

## **Diagnostyka Diagnostic**

### **PM 7/113 (1 ) Pepino mosaic virus**

#### **Zakres**

Standard opisuje protokół diagnostyczny dotyczący wykrywania i identyfikacji *Pepino mosaic virus* odpowiedni dla wszystkich części roślin, a w szczególności dla nasion pomidora<sup>1</sup>

#### **Zatwierdzenie i nowelizacja**

Zatwierdzony w 2012-09

#### **Wprowadzenie**

*Pepino mosaic virus* (PepMV) po raz pierwszy opisano na roślinie pepino (*Solanum muricatum*) w Peru w roku 1980. Od 1999, kiedy wirus PepMV rozpoczął infekowanie upraw pomidora w Holandii, Wielkiej Brytanii i Hiszpanii znacznie zwróciło uwagę jego gwałtowne światowe rozprzestrzenienie do głównych miejsc produkcji pomidora pod osłonami (szklarnie i osłony) oraz na ich obszarze. Ekonomiczne znaczenie PepMV dla przemysłu pomidorowego na danym rynku zdaje się być określone poprzez zbywalność i ekonomiczną wartość mniejszych przebarwionych owoców pomidora. Dostępne dowody sugerują, że straty w plonie i w jakości owoców zależą od obecności izolatu PepMV oraz od warunków środowiskowych panujących podczas okresu uprawy.

Obecnie wyróżniono cztery główne genotypy lub grupy szczepów z kompletną sekwencją nukleotydów w zakresie identyczności od 78% do 95%: europejski (EU), peruwiański, Ch2 i US1. EU jest genotypem PepMV, który jest najbardziej podobny genetycznie (95%), lecz biologicznie odrębnym od grupy szczepu peruwiańskiego i który pierwotnie dominował w europejskich uprawach pomidora. Jednakże, od 2004 izolaty grupy EU zdają się być zastępowane w Europie przez występujące coraz częściej infekcje mieszane szczepów Ch2. Ten ostatni genotyp został po raz pierwszy zidentyfikowany na nasionach pomidora pochodzących z Chile, genetycznie jest bardzo odległy (79% podobieństwa) od szczepu EU. Izolaty szczepu z grupy US1 są wyraźnie różne genetycznie od EU (78% - 82% podobieństwo), peruwiański i Ch2 jak dotąd były rzadko identyfikowane uprawach pomidora w USA i Europie. Zauważono także występowanie na pomidorach zrekombinowanych

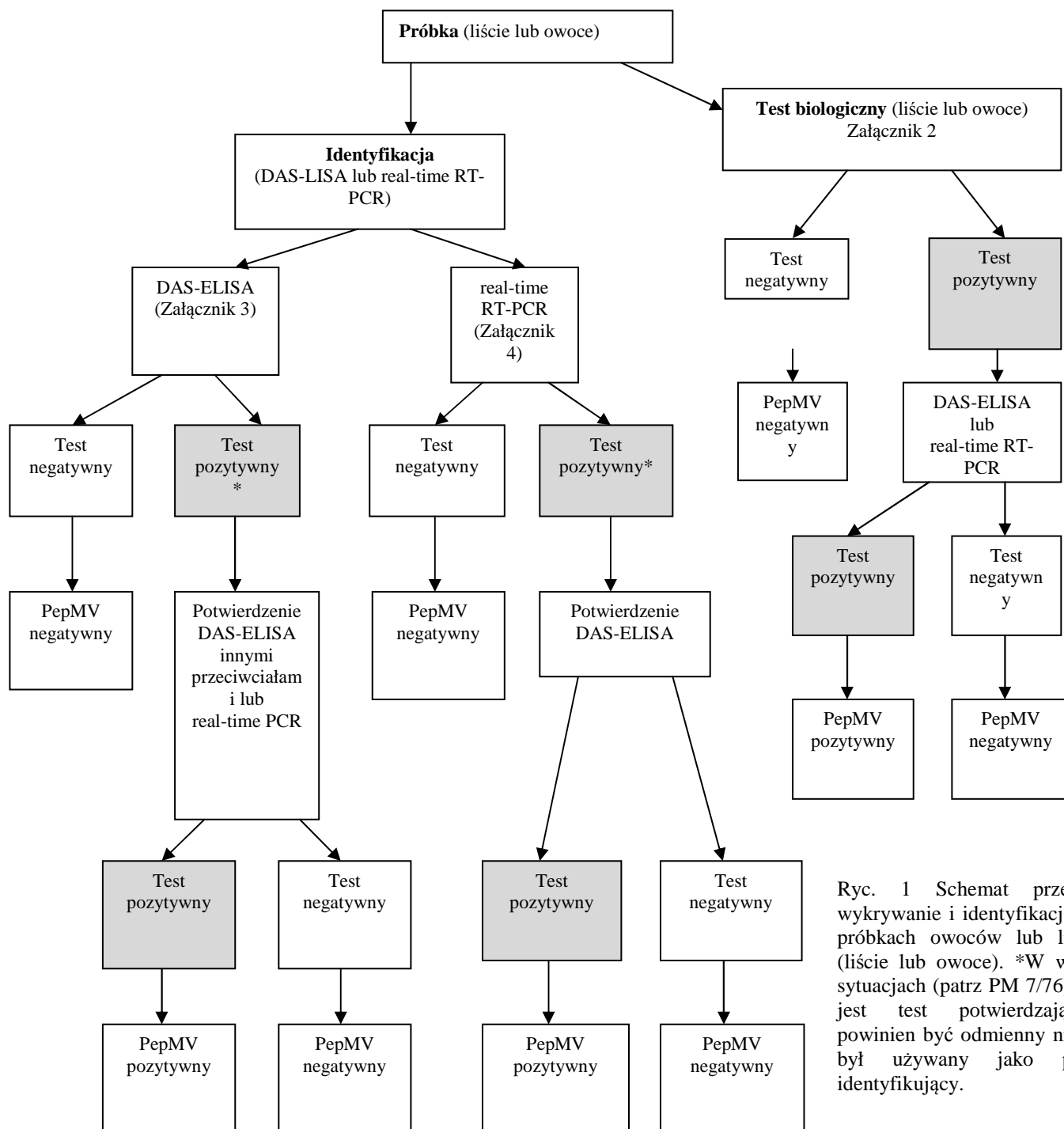
---

<sup>1</sup> Wymienione w Standardzie EPPO branżowe nazwy odczynników oraz sprzętu nie wykluczają zastosowania odczynników i wyposażenia innych firm, które mogą być równie przydatne w badaniach.

izolatów PepMV z chimerycznymi genomami posiadającymi sekwencje nukleotydowe identyczne z izolatami szczepów grup EU i Ch2. Pomimo szerokiego zakresu symptomów na liściach (mozaiki, żółte kanciaste plamy, bąblowatość, pokrój pokrzywy) i owocach (marmurkowatość lub ognistoczerwone wybarwienie owoców) powiązanych z infekcjami PepMV na pomidorach, nie ma obecnie dowodów na przyczynowe zależności pomiędzy silnymi objawami na liściach i owocach, a określonym genotypem PepMV. Jednakże, istnieje doniesienie sugerujące, iż infekcje mieszane wywołane przez dwa genotypy (EU i Ch2) lub infekcję z izolatem rekombinanta PepMV może wywoływać znacznie silniejsze symptomy PepMV (Hanssen *et al.*, 2008).

PepMV jest bardzo efektywnie przenoszony w sposób mechaniczny; np. podczas zbierania owoców, przycinania i innych rolniczych prac, prowadząc do szybkiego rozprzestrzeniania w uprawach pomidorów pod osłonami. Z rozprzestrzenianiem PepMV w szklarniach są dodatkowo powiązane trzmielce. Wykazano niski wskaźnik przenoszenia z nasionami, jednakże dostępne dowody wskazują, że PepMV nie infekuje zarodka, czy endospermy a kontaminuje otoczkę nasiona. Uważa się, że rozprzestrzenianie PepMV na większe odległości następuje poprzez zainfekowane nasiona lub sadzonki.

Podobnie jak większość innych potexwirusów, PepMV posiada dość wąski zakres naturalnych żywicieli, wydaje się w dużej mierze ograniczony do gatunków *Solanaceae*. Oprócz pomidorów i pierwotnej rośliny żywicielskiej pepino (*S. muricatum*), udowodniono naturalne infekcje PepMV nie tylko dzikich gatunków pomidorów *S. chilense*, *S. chmielewskii*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum* i ziemniaka, ale także kilku chwastów należących do różnych rodzin roślin uprawianych w sąsiedztwie szklarni z uprawami pomidorów. Ponieważ zakres eksperymentalnych roślin żywicielskich PepMV obejmuje uprawę roślin psiankowatych, takich jak ziemniaki, tytoń, *Capsicum* papryka, oberżyna uprawy te także mogą stanowić źródło ryzyka.



Ryc. 1 Schemat przedstawiający wykrywanie i identyfikację PepMV w próbkach owoców lub liści. Próbki (liście lub owoce). \*W wyjątkowych sytuacjach (patrz PM 7/76) wymagany jest test potwierdzający, który powinien być odmienny niż ten, który był używany jako podstawowy identyfikujący.

\*W wyjątkowych sytuacjach (patrz PM 7/76) wymagany jest test potwierdzający, który powinien być odmienny, niż ten, który był używany jako podstawowy identyfikujący.

Schematy przedstawiające procedury wykrywania i identyfikacji zapisano na rycinach 1 i 2.

### **Tożsamość**

**Nazwa:** *Pepino mosaic virus*

**Synonimy:** (zawierające poprzednie nazwy): brak

**Akronim:** PepMV

**Stanowisko taksonomiczne:** Wirusy: *Tymovirales: Alphaflexiviridae: Potexvirus*

**Komputerowy kod Bayera:** PEPMV0

**Kategoria fitosanitarna:** lista EPPO A2 nr 369, organizmy regulowane w Unii Europejskiej 2004/200/EC

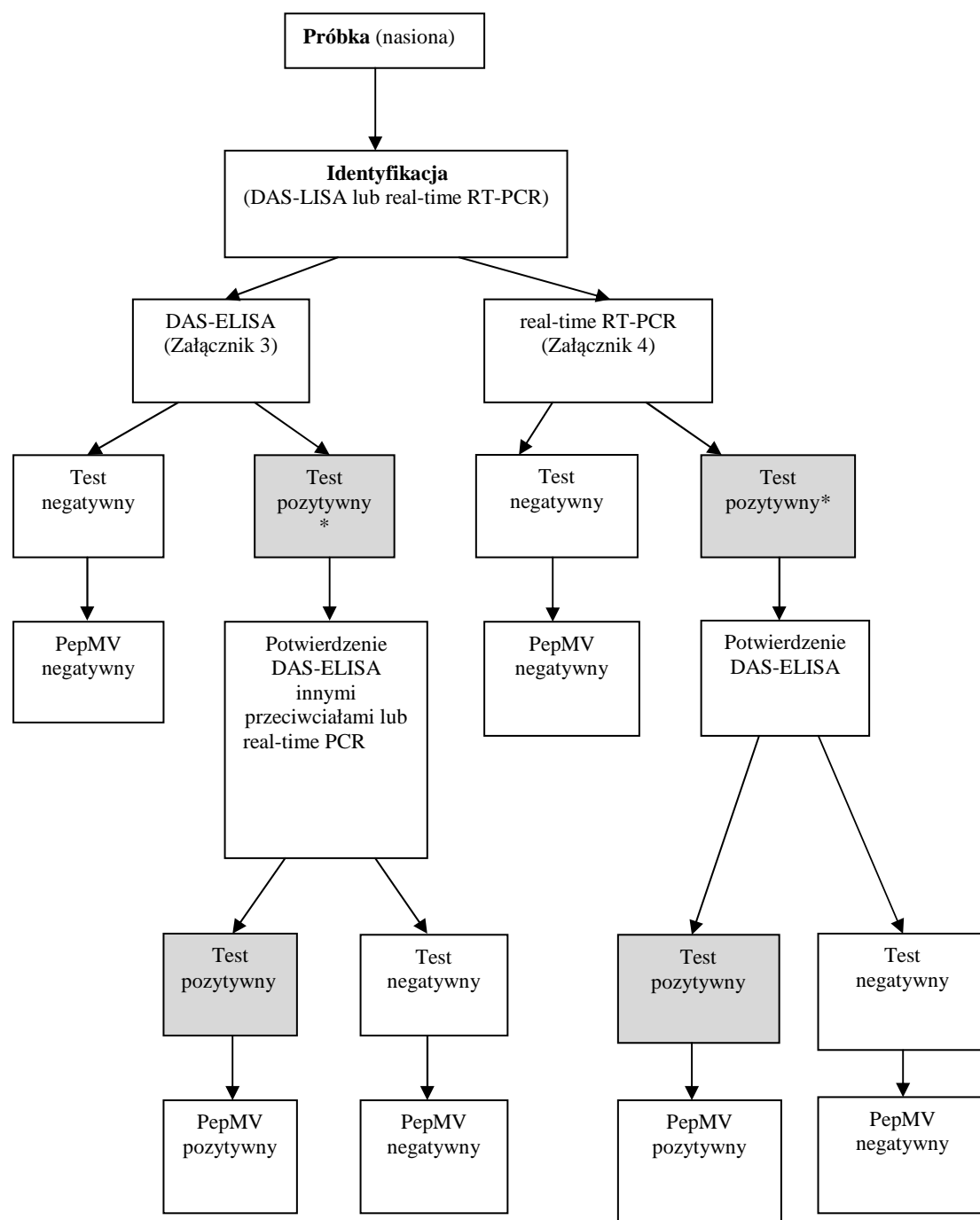
### **Wykrywanie**

#### **Objawy chorobowe**

PepMV może być wykrywane w roślinach (pomidora i pepino), owocach pomidora oraz w partiach nasion pomidora pochodzących z zainfekowanych roślin. Objawy PepMV mogą być skrajnie odmienne, począwszy od formy latentnej do bardzo ciężkiej infekcji. Przebarwienia owoców, takie jak marmurkowatość lub ognistoczerwony kolor są najbardziej typowymi i istotnymi ekonomicznie objawami (Ryc.3). Niekiedy obserwowane jest pęknięcie i zniekształcenie owoców. Z infekcją PepMV oprócz objawów na owocach występują objawy na liściach, takie jak pokrzywowy pokrój rośliny, pęcherzykowatość, bąblowatość, chlorozy, mozaiki, żółte kanciaste plamy, nekrozy liści i łodyg (Ryc.4). Kiedy roślina dojrzewa objawy na liściach na ogół zanikają. Pomimo zmienności objawów, PepMV może być zazwyczaj wykrywane w prawie każdej nad- i podziemnej części aktywnie rosnącej rośliny 4 tygodnie wcześniej zainfekowanej wirusem.

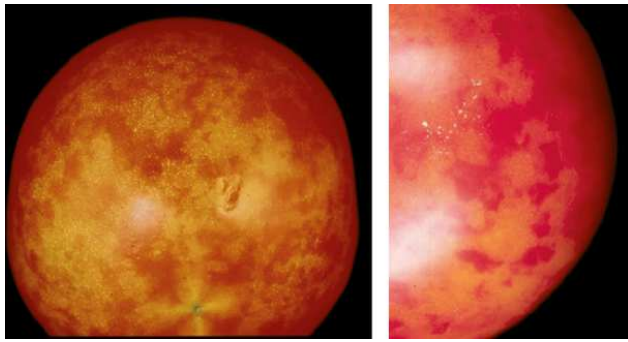
#### **Próbobranie w badaniach nasion**

Minimalna zalecana wielkość próbki wynosi 3000 nasion z maksymalną wielkością 250 nasion w podpróbce (ISHI-Veg Seed Health Testing Methods Reference manual [http://www.worldseed.org/isf/ishi\\_vegetable.html](http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html)). W przypadku małych partii nasion może być przebadana mniejsza próbka (np. we Francji z partii mniejszej niż 600g jest pobieranych jedynie 1000 nasion).



\*W wyjątkowych sytuacjach (patrz PM 7/76) wymagany jest test potwierdzający, który powinien być odmienny, niż ten używany jako podstawowy identyfikujący.

Ryc. 2 Schemat przedstawiający wykrywanie i identyfikację PepMV w próbkach nasion. Próbki (nasiona). \*W wyjątkowych sytuacjach (patrz PM 7/76) wymagany jest test potwierdzający, który powinien być odmienny niż ten, który był używany jako podstawowy identyfikujący.



**Ryc. 3** Symptomy na owocach charakterystyczne dla infekcji PepMV.



**Ryc.4** Objawy chorobowe polegające na pojawianiu się pęcherzyków na liściach (zdjęcie po lewej) i jasne plamy (po środku i po prawej) rzadkie, ale charakterystyczne symptomy infekcji PepMV.

### Test biologiczny

#### *Mechaniczna inokulacja na roślinach wskaźnikowych*

- ekstrakty z liści lub owoców  
Mechaniczna inokulacja z ekstraktu ze świeżych liści pomidora lub owocu na rośliny wskaźnikowe jest prosta, czuła i niezawodna. Pomimo faktu, że jest tradycyjną metodą wykrywającą wirusy, gdy jest stosowana jako jedyna nie prowadzi do specyficznej identyfikacji PepMV, ponieważ objawy pojawiające się na roślinach testowych mają niską wartość diagnostyczną. Jednak inokulacja roślin wskaźnikowych może być stosowana do wykrywania i izolacji wirusów, tak samo jak do zwiększenia koncentracji PepMV w tkance roślinnej dla kolejnych metod identyfikacji, takich jak DAS-ELISA.
- Ekstrakty z nasion

Test biologiczny może być stosowany, jednak jego czułość bywa zmienna. Wyniki pozytywne testu biologicznego wskażą obecność zdolnego do przeżycia PepMV, podczas gdy wynik negatywny nie pozwala na wyciągnięcie wniosków odnośnie obecności patogena. Z powodu zmienności i czułości test biologiczny nie jest zalecany jako test wykrywający PepMV w nasionach.

Najbardziej podatne i zalecane gatunki roślin testowych stosowane do wykrywania PepMV to *N. occidentalis* P1, *N. occidentalis* 37B i *N. benthamiana*. W przypadku, gdy jako źródła inokulum używamy materiału roślinnego pomidora (liście, korzenie, owoce) nie jest istotny rodzaj buforu ekstrakcyjnego do inokulacji roślin testowych, np. 0,02 M Na/K bufor fosforanowy, pH 7.0. Jako środek uszkadzający, celit jest dodawany do inokulum lub karborund do posypywania liści przed inokulacją. Powinny być one spłukane po inokulacji, aby uniknąć zarówno uszkodzenia inokulowanych liści jak i maskowania objawów. Zainokulowane rośliny najlepiej trzymać w szklarni lub fitotronie w zakresie temperatur  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$  naświetleniu minimum 12 h. Jeśli symptomy na liściach lub owocach nie są widoczne

lub pojawiają się wątpliwości, PepMV może być łatwo przenoszony z sokiem na rośliny takie jak:

- *N. benthamiana* i *N. occidentalis* 37B. Rozwijają się systemiczne mozaiki, chloroza liści (czasami nekrozy) i deformacja liści z wszystkimi szczepami PepMV dotychczas zbadanymi.
- *N. occidentalis* P1. Lokalne chlorotyczne i nekrotyczne uszkodzenia i systemiczne chlorozy, karłowacenie i nekrotyczne uszkodzenia (Verhoeven *et al.*, 2003). Nie są znane lokalne uszkodzenia na roślinie żywicielskiej odpowiednie dla wszystkich szczepów PepMV.

Dalsze szczegóły dotyczące ekstrakcji nasion i testów biologicznych znajdują się w Załącznikach 1 i 2.

## **Identyfikacja**

Do identyfikacji PepMV dostępne są różne serologiczne i molekularne testy lub ich kombinacje.

### **Metody serologiczne**

Dostępne są dla PepMV następujące testy serologiczne:

- Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent (DAS-ELISA)
- Mikroskopia immunoelektronowa (IEM)
- Lateral-flow immunoassay (LFIA) - szybkie serologiczne testy paskowe.

Testy do identyfikacji PepMV takie jak Lateral-flow immunoassay (LFIA) i mikroskopii immunoelektronowej (IEM) są dostępne lub opisane. Jednak testy te nie są zwalidowane i z tego powodu nie są zalecane i ujęte w protokole.

### **DAS-ELISA (Double antibody sandwich)**

Test ELISA może szybko zostać użyty do wykrywania i identyfikacji PepMV w roślinach uprawianych w polu, szklarni, w roślinach testowych i nasionach pomidora. Można stosować szeroko dostępne na rynku zestawy do testu DAS-ELISA zawierające wszystkie potrzebne składniki do wykonania badania. Metoda DAS-ELISA jest zalecana i preferowana do analizy dużej ilości podejrzanych o zainfekowanie wirusem PepMV próbek oraz do wykrywania i identyfikacji PepMV w nasionach pomidora. Szczegółowe informacje dotyczące DAS-ELISA z ekstraktami nasion i roślinami wskaźnikowymi zapisano w Załączniku 3. Opisana w niniejszym dokumencie metoda ELISA została w roku 2009 sprawdzona na nasionach pomidora podczas badań biegłości, będących częścią projektu EU FP6 PEPEIRA (wykazano jej skuteczność w 95% wyników w 18 uczestniczących laboratoriach).

### **Metody molekularne**

Do wykrywania i identyfikacji PepMV stosuje się szeroki zakres metod molekularnych. Najpopularniejsze metody oparte na badaniu kwasów nukleinowych (czasami powiązane z serologią lub poliformizmem długości fragmentów restrykcyjnych [RFLP]) to:

- konwencjonalny PCR z odwrotną transkryptazą (RT-PCR), wg Ling *et al.* (2008).

- Real-time PCR z odwrotną transkryptazą (Real-time RT-PCR), wg Ling *et al.* (2007).
- Immunocapture PCR z odwrotną transkryptazą (IC RT-PCR)
- PCR z odwrotną transkryptazą RFLP (RT-PCR RFLP).

Testy do identyfikacji PepMV takie jak: IC RT-PCR i RT-PCR RFLP są dostępne lub zostały opisane. Jednak powyższe testy nie zostały zwalidowane, dlatego nie są zalecane, ani nie zostały włączone do niniejszego protokołu.

Niektóre z wyżej wymienionych testów okazały się być odpowiednie do różnicowania szczepów PepMV (Martinez-Culebras *et al.*, 2002; Hanssen *et al.*, 2008; Alfaro-Fernandez *et al.*, 2009; Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2009). Podczas gdy w naturalnych warunkach zaczęły występować bardziej powszechnie infekcje mieszane szczepów PepMV, rozwinęły się metody multiplex RT-PCR, RT-PCR z następującym po nim RFLP lub sekwencjonowanie DNA, pozwalające na równoczesne wykrywanie i identyfikację różnych szczepów PepMV w krótszym czasie i po niższych kosztach. Jednak w przypadku rutynowej diagnostyki powinny być stosowane bardziej uniwersalne testy pozwalające na wykrycie wszystkich czterech poznanych szczepów wirusa PepMV. Takie uniwersalne startery oraz sondy zostały opisane dla konwencjonalnego RT-PCR (Ling *et al.*, 2008) oraz dla real-time RT-PCR (Ling *et al.*, 2007). Real-time RT-PCR jest przedstawiony w Załączniku 4. Obydwa testy są sprawdzone na nasionach w badaniach międzylaboratoryjnych, które były częścią projektu PEPEIRA. Podczas gdy real-time RT-PCR spełnił oczekiwane rezultaty w ogromnej większości z 11 uczestniczących w badaniach laboratoriach, konwencjonalny RT-PCR dał oczekiwane rezultaty jedynie w 7 z 14 laboratoriów. Nie jest znana przyczyna uzyskania słabych wyników w niektórych laboratoriach. Do czasu, gdy RT-PCR nie będzie w pełni niezawodny z uwzględnieniem wszystkich okoliczności, test nie jest zalecany, ani nie został zawarty w niniejszym protokole.

### **Zalecane badania**

Jako jakościowy test pierwszego wyboru zalecane jest do wykrywania i identyfikacji badanie DAS-ELISA. Real-time PCR z odwrotną transkryptazą (real-time RT-PCR) zalecany jest jako badanie molekularne. Obydwa testy zostały odpowiednio opisane w szczegółach w Załącznikach 3 i 4. Do badania nasion w zalecanej maksymalnej wielkości próbki (250 nasion) badania te są równoważne (obydwa posiadają zdolność wykrycia jednego zainfekowanego nasienia z 250).

Test biologiczny do wykrywania zdolnych do infekcji PepMV jest jedynie zalecany dla próbek liści i owoców pomidora oraz roślin wskaźnikowych, nie poleca się go dla próbek nasion.

### **Potwierdzanie pozytywnych wyników**

Próbki pozytywne powinny być potwierdzane. Jeśli pierwszym testem był test DAS-ELISA, jako potwierdzające badanie, powinien być wykonany drugi test DAS-ELISA (z użyciem innych przeciwciał) lub real-time RT-PCR. Test ten powinien być wykonany na pierwszej próbce. Jeśli pierwszym testem było badanie real-time RT-PCR, a określono, że obydwie testy ELISA i real-time mają wystarczającą czułość do wykrycia jednego zainfekowanego nasienia w próbce 250, test DAS-ELISA może być użyty do potwierdzenia pozytywnego wyniku real-time RT-PCR w określonej



podpróbce nasion. Jak dotąd nie znaleziono innego testu real-time RT-PCR ukierunkowanego na inny region genomu wirusowego.

### **Materiały odniesienia**

Próbki liści zainfekowane każdym z czterech głównych szczepów PepMV można uzyskać od Dr. R. van der Vlugt, Plant Research International, Wageningen, NL (rene.vandervlugt@wur.nl).

### **Raport z badania**

Wytyczne do raportu z badania podano w Standardzie EPPO PM 7/77(1) *Dokumentacja i raport z badania*.

### **Kryteria wydajności**

Gdy dostępne są kryteria wydajności, powinny być one dostępne w opisie badania. Dane dotyczące walidacji powinny być także udostępnione w bazie danych biegłości diagnostycznej EPPO (<http://dc.eppo.int>), zalecane jest sprawdzanie bazy danych gdyż mogą pojawiać się dodatkowe informacje (np. więcej szczegółowych informacji na temat czułości analitycznej, pełny raport z walidacji itp.).

### **Informacje dodatkowe**

Dalsze informacje na temat organizmu można uzyskać od: R. van der Vlugt, Plant Research International, Wageningen, NL, i od pozostałych członków konsorcjum PEPEIRA.

### **Opinie na temat protokołu diagnostycznego**

Jeśli masz jakiegokolwiek opinie dotyczące niniejszego protokołu diagnostycznego, lub któregośkolwiek zamieszczonego badania, a także jeśli masz do dyspozycji dodatkowe informacje z walidacji opisanych badań, którymi chcesz się podzielić proszę skontaktuj się z [diagnostics@eppo.int](mailto:diagnostics@eppo.int).

### **Przegląd protokołu**

Proces corocznego przeglądu jest prowadzony w celu określenia potrzeby wniesienia zmian do protokołu diagnostycznego. Protokoły wymagające zmiany są oznakowane na stronie EPPO. Gdy poprawki i sprostowania są gotowe do druku, również pojawia się o tym informacja na stronie internetowej.

### **Podziękowania**

W oryginale protokół ten został napisany przez: H.J. Vetten, R.A. Mumford i R. van der Vlugt.

### **Materiały źródłowe**

Alfaro-Fernandez A, Sanchez-Navarro JA, Cebrian MC, Cordoba-Selles MC, Pallas V & Jorda C (2009) Simultaneous detection and identification of *Pepino mosaic virus*

- (PepMV) isolates by multiplex one-step RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 125, 143–158.
- Gutierrez-Aguirre I, Mehle N, Delic D, Gruden K, Mumford R & Ravnkar M (2009) Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virology Methods* 162, 46–55.
- Hanssen IM, Paeleman A, Wittmans L, GoenK, Lievens B, Bragard C, Vanachter ACRC & Thomma BPHJ (2008) Genetic characterization of *Pepino mosaic virus* isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* 121, 131–146.
- Ling K, Wechter WP & Jordan R (2007) Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of *Pepino mosaic virus*. *Journal of Virology Methods* 144, 65–72.
- Ling K, Wintermantel WM & Bledsoe M (2008) Genetic composition of *Pepino mosaic virus* population in North American greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 92, 1683–1688.
- Martinez-Culebras PV, Lazaro A, Abad-Campos P & Jorda C (2002) A RT-PCR assay combined with RFLP analysis for detection and differentiation of isolates of *Pepino mosaic virus* (PepMV) from tomato. *European Journal of Plant Pathology* 108, 887–892.
- Verhoeven JThJ, Van der Vlugt RAA & Roenhorst JW (2003) High similarity between tomato isolates of *Pepino mosaic virus* suggest a common origin. *European Journal of Plant Pathology* 109, 419–425.

## **Załącznik 1 - Ekstrakcja z nasion**

### **Ekstrakcja z próbek nasion**

Podczas badania próbek nasion należy zachować ostrożność w celu uniknięcia kontaminacji np. podczas rozdrabniania próbek nasion rozłożyć papierowe lub plastikowe podkładki na blatach, gdy w rzadkich przypadkach, torebki mogą przeciekać.

1. Przygotowanie podpróbek może być wykonane na podstawie średniej wagi 5 do 10 podpróbek z 250 nasion pomidora.
2. Każda podpróbka jest umieszczana w specjalnej torebce do ekstrakcji (np. Bioreba cat. no. 480100) do której dodawane jest 10 ml ( $\pm 0,1$  ml) 0,1 M buforu fosforanowego ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2; patrz poniżej).
3. Torebki zamknąć poprzez lakowanie na gorąco (torebkę zalakować w miejscu górnej krawędzi po upewnieniu się, że nie zostały w niej uwięzione pęcherze powietrza i jest ona szczelna w miejscu nowo utworzonego zamknięcia).
4. Upewnij się, że nasiona są zanurzone w buforze i schowaj torebki na noc do lodówki ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
5. Torebki zawierające nasiona z buforem umieścić na płaskiej, twardej powierzchni i zmiażdżyć używając ręcznego lub automatycznego homogenizera (np. Bioreba 400010 i 400005). Mielenie odbywa się przez około 2 minuty. Po zmiażdżeniu przez około 1 minutę płyn w torebce powinien przyjąć konsystencję mleczka. Dalsze mielenie przez kolejną minutę należy kontynuować do momentu, gdy zabarwienie buforu stanie się bardziej intensywne. [Należy zwrócić uwagę, że w tej metodzie nie jest wymagana całkowita maceracja nasion].
6. Pozostałe podpróbki zmiażdżyć w podobny sposób.

7. Torebki rozciąć za pomocą nożyczek. Upewnij się, że narzędzia pomiędzy kolejnymi torebkami są odpowiednio dezynfekowane z użyciem podchlorynu sodu, środka wirusobójczego lub są opalane. Unikaj kontaminacji pomiędzy próbkami. Zalecane jest, aby kontrole negatywne były przetwarzane na końcu procesu w celu ujawnienia potencjalnej kontaminacji.
8. Pobrać mleczny płyn (objętość około 7 ml) z torebki (z przestrzeni za siatką) i umieścić w 10 ml fiolce lub probówce.
9. W przypadku, gdy ekstrakt będzie testowany tego samego dnia należy przechowywać go w lodzce lub lodówce. Porcje ekstraktu które nie będą bezpośrednio badane powinny być przechowywane w temperaturze - 20°C (±2°C) jako przyszłe źródło odniesienia lub do badań potwierdzających.

## **Bufor ekstrakcyjny**

### **0.1 M bufor fosforanowy (bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2)**

Roztwór A Przygotować 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

Roztwór B Przygotować 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

Dodać roztwór A do roztworu B i ustalić pH 7.2.

## **Załącznik 2 - Test biologiczny**

Test biologiczny można przeprowadzić dla próbki liści pomidora lub owoców wykazujących symptomy infekcji wirusowej. Rośliny testowe (*Nicotiana benthamiana* lub *N. occidentalis* '37B') są inokulowane i w celu potwierdzenia PepMV wykonywany jest test DAS-ELISA (lub real-time RT-PCR). Do inokulacji dwóch roślin testowych używa się jedynie 1 ml ekstraktu z liścia lub owocu. Należy zwrócić uwagę, iż nie ma dostępnych danych z walidacji dla testu ELISA lub real-time RT-PCR na roślinach testowych.

1. Zmiażdżyć próbkę około 0,5-1,0 g liścia lub owocu w specjalnej torebce ekstrakcyjnej (np. Bioreba nr kat. 480100) do której dodano 5 ml (±0,1ml) 0,1 M buforu fosforanowego (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.2).pH 7.2).
2. Pobrać bezpośrednio ekstrakty do mechanicznej inokulacji roślin testowych. Ekstrakty badać natychmiast po zmiżdżeniu lub przechować w 4°C(±2°C) przez maksymalnie 20 h jeśli były wcześniej analizowane w teście ELISA (lub RT-PCR). Nie zamrażać.
3. Rośliny testowe inokulować w odpowiedniej fazie wzrostu np. kiedy mają cztery w pełni wykształcone liście (patrz rys. 5). Rośliny powinny być hodowane w świetle o odpowiedniej intensywności, w średniej temperaturze 20-25°C, przed okresem kwitnienia oraz powinny mieć odpowiedni turgor w momencie inokulacji.

3.1. Każdy ekstrakt inokulować na trzy w pełni wykształcone liście, każdej z dwóch roślin, ekstrakt rozprowadzać na całej powierzchni liścia.

3.1.1. Liście umiarkowanie obsypać karborundem (320 wielkość ziaren proszku, Fisher Scientific lub równoważny).

3.1.2. W celu oceny potencjalnej kontaminacji zalecane jest, aby kontrole negatywne były inokulowane na końcu.

3.1.3. Nanieść 100 µl kropli ekstraktu z liścia lub owocu (lub buforu) na każdy inokulowany liść. Krople bez zbytniego nacisku rozsmarować palcami (lub szklaną szpatułką) na powierzchni liścia. Całość powtórzyć dla dwóch pozostałych liści każdej rośliny. Prace wykonywać w rękawiczkach, zmieniając je pomiędzy kolejnymi próbkami.

3.1.4. Rośliny słuwać wodą kranową kilka minut po inokulacji każdej próbki. Nie należy czekać do czasu zainokulowania wszystkich roślin.

3.2. W celu ujawnienia się na roślinach testowych infekcji systemicznych, rośliny inkubować przynajmniej 14 dni w warunkach kontrolowanych 20°C(±3°C) i przynajmniej 12-godzinnym naświetlaniu na dobę.

4. Po inokulacji w regularnych odstępach czasu należy oceniać rozwój symptomów na roślinach testowych (np. 6 dzień, 10, 14).

5. Po 14 dniach określić infekcję roślin testowych PepMV z użyciem ELISA.

5.1. Dla każdej podpróbki, próbki, puli liści z dwóch roślin testowych należy upewnić się, że ich zsumowana waga wynosi 0,2–0,5 g. Wybrać liście z górnej części roślin i te które rozwinęły się na tydzień przed pobraniem (nie inokulowane liście). [Próbki przetwarzać natychmiast lub przechowywać w 4°C (±2°C), lecz nie dłużej niż 48 godzin lub zamrozić do momentu użycia. Jeśli rośliny były mrożone należy je przetwarzać tak szybko, aby nie uległy rozmrożeniu].

5.2. Każdą zebraną próbkę liści zmiażdżyć w 5 ml (±0,1 ml) 0,1 M buforu fosforanowego (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,2/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8; pH 7,2). Pracować z ekstraktami natychmiast po zmiażdżeniu lub przechowywać w 4°C (±2°C), lecz nie dłużej niż 48 godzin lub zamrozić w - 20°C (±2°C) do momentu użycia.

5.3. Wykonać DAS-ELISA z ekstraktów liści. Jeśli była obecna infekcja PepMV wyniki powinny dać wyraźne pozytywne reakcje w teście ELISA.



Ryc. 5 *N. occidentalis* '37B' (po lewej) i *N. benthamiana* (po prawej) sadzonki w ostatnim stadium odpowiednim do inokulacji (stadium kiedy posiada 4 w pełni wykształcone liście). Najlepiej inokulować trzy w pełni wykształcone (zaznaczone 'X').

### Załącznik 3 - DAS-ELISA

Źródło przeciwciał jest decydujące. Dostępnych jest kilka surowic PepMV od różnych dostawców, które mogą wykazywać różną reaktywność przeciw poszczególnym szczepom wirusa (R. van der Vlugt, dane niepublikowane). Oparte na bieżącej dostępnej informacji (oparte na niepublikowanych wynikach badań biegłości PEPEIRA) dostępne na rynku surowice Prime Diagnostics ([www.primediagnostics.com](http://www.primediagnostics.com)), czy Bioreba ([www.bioreba.com](http://www.bioreba.com)) wykrywają wszystkie obecnie znane szczepy PepMV i są polecane do zastosowania zgodnie z protokołem DAS-ELISA. Nie zaobserwowano reakcji krzyżowych z innymi pospolitymi wirusami (np. CMV, TSWV, PVY), które mogą występować na pomidorze (R. van der Vlugt, własny komentarz). Surowice Prime Diagnostics z powodzeniem zostały zastosowane w ocenie badań biegłości PEPEIRA. Instrukcje dla surowic Prime Diagnostics i Bioreba przedstawiono poniżej (więcej szczegółów patrz w instrukcji producenta). Metoda badania ekstraktów z nasion, czy ekstraktów liści jest w zasadzie podobna z

niewielkimi różnicami w przygotowaniu próbek. Przygotowanie ekstraktów z nasion i liści zostało opisane w Załączniku 1 i 2.

## Bufory i odczynniki

	Prime Diagnostics	Bioreba
Bufor powlekający	1.59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.94 g NaHCO <sub>3</sub> Rozpuścić w 900 ml destylowanej/demineralizowanej wody Ustalić HCl pH do 9,6 Dodać destylowanej/demineralizowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości	1.59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.93 g NaHCO <sub>3</sub> 0,20 g NaN <sub>3</sub> Dodać destylowanej/demineralizowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości Ustalić HCl pH do 9,6
PBS (10x)	81,8 g NaCl 1,49 g KCl 2,72 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (lub 28,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O) Rozpuścić w 900 ml destylowanej/demineralizowanej wody Dodać destylowanej/demineralizowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości	(patrz bufor do płukania)
PBS (1x)	100 ml PBS 10x 900 ml demineralizowanej wody Ustalić NaOH pH do 7,4 Dodać destylowanej/demineralizowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości	(patrz bufor do płukania)
Bufor do płukania	0,1% Tween-20 w 1 x PBS	8,00 g NaCl 0,20 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,20 g KCl 0,50 g Tween 20 Nie zawiera konserwantów. Używać do dwóch dni lub dodać 0,2g/l NaN <sub>3</sub> Dodać destylowanej/demineralizowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości Ustalić pH do 7,4
Bufor do koniugatu	900 ml 1x PB 0,5 ml Tween-20 20 g polwinylnyl pyrrolidone (PVP-40000, Sigma) 2 g owoalbuminy (grade VI) 0,5 g NaN <sub>3</sub> Rozpuścić dobrze mieszając (PVP i owoalbumina potrzebują dużo czasu do rozpuszczenia, a roztwór pozostaje mętny). Dodać 1 x PBS do 1000 ml całkowitej objętości i przechowywać w 4°C	2,40 g TRIS 8,00 g NaCl 20,00 g PVP K25 (MW 24000) 0,50 g Tween 20 2,00 g BSA (albumina surowicy bydłęcej -bovine serum albumin) 0,20 g MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O 0,20 g KCl 0,20 g NaN <sub>3</sub> Ustalić HCl pH do 7,4; Dodać destylowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości
Bufor substratowy	97 ml diethanolamine 600 ml destylowanej/demineralizowanej wody Ustalić HCl pH 9,8 Dodać destylowanej/demineralizowanej	97 ml diethanolamine 0,20 g NaN <sub>3</sub> Bezpośrednio przed użyciem (zawsze przygotowywać świeże): rozpuścić pNPP (para-nitrophenyl-

	wody do 1000 ml całkowitej objętości	phosphate) w buforze substratowym 1 mg/ml. Dodać destylowanej wody do 1000 ml całkowitej objętości Ustalić HCl pH 9,8 patrz informacje o produkcie Bioreba
Substrat	5 mg tabletki para-nitrophenylphosphate (pNPP), Sigma104–105 3 tabletki w 20 ml buforu substratowego (stężenie końcowe 0,75 mg/ ml)	
Przeciwciała powlekające	Oczyszczone, królicze, poliklonalne, specyficzne względem wirusa przeciwciało (IgG)	Oczyszczone, królicze, poliklonalne, specyficzne względem wirusa przeciwciało (IgG)
AP koniugat	Alkaliczna fosfataza skoniugowana z króliczym, poliklonalnym, specyficznym wobec wirusa przeciwciałem (IgG)	Alkaliczna fosfataza skoniugowana z króliczym, poliklonalnym, specyficznym wobec wirusa przeciwciałem (IgG)
Kontrola pozytywna	Częściowo oczyszczona przygotowana z roślin testowych zainfekowanych wirusem PepMV (10 x stężona); przed użyciem rozcieńczona 10 x w 0,1 M buforze fosforanowym	Liofilizowana kontrola przygotowana z roślin testowych zainfekowanych PepMV; rozcieńczona w 2,5 ml H <sub>2</sub> O

### Sprzęt i materiały

- płytki ELISA: dobrej jakości, 96-dołkowe płytki (o średniej lub wysokiej zdolności do wiązania tj. Greiner nr kat. 655001 lub Nunc-Immunoplatemaxisorp nr. kat. 439454).
- Płuczka płytek: zaleca się stosowanie automatycznych płuczek płytek. Płukanie można także wykonać ręcznie. Płytki kilkakrotnie wypełniać buforem do płukania i gwałtownie opróżniać. Ostatecznie płytkę wypełnić przez 5 minut buforem do płukania, ponownie gwałtownie ją opróżnić (w zawinięty ręcznik).
- Czytnik płytek: stosować dowolny czytnik płytek, wielokanałowe pipety (8 lub 12 kanałów). Należy się upewnić, że stosowane są różne pipety do nakładania opłaszczających IgG i roztworów skoniugowanych lub używać końcówek z filtrem.

### Metoda

Metoda jest opisana w projekcie PEPEIRA jako zwalidowana.

### Powlekanie płytek

- Przeciwciała opłaszczające rozcieńczyć w buforze powlekającym w stosunku 1:1000.
- Nanieść 200 µl roztworu przeciwciał do każdej studzienki płytki ELISA. Płytkę przykryć pokrywką i umieścić w wilgotnej komorze (tj. wilgotna chusteczka na dnie pudełka). Pudełko zamknąć i inkubować przez całą noc w lodówce lub 3 h w około 37°C<sup>2</sup>.

### Inkubacja próbek

- Płuczka wymyć płytki w buforze do płukania: 3 płukania na płytkę.
- Alternatywnie do płuczki płytek można zastosować płukanie ręczne z użyciem butelki. Należy się upewnić, czy wszystkie studzienki są wypełnione a następnie gwałtownie je opróżnić.
- Nanieść po 200 µl ekstraktu z nasion lub liści w duplikacie (w powtórzeniu) do studzienek płytki ELISA. Użyć pierwszą kolumnę płytki (#1) do ekstraktów ze

<sup>2</sup> Bioreba zaleca 4h w około 30 °C

zdrowych nasion (w przypadku badania nasion) lub ekstraktów ze zdrowych liści (w przypadku badania liści).

- Płytkę zamknąć pokrywką i umieścić ją w wilgotnej komorze. Komorę zamknąć i inkubować przez noc w lodówce.

### **Inkubacja koniugatu**

- Płuczka wymyć płytki w buforze do płukania: 3-4 namoczenia i płukania na płytkę w celu usunięcia wszystkich śladów niezwiązanych wirusów z próbki.
- Alternatywnie wypłucz płytkę ręcznie.
- Rozcieńczyć przeciwciała skoniugowane z AP w buforze do koniugatu w stosunku 1:1000.
- Nanieść po 200 µl roztworu koniugatu do każdej studzienki płytki ELISA.
- Płytkę zamknąć pokrywką i umieścić ją w wilgotnej komorze (umieścić kawałek wilgotnego papieru na dnie). Komorę zamknąć i inkubować przez noc w lodówce lub 3h w około 37°C<sup>3</sup>.

### **Inkubacja substratu**

- Płuczka wymyć płytki w buforze do płukania: 3-4 namoczenia i płukania na płytkę w celu usunięcia wszystkich śladów niezwiązanego koniugatu (jest to krytyczny moment podczas procesu płukania).
- Alternatywnie płytkę wypłukać ręcznie.
- Przygotować świeży substrat. Upewnić się, że używa się (wolnych od alkalicznej fosfatazy) szklanych lub plastikowych naczyń (szkło autoklawowane jest odpowiednie do stosowania).
- Nanieść po 200 µl roztworu substratu do każdej studzienki płytki ELISA.
- Płytkę inkubować w temperaturze pokojowej do czasu, gdy kontrola pozytywna (KP) i pozytywne próbki zabarwią się na żółto. Proces może trwać krócej niż 5 minut dla (KP) lub do 1h w zależności od koncentracji wirusa w próbkach.
- Płytkę odczytać w czytniku płytek po 15, 30 i 60 minutach inkubacji substratu. Zaleca się zapisywanie surowych danych (tj. nie należy automatycznie odejmować wartości dla buforu lub kontroli negatywnej).

### **Interpretacja danych**

Obliczyć średnią z odczytów absorbancji A 405 (AVG) oraz odchylenie standardowe (STD) dla kontroli negatywnych, uzyskanych po 60 minutach. Wyznaczyć wartość progową stosując następującą formułę:  $(AVG + (3 \times STD))$ . Próbka powinna być uznana za pozytywną, jeśli wartości testu ELISA z dwóch powtórzeń są powyżej wartości progowej. Jeśli jedna z wartości w powtórzeniu (duplikacie) danych próbek jest powyżej, a w innym powtórzeniu jest poniżej wartości progowej zaleca się, aby dany ekstrakt z nasion lub rośliny został ponownie pobrany i przebadany. Jeśli obydwie wartości dla próbki są poniżej wartości progowej próbkę należy uznać za negatywną. Kontrola pozytywna dostarczona przez producenta przeciwciał powinna spełniać standardy.

Stosowanie podwójnej wartości ze średniej z kontroli negatywnych dla wyznaczenia wartości progowej próbek uznawanych za pozytywne znacząco wpływa na wyniki, obniżając czułość testu DAS-ELISA w zalecanej wielkości podpróbek

---

<sup>3</sup> Bioreba zaleca 5h w około 30°C.

składających się z 250 nasion. Może to doprowadzić do uznawania fałszywie negatywnych próbek i dlatego nie jest zalecana powyższa interpretacja danych.

### Projektowanie płytki ELISA

Aby zapewnić bezpośrednie porównanie wyników, próbki w duplikatach powinny być naniesione na tę samą płytkę ELISA i powinny być porównywane jedynie z kontrolami pozytywnymi i negatywnymi naniesionymi na tę samą płytkę ELISA. W kolumnie 1 powinny być naniesione ekstrakty ze zdrowych nasion lub roślin. Oprócz próbek ekstraktów na każdej płytce ELISA musi być uwzględniona w powtórzeniu kontrola pozytywna (dostarczona przez dostawcę przeciwciał).

Przykład zaprojektowanej płytki do analizy ELISA. Wszystkie próbki są badane w duplikacie łącznie z 10 x rozcieńczoną kontrolą pozytywną.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	KN	P1	P1	P7	P7							KP
C	KN	P2	P2	P8	P8							KP
D	KN	P3	P3	itd.								B
E	KN	P4	P4									B
F	KN	P5	P5									B
G	KN	P6	P6									B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

B = bufor do koniugatu; KN = kontrola negatywna (ekstrakt z nasion lub roślin); KP = kontrola pozytywna; P1 = ekstrakt próbki 1; P2 = ekstrakt próbki 2 itd.

### Załącznik 4 - Real-time RT-PCR

#### 1. Ogólne informacje

1.1 Metoda jest oparta na badaniu opublikowanym przez Ling *et al.* (2007) modyfikowana i oceniona na podstawie badań biegłości w 2009 roku jako część projektu PEPEIRA (<http://www.pepeira.wur.nl>). Kolejne dane z walidacji opublikowano przez Gutierrez-Aguirre *et al.* (2009).

1.2 Stosowany test TaqMan został zaprojektowany dla 5 szczepów obejmujących 11 izolatów (ich kody dostępu GenBank podano w nawiasach): EU-tom (AJ438767, AJ606359, AJ606360, AF340024, AF484251); Ch-1 (DQ000984, AY509926); Ch-2 (DQ000985); Peruvian (AJ606361, AM109896); US-2 AY509927).

1.3 Amplikon obejmuje 107 bp regionu genu TGB2 PepMV, odpowiadającego nukleotydom 5126-5232 izolatu Ch1 (kod dostępu DQ000984).

1.4 Oligonukleotydy:

Startery	Sekwencja	Specyficzność izolatu
KL05-48 forward 1	5'-ACTCCTAGAGCTG ACCTCAC-3'	Ch1, EU-tom, Peruvian
KL05-49 Forward 2	5'-ACTCCTAGAGCTG ATCTTAC-3'	Ch2, US2,
KL05-50	5'-FAM-TGTCAGCTTG	wszystkie izolaty PepMV



probe	CATTTACTTC CAAAA-BHQ-3'	
KL05-51 reverse 1	5'-TCTCCAGCAACAG GTTGGTA-3'	Ch1, EU-tom, Peruvian
KL05-52 reverse 2	5'-TCACCTGCAACTG GTTGATA-3'	Ch2, US2
COX F	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'	Plant endogene (cytochrome oxidase) kontrola
COXSOL 1511T	5'-VIC-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-BHQ-3'	Plant endogene (cytochrome oxidase) kontrola
COX RW	5'-CAACTACGGATA TATAAGRR CCRRAACTG-3'	Plant endogene (cytochrome oxidase) kontrola

1.5 Badanie powinno być wykonywane z użyciem hot-start Taq DNA polimerazy i MMLV odwrotnej transkryptazy.

1.6 Badanie powiodło się z zastosowaniem odczynników różnych producentów obejmujących ABI One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit, Ambion-ABI Ag-Path ID one step RT-PCR kit i Bio-Rad One Step RT-PCR.

1.7 Badanie powiodło się z zastosowaniem różnych systemów real-time PCR tj. ABI (7900, 7500), Roche (LightCycler 480), Bio-Rad (CFX96).

1.8 Wszystkie badane próbki (oraz najlepiej wszystkie kontrole próbek) powinny być przeprowadzane w duplikatach. Na wszystkich etapach przygotowywania reakcji PCR należy zachować ostrożność w celu uniknięcia kontaminacji próbek i odczynników.

1.9 Sondy TaqMan: mogą być stosowane różne kombinacje barwników dopasowane do specyficznego systemu real-time.

## 2. Metody

### 2.1 Ekstrakcja i oczyszczanie kwasu nukleinowego

2.1.1 Metodą mogą być testowane liście roślin pomidora lub nasiona pomidora (metody nie walidowano dla innych roślin). Dla pewności nie należy używać więcej niż 250 nasion na podpróbkę w pojedynczym badaniu (mimo, że badania biegłości wykazały, iż real-time PCR może wykrywać jedno zainfekowane nasienie na 6250).

2.1.2 RNA może być izolowane z dużą wiarygodnością z zastosowaniem Qiagen RNeasy Plant kit postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Wykazano, skuteczność innych metod ekstrakcji w wykrywaniu PepMV i mogą być one stosowane, jednak powinny być zwalidowane w stosunku do RNeasy kit w celu zapewnienia porównywalności.

2.1.3 Wyekstrahowane RNA powinno być przechowywane w temperaturze - 20°C lub lodówce przez krótki okres czasu np. maksymalnie 8 godzin.

### 2.2 Jednoetapowy real-time RT-PCR.

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję (µl)	Stężenie robocze
Całkowita objętość na pojedynczą reakcję w µl	-	25	-
ABI Taq Gold	10 x	2,5	1 x

Buffer A bufor MMLV odwrotna transkryptaza	4U/ $\mu$ l (Uwaga: rozcieńczona wcześniej 1:50 ze stężenia 200U/ $\mu$ l)	0,125	10U
MgCl <sub>2</sub>	25 000 $\mu$ M	5,5	5500 $\mu$ M
dNTPs	6250 $\mu$ M	2,0	500 $\mu$ M
Taq polimeraza	5U/ $\mu$ l	0,125	0,625 units
KL05-48 forward starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
KL05-49 forward starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
KL05-51 reverse starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
KL05-52 reverse starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
KL0-50 sonda	5,0 $\mu$ M	0,5	0,1 $\mu$ M
RNA	-	1,0	-
woda molekularnej jakości	-	9,25	-

2.2.1 Parametry PCR: warunki uniwersalne opracowane dla ABI: 30 min w 48°C, 10 min w 95°C, następnie 40 cykli 15 s w 95°C i 1 min w 60°C. Dla urządzeń ABI 9600 NIE włączać trybu emulacji.

Jednoetapowy real-time RT-PCR dla kontroli inhibicji reakcji:

	Stężenie robocze	Objętość na reakcję ( $\mu$ l)	Stężenie robocze
Całkowita objętość na pojedynczą reakcję w $\mu$ l	-	25	-
ABI Taq Gold	10 x	2,5	1 x
Buffer A bufor MMLV odwrotna transkryptaza	4U/ $\mu$ l (Uwaga: rozcieńczona wcześniej 1:50 ze stężenia 200U/ $\mu$ l)	0,125	10U
MgCl <sub>2</sub>	25 000 $\mu$ M	5,5	5500 $\mu$ M
dNTPs	6250 $\mu$ M	2,0	500 $\mu$ M
Taq polimeraza	5U/ $\mu$ l	0,125	0,625 units
COX-F forward starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
COX-RW reverse starter	7,5 $\mu$ M	1.0	0,3 $\mu$ M
COXSOL 1511T sonda	5,0 $\mu$ M	0,5	0,1 $\mu$ M

RNA	-	1,0	-
woda	-	11,25	-
molekularnej jakości			

2.2.2 Parametry PCR: patrz 2.2.1

### 3. Podstawowe formalne informacje

#### 3.1 Kontrole

Dla uzyskania wiarygodnego wyniku badania należy dołączyć następujące (zewnętrzne) kontrole odpowiednio dla każdej serii izolacji i amplifikacji docelowego organizmu oraz docelowego kwasu nukleinowego.

- Negatywna kontrola izolacji (KN) kontaminacji podczas ekstrakcji kwasu nukleinowego: ekstrakcja kwasu nukleinowego, a następnie amplifikacji próbki z niezainfekowanej tkanki rośliny żywicielskiej.
- Pozytywna kontrola izolacji (KP) w celu zapewnienia, że został wyizolowany kwas nukleinowy o odpowiedniej jakości i w odpowiedniej ilości: ekstrakcja kwasu nukleinowego, a następnie amplifikacji docelowego organizmu lub próbki matrycy, która zawiera docelowy organizm (np. naturalnie zainfekowana tkanka rośliny żywicielskiej lub tkanka rośliny żywicielskiej zanieczyszczona docelowym organizmem).
- Negatywna kontrola amplifikacji (KN amp.), aby wykluczyć fałszywie pozytywne wyniki spowodowane kontaminacją podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej: woda jakości molekularnej (wolna od nukleaz) używana do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej.
- Kontrola pozytywna amplifikacji (KP amp.) do monitorowania wydajności amplifikacji: amplifikacja kwasu nukleinowego docelowego organizmu. Może zawierać wyekstrahowany kwas nukleinowy docelowego organizmu, kwas nukleinowy wyekstrahowany z zainfekowanej tkanki rośliny żywicielskiej, zamplifikowane DNA całego genomu (ang. whole genome amplified DNA) lub kontrola syntetyczna (np. sklonowany produkt PCR). KP amplifikacji powinna być blisko granicy wykrywalności.

Alternatywnie (lub dodatkowo) dla zewnętrznej kontroli pozytywnej (KP i KP amp.) mogą być użyte wewnętrzne kontrole pozytywne (KP wew.) do monitorowania indywidualnie każdej pojedynczej próbki. Mogą one obejmować: amplifikację endogennego kwasu nukleinowego z użyciem konserwatywnych starterów, które amplifikują konserwatywny inny niż docelowy kwas nukleinowy, który jest także obecny w próbce (np. gen roślinnej cytochromowej oksydazy)<sup>4</sup>, amplifikację próbek zanieczyszczonych egzogennym kwasem nukleinowym, który nie ma powiązania z docelowym kwasem nukleinowym (np. syntetyczna kontrola wewnętrzna amplifikacji) lub amplifikacja w duplikacie próbki zanieczyszczonej docelowym kwasem nukleinowym. Kontrola wewnętrzna powinna przebiegać jako pojedyncza na duplikat badanych próbek w celu uniknięcia oddziaływania na czułość.

#### 3.2 Interpretacja wyników

Cykl wartości progowej (granicznej, Ct) dla PepMV wynosi 37 i został uzyskany z zastosowaniem urządzeń/materiałów i odczynników opisanych w załączniku. Jeśli to konieczne wartość progowa Ct powinna być określona dla wymaganej kontroli

<sup>4</sup> gen roślinnej cytochromowej oksydazy nie monitoruje etapu RT.

wewnętrznej. Wartość progowa powinna być zweryfikowana w każdym laboratorium, gdzie test jest wprowadzany po raz pierwszy.

*Weryfikacja kontroli*

- KP i KP amp. krzywe amplifikacji powinny mieć przebieg wykładniczy.
  - KN i KN amp. powinny być negatywne ( $C_t >$  wartość progowa).
- KP, KP amp. i KP wew. powinny mieć wartość  $C_t$  poniżej wartości progowej.

*Jeśli spełnione zostały takie warunki:*

- Badanie można uważać jako pozytywne jeśli wytwarzane są wykładnicze krzywe amplifikacji, a wartość  $C_t \leq 37$ .
- Próbkę można uważać jako negatywną jeśli wartość  $C_t \geq 40$
- Badanie powinno być powtórzone jeśli pojawiają się jakiegokolwiek niejasne lub sprzeczne wyniki (np.  $37 < \text{wartość } C_t < 40$ ).

#### **4. Kryteria wydajności dostępne dla real-time RT-PCR**

##### 4.1 Dane dla analitycznej czułości

- Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2009 wykazał dolną wykrywalność przy teoretycznej granicy wykrywalności równej 10-100 kopii genomu. Badanie wykrywa 1 naturalnie porażone nasiono na 5000.
- Ling *et al.*, 2007 wykrywał 20 pg zainfekowanego RNA i 1 porażone w sposób sztuczny nasiono na 1000 (niższe stężenia nie były badane).

##### 4.2 Dane dla analitycznej specyficzności

- Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2009 wykazał, że badanie jest zdolne do wykrycia 15 izolatów obejmujących wszystkie główne genotypy- peruwiański, europejski pomidora, US1, Ch2/US2.
- Ling *et al.*, 2007 wykazał, że badanie jest zdolne do wykrycia 4 izolatów laboratoryjnych (US1, US2, Ch1, Ch2) i 25 polowych izolatów z USA i Kanady.  
Zbadano jeden izolat *Potato virus X* (PVX) oraz inne potexwirusy. Dopasowanie (alignments) *In silico* nie wykazało żadnej znaczącej sekwencji homologicznej pomiędzy badanym, a innym wirusem/patogenem.

##### 4.3 Dane dla powtarzalności

Z badań biegłości Pepeira: 98,9%

##### 4.4 Dane dla odtwarzalności

Z badań biegłości Pepeira: 100%