

POROVNÁNÍ MODIFIKACÍ POSTUPU DETEKCE VIRU NEŠTOVIC PECKOVIN METODOU DAS-ELISA

COMPARISON OF MODIFICATIONS OF THE METHOD FOR DETECTION OF PLUM POX VIRUS DAS-ELISA

Martina Rejlová, Lucie Valentová, Radek Čmejla

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

e-mail: Martina.REJLOVA@vsuo.cz, ORCID: [0000-0002-6687-8508](https://orcid.org/0000-0002-6687-8508)

ABSTRAKT

V souvislosti s detekcí patogenů ovocných plodin v období sezónních kontrol často řeší diagnostické laboratoře situace, kdy je nutné v krátkém čase analyzovat velký počet vzorků. Pozornost jsme proto zaměřili na vývoj rychlejšího a efektivnějšího diagnostického postupu k detekci viru neštovic peckovin (PPV, Plum pox virus). Standardně se k detekci PPV v rostlinném materiálu používá relativně levná a jednoduchá sérologická metoda, tzv. sendvičová ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA). Standardní doba detekce metodou DAS-ELISA od firmy Bioreba AG trvá 32 hodin. Optimalizace metody spočívala ve zkrácení inkubačních časů a navýšení inkubační teploty. Současně bylo nutné přistoupit k navýšení koncentrace protilátek, aby byla zachována citlivost metody. Detekce patogenu pomocí upravené metody DAS-ELISA od firmy Bioreba AG může poskytnout výsledek za jeden pracovní den (8,5 hod).

Klíčová slova: DAS-ELISA, diagnostika, Plum pox virus, optimalizace metody

ABSTRACT

During seasonal inspections and a need for detection of fruit tree pathogens, diagnostic laboratories often have to deal with situations where a large number of samples have to be analyzed in a short time. We therefore focused on the development of a faster and more efficient diagnostic procedure for the detection of Plum pox virus (PPV). A relatively cheap and simple serological method, the double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), is usually used to detect PPV in plant material. The standard detection time for the DAS-ELISA kit sold by Bioreba AG is 32 hours. The optimization of the method involved reducing the incubation times and increasing the incubation temperature. At the same time, it was necessary to increase the antibody concentration to maintain the sensitivity of the method. Pathogen detection using a modified DAS-ELISA method from Bioreba AG can provide in one working day (8.5 h).

Keywords: DAS-ELISA, diagnostics, Plum pox virus, method optimization

ÚVOD

Virus neštovic peckovin (PPV, Plum pox virus) je jedním z nejvýznamnějších patogenů ovocných plodin na světě. Způsobuje rozsáhlé ekonomické ztráty v ovocnářství (Cambra *et al.*, 2006). Jeho přítomnost v sadech ohrožuje nejen kvalitu a výnosy plodů, ale také dlouhodobou životaschopnost ovocných stromů. Efektivní ochrana proti tomuto viru zahrnuje především prevenci v jeho šíření, neboť infikované stromy nelze léčit. Prevence šíření PPV tedy vyžaduje nejen kontrolu rostlin, ale také účinnou ochranu vůči vektorům, aby se minimalizovalo riziko přenosu viru. Mšice jsou hlavními vektory tohoto viru a přenášejí jej neperzistentním způsobem (Ng a Perry, 2004). Tento způsob přenosu je rychlý a efektivní, což umožňuje viru rychle se šířit v sadech a mezi nimi. Nicméně klíčovým opatřením je používání zdravého certifikovaného množitelského materiálu. Virus PPV se totiž může velice snadno přenášet prostřednictvím infikovaného materiálu, jako jsou rouby, očka a vegetativně množené podnože (Polák *et al.*, 2010).

V rámci Evropské unie se proto uplatňují certifikační schémata, která zahrnují pravidelné testování rozmnožovacího rostlinného materiálu dle metod definovaných v diagnostických protokolech. Tato certifikační schémata a diagnostické protokoly vydává Evropská a středozezemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO). Jejich cílem je zajistit, aby materiál určený pro další výsadbu byl prostý virů a dalších regulovaných patogenů. Konkrétně v diagnostickém protokolu pro virus PPV PM 7/32 (2) Plum pox virus je popsána diagnostika viru pomocí sérologických, molekulárních, imunochromatografických a biologických metod (EPPO, 2023). V současné době se k detekci rostlinných virů ovocných plodin velmi často využívá tzv. sendvičová ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA) (Clark a Adams, 1977). Jedná se o relativně levnou a jednoduchou sérologickou metodu, která poskytuje dostatečnou citlivost a specifitu. Je vhodná pro testování velkého počtu vzorků najednou. Další metodou, taktéž často využívanou pro diagnostiku rostlinných virů, je real-time PCR (real-time polymerase chain reaction). V běžných laboratořích, které provádí rutinní testování rostlinných virů, a kde se klade důraz na kapacitu zpracovaných vzorků, není simplexní RT PCR vhodná z důvodů výrazně vyšších nákladů k provedení jednoho testu oproti metodě DAS-ELISA (Boonham *et al.*, 2014).

EPPO ve svém diagnostickém protokolu PM 7/32 (2) Plum pox virus uvádí výsledky validace detekčních souprav DAS-ELISA pro PPV od firem Bioreba AG, Agdia a SEDIAG. Tato studie vznikla v rámci projektu „Valitest“ financovaného EU H2020, kdy byly porovnány výkonnostní parametry diagnostických souprav pro detekci viru PPV. Např. test detekčního kitu DAS-ELISA od firmy Bioreba AG vykazoval citlivost 81,3 %, specifitu 93,8 %, opakovatelnost 87,5 % a reprodukovatelnost 87,5 % (EPPO, 2023).

V návaznosti na zvýšenou poptávku po diagnostice patogenů ovocných plodin, zvláště během sezónních kontrol, kdy je třeba testovat velké množství vzorků v omezeném čase, se klade důraz na vývoj rychlejších a efektivnějších diagnostických metod. Dalším z mnoha důvodů inovace metod může být co nejrychlejší reakce na šíření známého nově zavlečeného patogenu na nová území. Pokud jsou na trhu dostupné komerčně vyrobené protilátky, tak lze k detekci viru použít metodu DAS-ELISA. Jiná situace by nastala v případě výskytu nového a nově se šířícího patogenu. Zavedení specifické a efektivní real-time PCR metody je rychlejší než vývoj protilátek pro DAS-ELISA (Boonham *et al.*, 2014).

Standardně se detekce metodou DAS-ELISA soupravami firmy Bioreba AG provádí ve dvou dnech (cca 32–33 hodin) – první den se provádí potahování jamek první protilátkou, homogenizace vzorků a jejich inkubace v destičce přes noc; druhý den se přidává protilátka konjugovaná s enzymem, substrát a DAS-ELISA končí odečtením absorbancí a jejich vyhodnocením (Bioreba, 2021). Cílem práce bylo provést modifikaci metody DAS-ELISA od firmy Bioreba AG pro detekci PPV v ovocných plodinách takovým způsobem, aby bylo možné získat výsledky ideálně během jedné směny (8,5 hodiny) s minimálním dopadem na senzitivitu metody. Pro srovnání byl použit i imunodiagnostický rychlotest AgriStrip vyvinutý firmou Bioreba AG.

MATERIÁL A METODY

PPV pozitivní rostlinné kontroly

Pro porovnání citlivosti zrychlené jednodenní detekční metody DAS-ELISA vůči standardnímu dvoudennímu diagnostickému postupu byly použity PPV pozitivní lyofilizované rostlinné kontroly od firmy Bioreba AG a PPV infikovaný rostlinný materiál. Pupeny a listy byly odebrány ze dvou infikovaných stromů rostoucích v okrese Jičín. Jednalo se o slivoň neznámé odrůdy a slivoň odrůdy 'Kamir'. U těchto slivoní byla v minulosti potvrzena metodou DAS-ELISA infekce virem neštovic peckovin (PPV).

Modifikace jednotlivých kroků metody DAS ELISA

Pro testování použitelnosti modifikované metody DAS-ELISA v jednodenním uspořádání byl použit komerčně dostupný detekční kit a originální reagentie od firmy Bioreba AG (k.č. 150565). Optimalizace metody zahrnovala zvýšení inkubační teploty, což současně umožnilo zkrácení inkubačních časů potřebných k vazebným interakcím plast-protilátka-antigen-konjugát. Dalším krokem, který by mohl vést k úspěšné modifikaci metody, bylo navýšení koncentrace protilátek a konjugátu oproti dvoudennímu standardnímu diagnostickému postupu. V tabulce 1 jsou uvedeny alternativní podmínky jednotlivých kroků metody v porovnání se standardním postupem (Bioreba, 2021).

Tabulka 1. Parametry jednotlivých kroků metody DAS-ELISA. Porovnání dvou modifikovaných postupů se standardním provedením doporučeným od firmy Bioreba AG (shodné parametry zeleně podbarveny).
Table 1. Parameters of individual steps of the DAS-ELISA method. Comparison of the two modified procedures with the standard procedure recommended by Bioreba AG (identical parameters in green).

	Modifikovaná DAS-ELISA ¹⁾		Standardní DAS-ELISA ²⁾
	Postup A ³⁾	Postup B ⁴⁾	
Potahování destiček ⁵⁾	2 h, 37 °C	2 h, 37 °C	4 h, 30 °C
Ředění protilátek ⁶⁾	1:1 000	1:500	1:1 000
Inkubace vzorků ⁷⁾	2 h, 37 °C	2 h, 37 °C	Přes noc ⁸⁾ , 4 °C
Aplikace konjugovaných protilátek ⁹⁾	1 h 45 min, 37 °C	1 h 45 min, 37 °C	5 h, 30 °C
Ředění konjugovaných protilátek ¹⁰⁾	1:1 000	1:500	1:1 000
Enzymatická reakce ¹¹⁾	1 h	1 h	1 h
Spektrofotometrie ¹²⁾	A _{405/492 nm}	A _{405/492 nm}	A _{405/492 nm}
Délka postupu ¹³⁾	8 h 30 min	8 h 30 min	32 h 30 min

1) Modified DAS-ELISA, 2) Standard DAS-ELISA, 3) Procedure A, 4) Procedure B, 5) Coating step, 6) Dilution of antibodies, 7) Incubation of samples, 8) Overnight, 9) Conjugation step, 10) Dilution of conjugate, 11) Substrate step, 12) Spectrophotometry, 13) Length of procedure

Porovnání citlivosti modifikované a standardní metody DAS-ELISA

Pro porovnání citlivosti modifikované a standardní metody DAS-ELISA byl navržen postup, který zahrnoval testování PPV pozitivních rostlinných kontrol. Byly použity dva rozdílné materiály: PPV pozitivní lyofilizované kontroly od firmy Bioreba AG získané z extraktu infikovaných rostlin a PPV pozitivní rostlinné kontroly (zamražené pupeny nebo čerstvé listy slivoně) s různými koncentracemi virových antigenů. Lyofilizované kontroly (sušina o hmotnosti 50–100 mg) byly rekonstituovány do původního objemu (2,5 ml) podle návodu výrobce v ultračisté vodě. Výchozí hodnota hmotnostní koncentrace pro lyofilizovanou kontrolu není známa. Rostlinné kontroly byly homogenizovány v homogenizačních sáčcích (k.č. 430100) v extrakčním pufru v poměru 1:20 (w/v) pomocí homogenizátoru HOMEX 7 (Bioreba AG). Z rekonstituovaných lyofilizovaných a homogenizovaných rostlinných pozitivních kontrol byly připraveny ředící řady s dvojnásobným ředěním ve vodě: 2×, 4×, 8×, 16×, 32×, 64×, 128×, 256× a 512×. Paralelně bylo 200 µl z každého ředění otestováno na přítomnost viru PPV modifikovanými metodami a kontrolní standardní metodou (podmínky uvedeny v Tabulce 1). DAS-ELISA probíhala v mikrotitračních destičkách (Nunc MaxiSorp, Thermo Scientific, dodavatel Bioreba AG), které jsou optimalizovány a validovány pro reagentie od firmy Bioreba AG. Pro potvrzení úspěšně proběhlého testu DAS-ELISA se současně se vzorky dávkovaly do destičky dodané čerstvé viruprosté rostlinné kontroly. Jako negativní kontrola celého postupu byl použit samotný extrakční pufr. Odečet intenzity zabarvení se provedl spektrofotometrem při vlnových délkách 405 nm a 492 nm (Sunrise RC, TECAN). Naměřená data byla zpracována softwarem KIM. Pro stanovení hranice, pod kterou je hodnota absorbance považována za negativní výsledek, se vypočítala prahová hodnota absorbance: $A_p = X + 3SD$, kde X je průměrná absorbance extrakčních případně negativních kontrol a SD je jejich standardní odchylka. Vzorek je negativní (-), pokud je absorbance vzorku $\leq A_p$. Vzorek je pozitivní (+), pokud je jeho absorbance $\geq 2A_p$. Kategorie mezi těmito hodnotami je označována jako potenciálně pozitivní výsledek (PP).

Imunochromatografický test

Pro srovnání byl pro detekci viru PPV také využit rychlotest AgriStrip vyvinutý firmou Bioreba AG. Jedná se o tzv. "lateral flow test", který slouží k detekci viru přímo v terénu nebo v laboratorních podmínkách. Tento test umožňuje snadné, rychlé a relativně spolehlivé testování rostlinných vzorků na přítomnost viru bez nutnosti nákladného laboratorního vybavení (Bioreba, 2018).

Testování citlivosti AgriStrip proběhlo paralelně s metodami DAS-ELISA pouze v případě ředící řady rekonstituované pozitivní kontroly, protože v případě rostlinné kontroly nebylo možné využít totožnou ředící řadu rostlinného homogenátu z důvodů odlišného složení extrakčních pufků (AgriStrip vs. DAS-ELISA). Rostlinná kontrola (listy slivoně odrůdy 'Kamir') byla homogenizována v homogenizačním sáčku (k.č. 430100) v extrakčním pufru specifickém pro AgriStrip přibližně v poměru 1:20 (w/v) pomocí ručního homogenizátoru. Z rekonstituované a homogenizované pozitivní kontroly byly připraveny ředící řady s dvojnásobným ředěním ve vodě: 2×, 4×, 8×, 16×, 32×, 64×, 128×, 256× a 512×. Rychlotest probíhal v plastových 1,5 ml zkumavkách dle návodu výrobce. Označený konec testovacích proužků byl ponořen na 15 minut do 200 µl rekonstituované a homogenizované pozitivní kontroly s různými koncentracemi virových antigenů. Poté proběhlo vyhodnocení pomocí vizuálního odečtení přítomnosti barevného kontrolního a testovacího pruhu na proužku. Přítomnost dvou pruhů

(kontrolní a testovací pruh) indikovala pozitivní výsledek, zatímco přítomnost pouze jednoho kontrolního pruhu znamenala negativní výsledek.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Diagnostickou soupravou DAS-ELISA pro virus PPV byly v roce 2024 provedeny nejprve tři nezávislé testy citlivosti s využitím ředící řady pozitivní lyofilizované kontroly. Testy se lišily daty provedení a šarží pozitivní lyofilizované kontroly (TEST 1: šarže 045646, TEST 2 a 3: šarže 065850). Z výsledků v tabulce 2 vyplývá, že citlivost modifikované metody DAS-ELISA (postup A) v případě použití PPV pozitivní lyofilizované kontroly je nižší oproti standardnímu postupu. U všech tří srovnávacích testů, kdy při ředění pozitivní kontroly 64× (TEST 1), 128× (TEST 2 a 3) bylo dosaženo modifikovanou metodou (postup A) výsledku PP, tedy „potenciálně pozitivní“, zatímco standardní metoda vykazovala ještě pozitivní výsledek. Modifikovaná metoda (postup B) v jednom z testů prokázala srovnatelnou citlivost se standardní metodou (Tabulka 2, TEST 3). Je zřejmé, že dvojnásobné navýšení koncentrace protilátek a konjugátu vede k vyrovnání se standardizované metodě.

Tabulka 2. Srovnání citlivosti modifikované metody DAS-ELISA (postup A a B) vůči standardnímu postupu od firmy Bioreba AG pro virus PPV. Testy provedeny v sériových ředěních lyofilizované pozitivní rostlinné kontroly firmy Bioreba AG: TEST 1: šarže 045646, TEST 2 a 3: šarže 065850.

(-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek; (PP): potenciálně pozitivní výsledek; (NT): netestováno a Průměr dvou opakování s použitím dvou jamek na vzorek \pm SD. Hodnota absorbance měřená po 60 min

Table 2. Comparison of the sensitivity of the modified DAS-ELISA method (procedure A and B) with the standard Bioreba AG procedure for PPV. Tests performed in serial dilutions of Bioreba AG lyophilized positive plant control: TEST 1: batch 045646, TEST 2 and 3: batch 065850.

(-): negative; (+): positive; (PP): potentially positive; (NT): not tested

a Mean of two repetitions using two wells per sample \pm SD. Absorbance value measured after 60 min

TEST 1	Pozitivní kontrola PPV (lyofilizovaný rostlinný materiál, Bioreba AG) ¹⁾		
	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ²⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ³⁾	Standardní 2denní ELISA ⁴⁾
Ředění ⁵⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
Nespecifikováno ⁶⁾ (w/v)	(+) 2,909 \pm 0,0775	(+) 3,972 \pm 0,474	(+) 3,351 \pm 0,0425
2×	(NT)	(NT)	(NT)
4×	(+) 1,397 \pm 0,0165	(+) 2,559 \pm 0,0105	(+) 2,012 \pm 0,028
8×	(+) 0,769 \pm 0,0175	(+) 1,486 \pm 0,0215	(+) 1,356 \pm 0,009
16×	(+) 0,375 \pm 0,0045	(+) 0,789 \pm 0,0375	(+) 0,833 \pm 0,0035
32×	(+) 0,234 \pm 0,0015	(+) 0,361 \pm 0,002	(+) 0,591 \pm 0,0075
64×	(PP) 0,144 \pm 0,0015	(+) 0,174 \pm 0,005	(+) 0,365 \pm 0,0045
128×	(NT)	(NT)	(NT)
256×	(NT)	(NT)	(NT)
512×	(NT)	(NT)	(NT)

Pozitivní kontrola PPV (lyofilizovaný rostlinný materiál, Bioreba AG) ¹⁾			
TEST 2	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ²⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ³⁾	Standardní 2denní ELISA ⁴⁾
Ředění ⁵⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
Nespecifikováno ⁶⁾ (w/v)	(+) 3,585 ± 0,0390	(+) 4,223 ± 0,6410	(+) 3,492 ± 0,1235
2×	(NT)	(NT)	(NT)
4×	(+) 3,044 ± 0,0350	(+) 3,651 ± 0,1760	(+) 3,692 ± 0,1890
8×	(+) 1,839 ± 0,0430	(+) 3,014 ± 0,0790	(+) 3,188 ± 0,0270
16×	(+) 1,087 ± 0,0325	(+) 1,837 ± 0,0295	(+) 2,153 ± 0,0215
32×	(+) 0,573 ± 0,0260	(+) 0,879 ± 0,0575	(+) 1,408 ± 0,0330
64×	(+) 0,217 ± 0,0320	(+) 0,262 ± 0,0005	(+) 0,608 ± 0,0065
128×	(PP) 0,121 ± 0,0130	(PP) 0,146 ± 0,0015	(+) 0,277 ± 0,0150
256×	(-) 0,087 ± 0,0005	(-) 0,091 ± 0	(PP) 0,164 ± 0,0010
512×	(NT)	(NT)	(NT)

Pozitivní kontrola PPV (lyofilizovaný rostlinný materiál, Bioreba AG) ¹⁾			
TEST 3	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ²⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ³⁾	Standardní 2denní ELISA ⁴⁾
Ředění ⁵⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
Nespecifikováno ⁶⁾ (w/v)	(+) 3,571 ± 0,0010	(+) 3,676 ± 0,0620	(+) 3,722 ± 0,0875
2×	(NT)	(NT)	(NT)
4×	(+) 3,483 ± 0,0190	(+) 3,680 ± 0,0785	(+) 3,830 ± 0,1475
8×	(+) 2,404 ± 0,0400	(+) 3,291 ± 0,0125	(+) 3,400 ± 0,0017
16×	(+) 1,487 ± 0,0435	(+) 2,332 ± 0,0435	(+) 2,445 ± 0,0085
32×	(+) 0,755 ± 0,0065	(+) 1,150 ± 0,0210	(+) 1,460 ± 0,0325
64×	(+) 0,338 ± 0,0115	(+) 0,443 ± 0,0255	(+) 0,853 ± 0,0050
128×	(PP) 0,155 ± 0	(+) 0,320 ± 0,0145	(+) 0,361 ± 0,0165
256×	(PP) 0,111 ± 0,0050	(PP) 0,168 ± 0,0015	(PP) 0,181 ± 0,0005
512×	(-) 0,092 ± 0,0010	(PP) 0,114 ± 0,0035	(PP) 0,124 ± 0,0035

1) Positive control PPV (lyophilized plant material, Bioreba AG), 2) Modified 1-day ELISA (procedure A), 3) Modified 1-day ELISA (procedure B), 4) Standard 2-day ELISA, 5) Dilution, 6) Not specified

Porovnání citlivosti pokračovalo na rostlinách infikovaných virem PPV následnými třemi nezávislými diagnostickými testy modifikovaných metod DAS-ELISA (postup A a B) s metodou standardizovanou od firmy Bioreba AG. Pro první test (A) byly použity zamražené pupeny neznámé odrůdy slivoně (datum odběru 6. 3. 2024). Jako vstupní materiál pro následující dva srovnávací testy byly použity čerstvě odebrané listy s příznaky viru neštovic peckovin. Vzorek pro druhý test (B) pocházel ze slivoně neznámé odrůdy (datum odběru 29. 5. 2024), zatímco vzorek pro třetí test (C) byl odebrán ze slivoně odrůdy 'Kamir' (datum odběru 16. 8. 2024).

U PPV pozitivních homogenizovaných rostlinných kontrol se ukázal shodný trend v nižší citlivosti v případě modifikované metody (postup A). Citlivost detekce modifikované (postup B) a standardní metody byla srovnatelná ve všech třech variantách testů (Tabulka 3).

U obou variant pozitivních kontrol modifikovaná metoda (postup A), zahrnující zkrácení inkubačních časů a současné navýšení teploty, nevykázala shodnou citlivost s metodou standardní, byť pouze o jeden ředící stupeň u většiny testů. Použití modifikované metody (postup A) v laboratorní praxi nelze vyloučit, nicméně je nutné počítat se snížením citlivosti metody, kdy při nízkých koncentracích patogenu, blížících se k hranici detekce, již modifikovaná metoda oproti standardní metodě poskytne potenciálně pozitivní nebo falešně negativní výsledek.

Výsledek testů modifikované metody (postup B) potvrzuje, že navržené úpravy mohou být úspěšně aplikovány v diagnostice viru PPV bez negativního dopadu na kvalitu detekce, což může významně zvýšit efektivitu práce v laboratoři.

Tabulka 3. Srovnání citlivosti modifikované metody DAS-ELISA (postup A a B) vůči standardnímu postupu od firmy Bioreba AG pro virus PPV. Testy provedeny v sériových ředěních homogenizované pozitivní rostlinné kontroly: TEST A: zmražené pupeny, TEST B a C: čerstvé listy.

(-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek; (PP): potenciálně pozitivní výsledek; (NT): netestováno a Průměr dvou opakování s použitím dvou jamek na vzorek \pm SD. Hodnota absorbance měřená po 60 min

Table 3. Comparison of the sensitivity of the modified DAS-ELISA method (procedure A and B) with the standard Bioreba AG procedure for PPV. Tests performed in serial dilutions of homogenized positive plant control: TEST A: frozen buds, TEST B and C: fresh leaves.

(-): negative; (+): positive; (PP): potentially positive; (NT): not tested

a Mean of two repetitions using two wells per sample \pm SD. Absorbance value measured after 60 min

	Pozitivní kontrola PPV (zamražené pupeny, slivoň odrůda neznámá, Chlum u Hořic) ¹⁾		
TEST A	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ⁴⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ⁵⁾	Standardní 2denní ELISA ⁶⁾
Ředění ⁷⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
1:20 (w/v)	(+) 0,277 \pm 0,0065	(+) 0,450 \pm 0,0145	(+) 0,629 \pm 0,004
2 \times (1:40)	(NT)	(NT)	(NT)
4 \times (1:80)	(PP) 0,138 \pm 0	(+) 0,188 \pm 0,0035	(+) 0,252 \pm 0,003
8 \times (1:160)	(PP) 0,115 \pm 0,0005	(PP) 0,147 \pm 0,001	(PP) 0,177 \pm 0,002
16 \times (1:320)	(PP) 0,100 \pm 0,001	(PP) 0,117 \pm 0,004	(PP) 0,130 \pm 0,0065
32 \times (1:640)	(PP) 0,092 \pm 0,0015	(PP) 0,100 \pm 0,0005	(PP) 0,104 \pm 0
64 \times (1:1280)	(-) 0,085 \pm 0,001	(-) 0,0885 \pm 0,0015	(-) 0,087 \pm 0,001
128 \times (1:2560)	(NT)	(NT)	(NT)
256 \times (1:5120)	(NT)	(NT)	(NT)
512 \times (1:10240)	(NT)	(NT)	(NT)

Pozitivní kontrola PPV (čerstvé listy, slivoň odrůda neznámá, Chlum u Hořic) ²⁾			
TEST B	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ⁴⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ⁵⁾	Standardní 2denní ELISA ⁶⁾
Ředění ⁷⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
1:20 (w/v)	(+) 3,789 ± 0,0335	(+) 3,510 ± 0,0256	(+) 3,688 ± 0,0535
2× (1:40)	(NT)	(NT)	(NT)
4× (1:80)	(+) 3,717 ± 0,2415	(+) 3,760 ± 0,1195	(+) 3,685 ± 0,2070
8× (1:160)	(+) 3,797 ± 0,3450	(+) 3,792 ± 0,0975	(+) 3,830 ± 0,1015
16× (1:320)	(+) 3,823 ± 0,1795	(+) 3,713 ± 0,0410	(+) 3,800 ± 0,1565
32× (1:640)	(+) 2,735 ± 0,0980	(+) 3,531 ± 0,0355	(+) 3,247 ± 0,1310
64× (1:1280)	(+) 0,835 ± 0,0290	(+) 1,167 ± 0,0645	(+) 1,260 ± 0,0390
128× (1:2560)	(+) 0,203 ± 0,0255	(+) 0,731 ± 0,0305	(+) 0,479 ± 0,0725
256× (1:5120)	(PP) 0,110 ± 0,0015	(+) 0,291 ± 0,0125	(+) 0,261 ± 0,0090
512× (1:10240)	(NT)	(NT)	(NT)

Pozitivní kontrola PPV (čerstvé listy, slivoň odrůda 'Kamir', Holovously) ³⁾			
TEST C	Modifikovaná 1denní ELISA (postup A) ⁴⁾	Modifikovaná 1denní ELISA (postup B) ⁵⁾	Standardní 2denní ELISA ⁶⁾
Ředění ⁷⁾	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}	DAS-ELISA ^a A _{405/492 nm}
1:20 (w/v)	(+) 3,604 ± 0,0475	(+) 3,600 ± 0,0155	(+) 3,677 ± 0,1110
2× (1:40)	(NT)	(NT)	(NT)
4× (1:80)	(+) 3,662 ± 0,1900	(+) 3,568 ± 0,0310	(+) 3,800 ± 0,0715
8× (1:160)	(+) 3,636 ± 0,0310	(+) 3,633 ± 0,0260	(+) 3,972 ± 0,0815
16× (1:320)	(+) 3,550 ± 0,0815	(+) 3,669 ± 0,1435	(+) 3,761 ± 0,0460
32× (1:640)	(+) 2,524 ± 0,0415	(+) 3,500 ± 0,0650	(+) 3,829 ± 0,0400
64× (1:1280)	(+) 1,039 ± 0,1425	(+) 1,857 ± 0,1050	(+) 1,872 ± 0,1495
128× (1:2560)	(+) 0,335 ± 0,0265	(+) 0,644 ± 0,0785	(+) 0,862 ± 0,1075
256× (1:5120)	(+) 0,343 ± 0,0520	(+) 0,401 ± 0,0025	(+) 0,580 ± 0,0045
512× (1:10240)	(PP) 0,176 ± 0,0030	(+) 0,219 ± 0,0125	(+) 0,502 ± 0,0675

1) Positive control PPV (frozen buds, plum variety unknown, Chlum u Hořic), 2) Positive control PPV (fresh leaves, plum variety unknown, Chlum u Hořic), 3) Positive control PPV (fresh leaves, plum variety 'Kamir', Holovously), 4) Modified 1-day ELISA (procedure A), 5) Modified 1-day ELISA (procedure B), 6) Standard 2-day ELISA, 7) Dilution

Antigenní rychlotest pro PPV: AgriStrip Bioreba AG

Diagnostické proužky AgriStrip od firmy Bioreba AG umožňují v řádech minut otestovat zdravotní stav rostlinného materiálu. Testy s AgriStrip byly provedeny paralelně s třetím srovnávacím diagnostickým testem DAS-ELISA u obou variant pozitivních kontrol. V porovnání s modifikacemi metody DAS-ELISA byla citlivost AgriStrip detekujícího PPV v lyofilizované pozitivní kontrole výrazně nižší (Tabulka 4).

Negativního výsledku bylo dosaženo u stupně ředění 32×, zatímco standardní metoda zachytila virus PPV (potenciálně pozitivní) dokonce u stupně ředění 512×. Nižší citlivost tak odpovídá doporučení firmy Bioreba AG nepoužívat lyofilizované kontroly ze standardních souprav ELISA pro detekci pomocí AgriStrip. Negativní výsledek AgriStrip u čerstvých listů slivoně infikovaných PPV byl zaznamenán u ředění v poměru 1:2560 (v/w). Tedy opět byla potvrzena výrazně nižší citlivost rychlotestu oproti standardní metodě, která při ředění v poměru 1:10240 (v/w) stále vykazovala pozitivní nález.

Obrázek 1. Senzitivita imunochromatografického testu AgriStrip (Bioreba AG). Listy slivoně odrůdy 'Kamir' infikované virem neštvic peckovin; různé ředění vzorku.

Figure 1. Sensitivity of the immunochromatographic test AgriStrip (Bioreba AG). Leaves of plum variety 'Kamir' infected with plum pox virus; various dilution of the sample.



Tabulka 4. Citlivost imunochromatografických testů AgriStrip od firmy Bioreba AG pro virus PPV. Testy byly provedeny v sériových ředěních lyofilizované pozitivní rostlinné kontroly firmy Bioreba AG a v sériových ředěních homogenizované pozitivní rostlinné kontroly. Vyhodnoceno vizuálním odečtením přítomnosti barevného kontrolního a testovacího pruhu na proužku: (-): negativní výsledek; (+): pozitivní výsledek.

Table 4. Sensitivity of the AgriStrip immunochromatographic test AgriStrip (Bioreba AG) for PPV. The tests were performed in serial dilutions of the lyophilized positive plant control from Bioreba AG and in serial dilutions of the homogenized positive plant control. Evaluated by visual reading of the presence of the coloured control and test stripe on the strip: (-): negative result; (+): positive result.

Pozitivní kontrola PPV (lyofilizovaný rostlinný materiál, Bioreba AG, šarže 065850) ¹⁾		Pozitivní kontrola PPV (čerstvé listy, slivoň odrůda 'Kamir', Holovousy) ²⁾	
Ředění ³⁾	AgriStrip Bioreba AG	Ředění ³⁾	AgriStrip Bioreba AG
Nespecifikováno ⁴⁾ (w/v)	(+)	1:20 (w/v)	(+)
2×	(+)	2× (1:40)	(+)
4×	(+)	4× (1:80)	(+)
8×	(+)	8× (1:160)	(+)
16×	(+)	16× (1:320)	(+)
32×	(-)	32× (1:640)	(+)
64×	(-)	64× (1:1280)	(+)
128×	(-)	128× (1:2560)	(-)
256×	(-)	256× (1:5120)	(-)
512×	(-)	512× (1:10240)	(-)

1) Positive control PPV (lyophilized plant material, Bioreba AG, batch 065850), 2) Positive control PPV (fresh leaves, plum variety 'Kamir', Holovousy), 3) Dilution, 4) Not specified

Ekonomické aspekty: modifikovaná versus standardní DAS-ELISA

Orientační náklady bez DPH na analýzu 40 vzorků (jedna destička) s použitím DAS-ELISA PPV reagenčního kitu (k.č. 150565, Bioreba AG) pro jednotlivé postupy jsou uvedeny v tabulce 5. Celková cena zahrnuje pouze částky za reagencie. Náklady pro modifikovanou metodu (postup B) jsou navýšeny z důvodu použití dvojnásobného množství klíčových reagencií, a to PPV protilátek (k.č. 150515, Bioreba AG) a PPV konjugátu (k.č. 150525, Bioreba AG). Teoreticky standardní metoda sice přináší nižší náklady na jeden test, nicméně kapacita analyzovaných vzorků je o 60 % nižší než u zkrácené jednodenní verze metody DAS-ELISA (vztaženo na 5 pracovních dnů, dvě dvoudenní metody DAS-ELISA při zachování počtu 40 vzorků na jeden test). Zavedení zrychlené metody DAS-ELISA laboratoří přinese možnost okamžitě reagovat na požadavky zákazníka, týkající se urgentní diagnostiky rostlinných vzorků. Rychlejší diagnostika zvyšuje počet zpracovaných vzorků za jednotku času, což může ve výsledku přispět ke snížení nákladů na jeden test, a tím kompenzovat zvýšené náklady za klíčové reagencie u modifikované metody (postup B).

Tabulka 5. Porovnání orientačních nákladů a procesivity modifikované versus standardní metody DAS-ELISA a AgriStrip

Table 5. Comparison of indicative cost and procesivity of modified versus standard DAS-ELISA methods and AgriStrip

	Modifikovaná DAS-ELISA ¹⁾		Standardní DAS-ELISA ²⁾	AgriStrip
	Postup A ³⁾	Postup B ⁴⁾		
Finanční náklady: 40 vzorků⁵⁾	1850 Kč	3380 Kč	1850 Kč	2710 Kč
Procesivita metody: 5 pracovních dnů⁶⁾	200	200	80	> 200
Náklady na 1 vzorek⁷⁾	46,25 Kč	84,50 Kč	46,25 Kč	67,80 Kč

1) Modified DAS-ELISA, 2) Standard DAS-ELISA, 3) Procedure A, 4) Procedure B, 5) Financial costs: 40 samples, 6) Method capacity: 5 working days, 7) Cost per 1 sample

Standardní metoda DAS-ELISA pro virus PPV od firmy Bioreba AG poskytuje vysokou citlivost, tudíž velmi spolehlivé výsledky. Maximální kapacita analyzovaných vzorků je 240 rostlin za pracovní týden při provedení dvou standardních testů DAS-ELISA (při práci jedné osoby, při zpracování dvou destiček za dva pracovní dny a čtyř destiček za tři pracovní dny, kdy jeden den jsou vzorky pouze navažovány a homogenizovány). Další možností je překryvné uspořádání dvoudenní metody DAS-ELISA v rámci jednoho pracovního týdne. Tímto způsobem lze provést až 4 diagnostické testy během týdne. Modifikovaná metoda (postup B) umožňuje analyzovat maximální počet vzorků 200 rostlin za pracovní týden (při práci jedné osoby, při zpracování jedné destičky za jeden pracovní den). Laboratoře mohou být schopné kapacitu analyzovaných vzorků individuálně navýšit, např. vyšším počtem pracovníků, přístrojů atd. Využití AgriStrip je ideální pro velice rychlé a jednoduché testování v terénu, ale s omezenou citlivostí. Pomocí AgriStrip lze během několika minut ve výsadbě provést konfirmační test na přítomnost viru nešovic peckovin u rostlin s viditelnými příznaky. Tento test není vhodný pro diagnostiku viru PPV v rozmnožovacím rostlinném materiálu, kde je kritické detekovat virus již v nízkých koncentracích. Pokud je k dispozici laboratorní zázemí, lze doporučit nahrazení AgriStrip postupem A, který není sice tak citlivý jako postup B a standardní metoda, ale oproti AgriStrip je stále výrazně citlivější a levnější.

ZÁVĚR

DAS-ELISA je robustní a snadno proveditelná metoda. Detekční soupravy DAS-ELISA pro diagnostiku rostlinných virů jsou v současnosti komerčně dostupné od řady společností. Nicméně diagnostická metoda DAS-ELISA se u jednotlivých výrobců může lišit svou délkou. Např. firma Agdia umožňuje provést diagnostický test touto metodou za 10 hodin, neboť lze dle jejich návodu zkrátit inkubaci extraktu přes noc za chladu na 2 hod při pokojové teplotě (Agdia, 2020). Provedení testu by ovšem vyžadovalo 12hodinovou směnu, tudíž navýšení nákladů na personál a provoz laboratoře. Firma SEDIAG nabízí provedení testu metodou DAS-ELISA přibližně za 22 hodin, což opět vyžaduje 2 dny k provedení analýzy (SEDIAG 2022). Firma Agritest nabízí modifikovaný postup detekce PPV metodou DAS-ELISA, kterým lze získat výsledky během jednoho pracovního dne. Nicméně upozorňuje, že citlivost metody je snížena oproti standardnímu dvoudennímu postupu. V naší práci jsme prokázali, že pomocí upravené metody DAS-ELISA od firmy Bioreba AG lze získat výsledky během jednoho pracovního dne za 8,5 hodiny a bez negativního dopadu na kvalitu detekce.

PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za finanční podpory RO1524 poskytnuté Ministerstvem zemědělství České republiky. Poděkování patří paní laborantce Lucii Zálešákové za precizní práci odvedenou při realizaci experimentů v laboratoři ELISA.

LITERATURA

- AGDIA. *User Guide: DAS-ELISA Reagent Set. Plum pox virus (PPV)*. Online. In: Agdia, Inc. Revised: 22. 9. 2020. Dostupné z: <https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/37/75/b1f0927d20edb41d5bd710c6be71.pdf>. [cit. 2024-08-27].
- BIOREBA AG. *Technical Information: Double antibody sandwich enzyme-linked. Version: 5*. Online. In: BIOREBA AG. 20. 6. 2021. Dostupné z: https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/37403570340037003560369035003210360036603690356035303520350032003260/ELISA_Test_procedure_e_f_d_es_und_pl_120523.pdf. [cit. 2024-08-27].
- BIOREBA AG. *Product Information: AgriStrip. Plum pox virus (PPV; Sharka). PPV AgriStrip - a rapid assay for the detection of Plum pox virus (PPV)*. Version: 4. Online. In: BIOREBA AG. 13. 9. 2018. Dostupné z: https://www.bioreba.ch/saas/CustomUpload/37403570340037003560369035003210360036603690356035303520350032003260/PPV_AgriStrip.pdf. [cit. 2024-08-27].
- BOONHAM, N.; KREUZE, J.; WINTER, S.; VAN DER VLUGT, R.; BERGERVOET, J.; TOMLINSON, J. a MUMFORD, R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. Online. *Virus research*. 2014, vol. 186, p. 20–31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>. [cit. 2024-08-27].
- CAMBRA, M.; CAPOTE, N.; CAMBRA, M. A.; LLÁCER, G.; BOTELLA, P. a LÓPEZ-QUÍLEZ, A. Epidemiology of sharka disease in Spain. Online. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2006, vol. 36, p. 271–275. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00986.x>. [cit. 2024-08-27].
- CLARK, M. F. a ADAMS, A. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 1977, 34(3), 475–483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>. [cit. 2024-08-27].
- EPPO. PM 7/32 (2) Plum pox virus. *EPPO Bulletin*, 2023, vol. 53, n. 3, p. 518–539. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/epp.12948>. [cit. 2024-08-27].

- NG, J. C. K. a PERRY, K. L. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular plant pathology*. 2004, vol. 5.5, p. 505511. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>. [cit. 2024-08-27].
- POLÁK, J. *et al.* Šarka švestky – historie choroby v ČR, Evropě a ve světě, virus šarky švestky, jeho vlastnosti, hostitelský okruh, přenos, šíření, epidemiologie, škodlivost a metody ochrany, mezinárodní projekt SharCo 7. RP EU. In: Polák J. *et al.* Šarka peckovin – současný stav problematiky v České republice a v Evropě. Praha: VÚRV, 2010, s. 11–21. ISBN: 978-80-7427-039-0.
- SEDIAG. *Formulaire: F-05-I-KIT-08_1U-DAS-PA-en_V02*. Online. In: SEDIAG SAS. 25. 8. 2022. Dostupné z: https://sediag.fr/wp-content/uploads/2021/06/F-05-I-KIT-08_1U-DAS-PA-en_V02.pdf. [cit. 2024-08-27].