompleta reagentov smo dobili glede na SensiFast komplet višje Cq-vrednosti pri testiranju istih vzorcev. Prav tako smo v primeru uporabe AgPATH kompleta reagentov v vzorcih zdravega hmelja in negativnih kontrolah pri testiranju ponovljivosti dobili smo Cq-vrednosti okrog 34, kar je nad mejno vrednostjo $Cq^{cut\ off}$, zato smo vzorce potrdili kot negativne.

Vzorci, testirane v okviru ponovljivosti in obnovljivosti, smo analizirali z izračunom koeficienta variance (CV [%]) glede na Osman in sod. (2017). CV vrednosti za SensiFast in AgPATH komplet reagentov so bile zelo primerljive in ustrezne glede na predhodne raziskave (Osman in sod., 2017), zato smo kot primer v preglednici 6 podali samo rezultate za SensiFast. V povprečju smo za vse analitike za SensiFast komplet reagentov dobili CV od 0,39 do 2,34 % (preglednica 6). V primeru AgPATH kompleta reagentov smo dobili primerljive povprečne CV vrednosti od 0,31 do 2,85 % (rezultati niso prikazani). Med CV vrednostmi za viroid CBCVd ali interno kontrolo mRNA1192 ni bilo razlik. Glede na večjo stabilnost interne kontrole v vzorcih smo pričakovali nižje vrednosti CV za mRNA1192. Najmanjša varianca je bila pri ponovitvah istega analitika na isti ploščici v eni reakciji za viroid CBCVd (AN2). Najvišjo varianco smo dobili pri primerjavi vseh analitikov v skupno šestih analizah na posamezen komplet reagentov. Rezultati so pričakovani, saj isti analitik znotraj iste analize naredi manjšo napako kot pa štirje različni analitiki v različnih časovnih točkah, če jih primerjamo med seboj. Prav tako je varianca večja, ker smo primerjali vzorce, ki so jih analitiki sami izolirali, kar pomeni, da je zaradi variabilnosti med izolacijo lahko prišlo do večjih odstopanj pri Cq-vrednostih. Med različnimi časovnimi okvirji analiz izvedenih v treh dneh je bila CV vrednost med 0,86 in 1,34 % za SensiFast komplet in med 0,35 in 0,94 % za AgPATH komplet. Na rezultate ponovljivosti prav tako ni imela vpliva kombinacija viroidov (CBCVd, CBCVd+HLVd) ali redčitev vzorcev. Iz rezultatov nizkih CV vrednosti lahko sklepamo, da je metoda zelo ponovljiva in obnovljiva tako med različnimi analitiki, kot tudi v različnih časovnih okvirjih (preglednica 6).

Preglednica 9: Določitev koeficienta variance CV [%] za ponovljivost in obnovljivost duRT-qPCR reakcije pri uporabi SensiFast kompleta reagentov. Podan je CV izračunan za CBCVd in mRNA1192 med vsemi analitiki, za analitika 1 in 2, prvi dan in drugi dan izvajanja analiz.

Vzorec	CV[%] CBCVd*					CV[%] mRNA1192				
	vs AN	AN1	AN2	1. dan	2. dan	vs AN	AN1	AN2	1. dan	2. dan
CBCVd+	0,91	1,55	0,03	0,57	0,81	1,15	1,27	0,11	1,30	1,09
CBCVd+	1,51	1,41	0,09	0,20	1,54	1,01	0,60	0,39	0,39	0,81
CBCVd+	1,10	0,84	0,21	0,21	0,51	0,65	0,33	0,70	0,60	1,21
CBCVd+	1,17	1,09	0,20	1,16	0,93	0,95	0,57	0,53	0,84	0,22
CBCVd+HLVd	1,91	1,21	0,30	0,87	0,23	2,30	0,07	3,88	2,94	2,81
CBCVd+HLVd	2,37	1,07	0,52	1,20	0,07	1,17	0,36	0,33	0,68	0,62
CBCVd+HLVd	1,76	1,75	0,08	0,23	1,15	1,07	0,62	0,07	1,08	0,29
CBCVd+HLVd	2,45	0,92	0,05	2,12	2,19	0,53	0,62	0,20	0,62	0,25
PIC1= CBCVd	7,67	2,80	0,13	0,55	5,82	4,58	2,43	0,07	0,42	4,94
NIC1= BVV	-	-	-	-	-	3,32	0,07	0,74	0,66	2,01
PAC1= CBCVd	1,60	1,67	1,64	1,34	0,69	2,09	0,82	5,02	3,85	0,74
PAC2=gBlocks CBCVd	3,32	0,88	1,02	0,99	0,18	-	-	-	-	-
NAC1= BVV	-	-	-	-	-	0,63	0,18	0,37	0,33	1,10
POVPREČJE CV [%]	2,34	1,38	0,39	0,86	1,28	1,62	0,66	1,03	1,14	1,34

*CV, koeficient variance; AN, analitik; PIC1, pozitivna kontrola izolacije; NIC1, negativna kontrola izolacije; BVV, vzorec hmelja brez virusov in viroidov; PAC1, pozitivna kontrola amplifikacije; PAC2, pozitivna kontrola amplifikacije umetno sintetizirano zaporedje viroida CBCVd; NAC1= negativna kontrola amplifikacije

3.3 Med-laboratorijska primerjava

Rezultati med-laboratorijske primerjave so podani v preglednici 7. V primeru liofiliziranega rastlinskega tkiva (Plant) smo CBCVd potrdili pri dveh od šestih vzorcev, v primeru RNA ekstraktov (RNA) pa pri dveh od osmih vzorcev. Rezultati so bili primerljivi tako z metodo RT-PCR (MDL 10) in mRT-qPCR (MDL 13). Glede na analizo rezultatov organizatorja med-laboratorijske primerjave smo bili pri določitvi viroida CBCVd 100 % uspešni.

Preglednica 10: Rezultati duRT-qPCR za vzorce med-laboratorijske primerjave. Podane so Cq-vrednosti za CBCVd in mRNA1192. Vzorci, v katerih je CBCVd prisoten, so obarvani sivo.

Vzorec*	Cq CBCVd	Cq mRNA1192	Rezultat CBCVd
2023 Plant 1	-	17,82	ni prisoten
2023 Plant 2	10,54	17,14	prisoten
2023 Plant 3	-	17,71	ni prisoten
2023 Plant 4	10,06	17,43	prisoten
2023 Plant 5	-	17,44	ni prisoten
2023 Plant 6	-	17,36	ni prisoten
2023 RNA1	-	24,97	ni prisoten
2023 RNA2	-	24,72	ni prisoten
2023 RNA3	14,64	25,19	prisoten
2023 RNA4	-	24,84	ni prisoten
2023 RNA 5	-	24,88	ni prisoten
2023 RNA 6	-	24,49	ni prisoten
2023 RNA 7	14,66	25,19	prisoten
2023 RNA 8	-	24,59	ni prisoten
PAC hmelj CBCVd	13,36	15,19	prisoten
PAC gBlocks CBCVd	9,99	-	prisoten
BVV	-	19,34	ni prisoten
NAC	-	-	ni prisoten

*PAC, pozitivna kontrola amplifikacije; BVV, vzorec hmelja brez virusov in viroidov; NAC, negativna kontrola kvantifikacije; Cq-vrednost, povprečje dveh tehničnih ponovitev

4 ZAKLJUČEK

Zagotavljanje zanesljivosti rezultatov je ključnega pomena pri analizi prisotnosti patogenov v rastlinskih vzorcih. Nepravilna določitev rezultata lahko povzroči negativne posledice, ki se lahko kažejo v neizvajanju ustreznih ukrepov in posledično gospodarski škodi. V primeru rastlinske diagnostike je zato ključna uporaba zanesljivih, občutljivih, neselektivnih in ponovljivih metod, ki so hkrati hitre in cenovno ugodne. V primeru vzpostavitve sistema kakovosti v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2017 in pridobitve akreditacije se upoštevajo in sproti odpravljajo vsa tveganja, ki bi lahko povzročila nepravilne rezultate analiz. Pri vpeljavi metode v sistem kakovosti in obseg akreditacije je validacija metode ključnega pomena. Validacija namreč zagotavlja objektivne dokaze, da je laboratorij kompetenten za izvedbo validirane metode v skladu z določenimi merili uspešnosti. Dodatno je za ohranjanje kompetentnosti pomembno tudi sodelovanje v med-laboratorijskih primerjavah.

Z delno validacijo diagnostične metode za sočasno določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 z duRT-qPCR smo določili analitično občutljivost (LOD pri 5 pg in LOQ pri 50 pg RNA), selektivnost (različne sorte, načini okužbe, izolacije, kombinacije viroidov), ponovljivost in obnovljivosti (12 analiz, 360 vzorcev, 100 % natančnost). Pri validaciji smo boljše rezultate, tako pri določanju občutljivosti, kot tudi ponovljivosti in obnovljivosti, dobili pri uporabi SensiFast kompleta reagentov,

ki predstavlja optimalno izbiro za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192. AgPATH komplet reagentov predstavlja alternativo vendar se priporoča uporaba samo v primeru, ko uporaba SensiFast kompleta reagentov res ni mogoča (npr. dobava...). Validacijo smo izvedli z AgPATH kompletom zaradi testiranja najboljše možne alternative, ki pa naj ne bo optimalna izbira.

Metoda MDL 12 glede na trenutno akreditirano metodo RT-PCR za določanje viroida CBCVd (MDL 10), omogoča določanje viroida CBCVd z večjo občutljivostjo, manj možnostmi za kontaminacijo (ni agaroznega gela), hkrati pa omogoča tudi kvantifikacijo. Metoda duRT-qPCR je v DL v uporabi od leta 2018 in se uporablja predvsem za raziskovalne namene v okviru epidemioloških študij CBCVd (analize vode, tal, hmelj in ostale rastline). V tem obdobju je bila MDL 12 vključena tudi v medlaboratorijska testiranja. Kot zadnjega smo izvedli v oktobru 2023 z NRL iz Češke Republike, kjer smo dobili enake rezultate, kot pri uporabi že akreditirane metode RT-PCR in mRT-qPCR in bili 100 % uspešni. Glede na vse izvedene analize in rezultate validacije z duRT-qPCR za določanje viroida CBCVd in interne kontrole mRNA1192 (MDL 12) lahko sklepamo, da je metoda ustrezno validirana in primerna za tudi za uporabo pri analizah uradnih vzorcev, kjer se zahtevajo akreditirane metode.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (podoktorski projekt št. Z4-4557; raziskovalni program P4-0077) in Upravi za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin RS (Program strokovnih nalog zdravstvenega varstva rastlin na IHPS). Zahvala za uspešno tehnično izvedbo gre osebju DL: Mariji Grašinar Ašenberger, Silviji Žgajner in Maji Dobrajc.

5 VIRI

- Boben J. 2006. Kvalitativno in kvantitativno določanje rastlinskih virusov z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 122 str.
- Boonham N., Pérez L.G., Mendez M.S., Peralta E.L., Blockley A., Walsh K., Barker I., Mumford R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116: 139-146
- Botermans M., van de Vossen B.T., Verhoeven J.T., Roenhorst J.W., Hooftman M., Dekter R., Meekes E.T. 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43-50
- Broeders, S., I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens, and D. Morisset. 2014. "Guidelines for Validation of Qualitative Real-Time PCR Methods." *Trends in Food Science and Technology* 37 (2): 115-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>.
- Dreo, T. 2013. "Determination of LOD and Cycle Cut-off in Real-Time PCR Detecting Culturable and Non-Culturable Target Organisms." In *EPPO Workshop on Setting Ct Cut-off Values for Real-Time PCR, 11th-12th November 2013*, 19.
- EPPO. PM 7/98 (5). 2015. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*; 51 (3): 468-498.

- Guček, T. 2020. Biologija viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) in razvoj metod za določanje viroidov v hmelju : doktorska disertacija = Biology of citrus bark cracking viroid (CBCVd) and development of methods for detection of viroids in hop : doctoral dissertation. Ljubljana: [T. Guček], XIV, 139 str., [33] str. pril., ilustr. <https://repositorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=121584>.
- Guček, T., Jakše, J., Radišek, S. 2023. Optimization and validation of singleplex and multiplex RT-qPCR for detection of citrus bark cracking viroid (CBCVd), hop latent viroid (HLVd), and hop stunt viroid (HSVd) in hops (*Humulus lupulus* L.). *Plant Disease*, 10.1094/PDIS-11-22-2606-RE
- Jakše J., Radišek S., Pokorn T., Matoušek J., Javornik B. 2015. Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64: 831-842
- Kump B., Javornik B. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science*, 114: 149-158
- Latorra D., Arar K., Michael Hurley J. 2003. Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Molecular and Cellular Probes*, 17: 253-259
- Lin L., Li R., Bateman M., Mock R., Kinard G. 2013. Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 797-804
- Luigi M., Faggioli F. 2011. Development of quantitative real-time RT-PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 130: 109-116
- Monger W., Tomlinson J., Boonham N., Marn M.V., Plesko I.M., Molinero-Demilly V., Tassus X., Meeke E., Toonen M., Papayiannis L., Perez-Egusquiza Z., Mehle N., Jansen C., Nielsen S.L. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207-210
- Mumford R.A., Walsh K., Boonham N. 2000. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 431-435
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155
- Osman F., Dang T., Bodaghi S., Vidalakis G. 2017. One-step multiplex RT-qPCR detects three citrus viroids from different genera in a wide range of hosts. *Journal of Virological Methods*, 245: 40-52
- Parisi O., Lepoivre P., Jijakli M. 2011. Development of a Quick Quantitative Real-Time PCR for the In Vivo Detection and Quantification of Peach latent mosaic viroid. *Plant Disease*, 95: 137-142
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45: 22 str.
- Pokorn T. 2017. Identifikacija potencialnih tarč viroidnih malih RNA (vd-sRNA) v hmelju (*Humulus lupulus* L.), doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 159 str.
- Rizza S., Nobile G., Tessitori M., Catara A., Conte E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology*, 58: 181-185
- Seigner L., Liebrecht M., Keckel L., Einberger K., Absmeier C. 2020. Real-time RT-PCR detection of Citrus bark cracking viroid (CBCVd) in hops including an mRNA-based internal positive control. *Journal of Plant Diseases and Protection*, doi: 10.1007/s41348-020-00317-x: 5 str.
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29: 151-159