

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 1 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

Opgesteld door:	Goedgekeurd door:	Geldig vanaf:
De Jonghe Kris	KC	09/07/2018

1. DOEL VAN DE METHODE	2
2. PRINCIPE VAN DE METHODE.....	2
3. GEBRUIKT REFERENTIEMATERIAAL.....	2
4. GEBRUIKTE MATRIX.....	3
5. GEBRUIKTE APPARATUUR.....	3
6. TE VALIDEREN PARAMETERS EN CRITERIA WAARAAN ZE MOETEN VOLDOEN	3
7. TIMING	7
8. RESULTATEN EN VERWERKING.....	8
9. BESPREKING EN CONCLUSIE - GOEDKEURING.....	24
10. GEBUIKTE DOCUMENTEN.....	21

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 2 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

1. DOEL VAN DE METHODE

Dit validatierapport beschrijft de validatie van het aantonen van de aanwezigheid van het tomatengeelkrulbladvirus – Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in bladeren van tomaat (*Solanum lycopersicum*). Deze methode geldt als bevestigingsmethode van de stalen die als positief uit de TAS-ELISA screeningsmethode worden beoordeeld (W03V09, Algemene ELISA procedure).

Het protocol van de bevestigingsmethode W03V05 (Protocol qPCR TYLCV detectie) start met de gehomogeniseerde stalen uit de screening, zoals beschreven in W03V09.

De validatie werd uitgevoerd met de gangbaar voorkomende stammen van TYLCV: TYLCV, TYLCV-II (Israël), TYLCSV (Sardinia); TYLCV-Mild (Mild) en TYLCV-rec (recombinant). Volgens de leverancier van de reagentia (Adgen) zijn de antilichamen ook bruikbaar tegen de TYLCV-C (China) stam, maar hiervan is geen isolaat beschikbaar om in de validatie mee te nemen. De scope werd aldus vernauwd naar de Europese isolaten zoals ze werden meegenomen in de validatie.

2. PRINCIPE VAN DE METHODE

Het schematisch verloop en het beslissingsproces van het diagnostisch protocol is gebaseerd op het EPPO diagnostisch protocol voor gereguleerde organismen, "EPPO Diagnostic protocol for regulated pests : TYLCV and ToMoV (anonymous)" PM 7/50 (EPPO Bulletin 34, 271-273). Voor de qPCR zelf werd geopteerd om gebruik te maken van de methode die gevalideerd werd in het EUPHRESKO project "Validation of diagnostic methods for the detection and identification of whitefly transmitted viruses of regulatory or quarantine concern to the EU". Voor details over deze validatie wordt naar het project rapport verwezen. Het ILVO, labo virologie, was één van de partners in dit project en nam dus ook deel aan de verschillende ringtesten die in dit kader werden georganiseerd.

3. GEBRUIKT REFERENTIEMATERIAAL

<i>Tomato yellow leaf curl virus - mild</i> (TYLCV)	G. Anfoka – origine: Jordanië	RefV_TY-LCV_01
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)	G. Anfoka – origine: Jordanië	RefV_TY-LCV_02
<i>Tomato yellow leaf curl virus - mild</i> (TYLCV)	DSMZ – PV-0560 – origine Israël	RefV_TY-LCV_03
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)	DSMZ – PV-0596 – origine Spanje	RefV_TY-LCV_04
<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i> (TYLCSV)	G. Anfoka – origine: Jordanië	RefV_TY-LCV_05
<i>Tomato yellow leaf curl virus – mild+Israël</i> (TY-LCV)	G. Anfoka – origine: Jordanië	RefV_TY-LCV_06
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Euphresco THREE – MAF-NZ – non NZ origin	RefV_TY-LCV_07
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Euphresco EIGHT – ARI-CY – Cyprus	RefV_TY-LCV_08
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Euphresco B – FERA UK – Spanje	RefV_TY-LCV_09
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Euphresco FOURTEEN – PPS-NI - CY – Nederland	RefV_TY-LCV_10

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 3 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	Euphresco E -FERA UK – Spanje	RefV_TYLCV_11
<i>Tomato yellow leaf curl virus Israël (TYLCV)</i>	Murad Ghanim, Israël	RefV_TYLCV_12
<i>Tomato yellow leaf curl virus - mild (TYLCV)</i>	DSMZ – PV-0588	RefV_TYLCV_13
<i>Tomato yellow leaf curl virus - mild (TYLCV)</i>	DSMZ – PV-0561	RefV_TYLCV_14
<i>Tomato yellow leaf curl virus - mild (TYLCV)</i>	BIOREBA - 223897	RefV_TYLCV_15
<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	Accotto – Italie – 02/02/10	RefV_TYLCV_16
<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	Accotto – Italie - 02/02/10	RefV_TYLCV_17
<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	Verlodt – Tunesie – 02/08/10	RefV_TYLCV_18
<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	DSMZ – PV - 0595	RefV_TYLCV_19

Voor de meeste validatietesten werd gewerkt met RefV_TYLCV_18, een isolaat afkomstig uit Tunesië waarvan een geïnfecteerde plant beschikbaar is in de serre. Hierdoor kan voor dit isolaat steeds beroep worden gedaan op vers plantenmateriaal.

4. GEBRUIKTE MATRIX

Bladeren van *Solanum lycopersicum* – tomaat.

5. GEBRUIKTE APPARATUUR

Voor de gebruikte apparatuur tijdens de validatie wordt verwezen naar W03V05, Detectie van *Tomato yellow leaf curl virus* (tomatengeelkrulbladvirus – TYLC(S)V) via de éénstaps qRT-PCR methode.

6. TE VALIDEREN PARAMETERS EN DE CRITERIA WAARAN ZE MOETEN VOLDOEN

Om de te valideren parameters vast te leggen werd deels gesteund op “Toelichtend document voor de validatie van detectiemethoden van plantpathogenen en –aantasters” van Van der Vlugt et al. (DC/L/V/Q&S_08) (Fig. 1) en deels op het recent gepubliceerde EPPO diagnostics document “Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity” (DC/L/V/Q&S_09).

Het resultaat van de qPCR wordt kwalitatief geïnterpreteerd omdat het alleen gaat om de afwezigheid of de vermoedelijke aanwezigheid van het virus in het bladmateriaal, en niet om de hoeveelheid. Voor de beoordeling wordt in document W03V05 (bevestigingstest *Tomato yellow leaf curl virus* via qRT-PCR) een vaste Ct/Cq gehanteerd van 35. Vanaf een Ct gelijk of hoger dan 35 wordt het resultaat als negatief beschouwd. Dit geldt enkel onder de in W03V05 vastgelegde regels. Deze regels zijn deels gebaseerd op de resultaten van de validatietesten, deels op basis van de richtlijnen van de leverancier van het toestel aan bijhorende software (SDS2.4) en deels op basis van ervaring en internationale conventie.

In dit validatierapport zijn alle technische gegevens en registraties betreffende de verschillende analyses die onderdeel uitmaken van de validatie van de qRT-PCR procedure voor TYLCV toegevoegd als bijlagen. Het betreft traceerformulieren en outprints van de analyse met de SDS software.

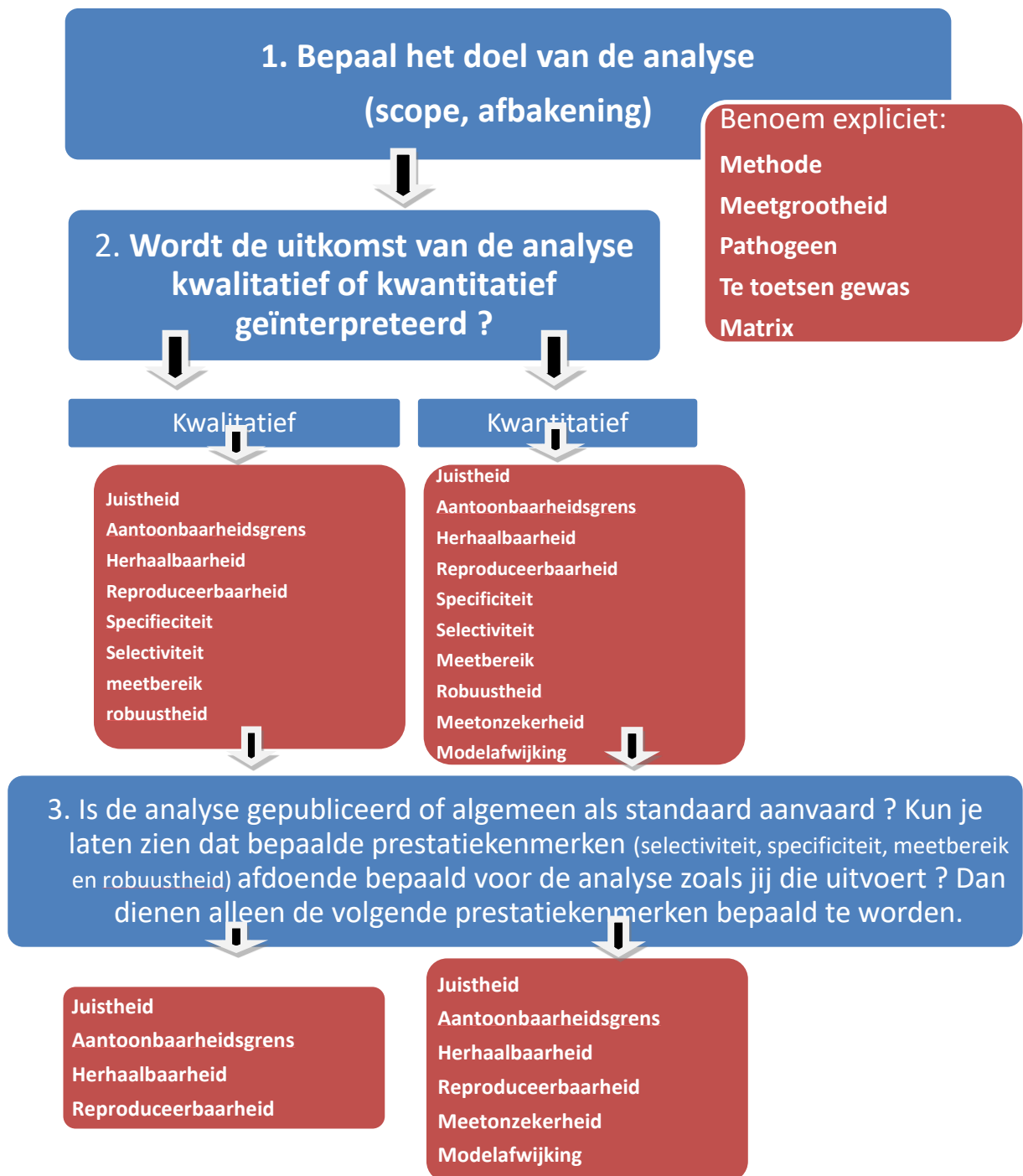


Fig. 1. Stroomdiagramma validatie van analyses (van der Vlugt et al, 2007)

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 5 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

6.1 Aantoonbaarheidsgrens en analytische gevoeligheid

De aantoonbaarheidsgrens is **de laagste concentratie van de component in het laboratoriummonster waarvan de aanwezigheid nog met een bepaalde betrouwbaarheid kan worden vastgesteld**. De aantoonbaarheidsgrens kan bij de detectie van plantpathogenen niet altijd absoluut worden vastgesteld. Vaak wordt de aantoonbaarheidsgrens gedefinieerd in termen van “de kleinste aan te tonen hoeveelheid”.

Hierbij wordt gesteld dat voor een real-time PCR methode, die gebruikt wordt voor de detectie van een plantschadelijk organisme, enkel een relatieve analytische gevoeligheid en geen absolute analytische gevoeligheid van toepassing is.

Volgende stappen werden gevolgd om in het specifieke qRT-PCR protocol zoals het wordt uitgevoerd in functie van de scope, en beschreven in W03V05, de aantoonbaarheidsgrens te bepalen (naar PM7/98; EPPO, 2010):

- Drie experimenten met de bepaling van de aanwezigheid van de target, hier TYLCV, in een positief staal van dezelfde matrix. Deze dient uitgevoerd te worden op een seriële verdunning van het staal, met telkens voor elke verdunning uitvoering van de qPCR methode in duplo.

6.2 Selectiviteit en analytische specificiteit

Omschrijving van de betrokken grootheden van de parameters specificiteit en selectiviteit:

- Selectiviteit. Mogelijke invloed van de matrix op de analytische gevoeligheid. Mogelijke invloed van verschillende tomatensoorten en cultivars op de analytische gevoeligheid van de qPCR methode.
- Analytische specificiteit. Invloed van andere gerelateerde pathogenen (virussen, virussen uit dezelfde groep (hier begomovirussen)) die mogelijk aanwezig zijn in de matrix en die een invloed kunnen hebben op de primer-activiteit. Anders gezegd: mogelijke kruisreacties die kunnen optreden in de test.

De methode werd gevalideerd binnen het EUPRESCO project “Validation of diagnostic methods for the detection and identification of whitefly transmitted viruses of regulatory or quarantine concern to the EU”. Er werden geen problemen met de - selectiviteit en analytische specificiteit van de primers in het qRT-PCR protocol opgemerkt.

6.3 Herhaalbaarheid

Definitie: de mate van overeenstemming tussen de resultaten van opeenvolgende metingen van dezelfde meetgrootte, die onder dezelfde meetomstandigheden zijn verricht. De procedure dient bestand te zijn tegen kleine onverwachte variaties die in de wijze van uitvoering onder routinematige omstandigheden kunnen optreden.

In de praktijk betekent dit dat er nagegaan wordt in hoeverre er spreiding in de uitslag van de analyses voorkomt bij de uitvoering binnen één laboratorium, door dezelfde persoon met dezelfde apparatuur.

Deze parameter is ook een weergave van de mate van onzekerheid op de analyseresultaten.

Tijdens de validatie werd:

- de herhaalbaarheid van de analyseprocedure bepaald **op stalen van diverse oorsprong** die een **verschillende concentratie** (met betrekking tot de analytische gevoeligheid van

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 6 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

de resultaten) van verschillende stammen van het doelorganisme bevatten. Hiervoor werd de test met dezelfde apparatuur door dezelfde persoon verschillende malen uitgevoerd (ander tijdstip).

- de herhaalbaarheid van de analyseprocedure binnen een substaal in de test bepaald door het staal in veelvoud (minstens 8) mee te nemen in de analyseprocedure. Op die manier kan de **standaard afwijking op de herhaling van de meetresultaten binnen één experiment worden bepaald.**

6.4 (Binnen-labo)reproduceerbaarheid

Definitie: mate van overeenstemming tussen de meetresultaten van dezelfde meetgrootte, verkregen onder wisselende meetomstandigheden.

In de praktijk betekent dit dat de hele procedure voor de qRT-PCR test, zoals beschreven in W03V05 (bevestigingstest *Tomato yellow leaf curl virus* via eenstaps-qRT-PCR), diverse malen moet herhaald worden, zonder dat de resultaten tussen de herhalingen mogen afwijken. De herhalingen moeten op verschillende dagen door verschillende mensen met eventueel verschillende apparatuur, uitgevoerd worden. Voor de testen worden bij voorkeur geïnficeerde monsters uit de praktijk gebruikt.

Deze parameter wordt op dezelfde wijze bepaald als de herhaalbaarheid, maar door verschillende operator en op een ander tijdstip. Dus ook hier wordt de herhaalbaarheid van de analyseprocedure bepaald op stalen van diverse oorsprong die een lage concentratie (met betrekking tot de analytische gevoeligheid van de resultaten) van verschillende stammen van het doelorganisme bevatten. Ook de herhaalbaarheid van de analyseprocedure binnen een substaal in de test werd uitgevoerd door het staal in veelvoud (minstens 8) mee te nemen in de analyseprocedure. Op die manier kan de standaard afwijking op de herhaling van de meetresultaten binnen één experiment bepaald. Op basis van een gezamenlijke beoordeling met de testen die onder de parameter herhaalbaarheid werden uitgevoerd, kan een drempelwaarde worden vastgelegd boven welke afwijkingen in meetresultaten van een herhaling in de test (de duplowaarden) het resultaat als twijfelachtig moet worden gezien, en de test opnieuw moet worden uitgevoerd.

6.5 Meetbereik en robuustheid

- Meetbereik. Dit zijn de grenzen waarbinnen de analyse betrouwbaar kan worden toegepast. In sommige analyses werkt de analyseprocedure niet naar behoren onder/of boven een bepaalde concentratie van de pathogeen en dient er te worden bepaald binnen welk bereik de analyse functioneert. Deze parameter is uiteraard van veel groter belang indien ook een kwantitatieve beoordeling van de analyse gewenst is. Aangezien het virus enkel kwalitatief aangetoond dient te worden in een matrix van plantenmateriaal en niet in zijn zuivere vorm, zit de validatie van deze parameter omvat in de validatie van de aanbevolen verdunning van plantenweefsel in het extractiebuffer.
- Robuustheid. Dit is de mate van ongevoeligheid van het meetresultaat voor afwijkingen, omstandigheden en hoedanigheid van materialen. Vermits het genoom van TYLCV bestaat uit ssDNA betreft, werden zowel RNA als DNA extractiemethodes getest met het oog op de keuze van de beste extractiekit. Daarnaast werd ook de mogelijke invloed van de plaatsing van de reactie in de 96 well-plaat getest.



6.6 Juistheid

Dit betekent dat de test aantoont wat je aan wil tonen. De validatie van deze factor kan gebeuren door het analyseren van referentiemateriaal uit binnen- of buitenlandse referentiecollecties. Tijdens de validatie hiervan werden geen specificiteitsproblemen opgemerkt. In verschillende testen werd zowel de milde stam, een Israël stam, een Sardinia stam alsook een mengeling van de Isr + milde stam gebruikt. Hieronder wordt een gelfoto weergegeven van een gelelectroforesegel die gemaakt werd na een test met 6 referentie-isolaten, representatief voor het stammengamma dat zou kunnen worden aangetroffen op tomatenstalen van Europese origine. De 6 isolaten werden hierbij getest op TYLCV volgens de RT-PCR zoals beschreven door Accotto et al. (2000). Deze stammen worden ook gedetecteerd in de eenstaps-qRT-PCR zoals de beschreven in procedure W03V05. Hiervoor kan verwezen worden naar de resultaten onder de parameter robuustheid waar de extractiekit werd getest en waarin isolaten RefV_TYLCV01 tot 06, met uitzondering van RefV_TYLCV_05, betrokken waren.

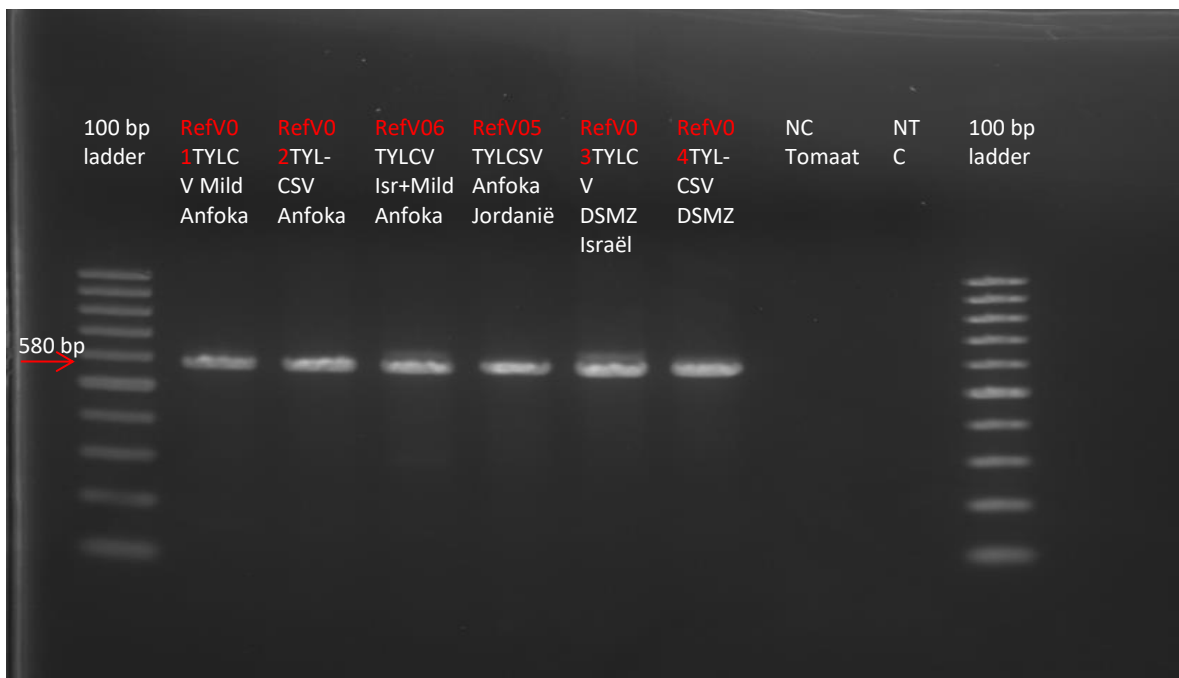


Fig. 2. Gelfoto van het resultaat van de controle RT-PCR van de 6 referentiestammen die in deze juistheidstesten voor de TAS-ELISA procedure werden gebruikt.

7. TIMING

De validatie van de verschillende parameters werd uitgevoerd in de periode maart 2012-augustus 2013.

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 8 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

8. RESULTATEN EN VERWERKING

8.1 Aantoonbaarheidsgrens en analytische gevoeligheid

Doel: Bepalen van de verdunning die de theoretische aantoonbaarheidsgrens benadert. In de experimenten onder deze paragraaf wordt ook de verdunning bepaald die de specifieke aantoonbaarheidsgrens (analytische aantoonbaarheidsgrens) benadert voor protocol W03V05 met de eraan verbonden vastgelegde drempelwaarde (Ct 35; arbitrair vastgelegd op basis van de literatuur en algemene conventies – zal geëvalueerd worden op basis van de validatieresultaten).

Uitvoering test 1: variatie op de meetwaarden van de metingen op gezonde plantensappen en op plantenmateriaal geïnfecteerd met TYLCV.

- De voorbehandeling van het materiaal werd steeds uitgevoerd zoals beschreven in protocol W03V09 (Algemene ELISA procedure). Na het nemen van een geschikt substaal werd via homogenisatie in ELISA extractiebuffer het staal voorbereid voor ELISA en RNA extractie.
- TYLCV validatietest 16/02/2012: NC blad tomaat (X14) en PC blad tomaat (RefV_TYLCV_03 (X14).
- Naast de detectie met de specifieke TYLCV probe werd ook telkens in evenveel herhalingen een interne controle (COX probe) meegenomen. In de test werden de individuele stalen zeven maal in tweevoud, over de hele plaat verspreid, ingebracht. Er werd geen randomisatie uitgevoerd, maar een bewuste plaatsing langs de verschillende randen en in het midden van de plaat. Dit liet toe om de invloed van de plaats in de plaat na te kunnen gaan. Naast het TYLCV vrije bladmateriaal werd ook een technische controle (mix + ddH2O) meegenomen.

Uitvoering test 2: Aantoonbaarheid van TYLCV in een verdunningsreeks van geïnfecteerd bladmateriaal in extractiebuffer. Deze test wordt minstens 3x uitgevoerd. Een deel van de testen werd ondergebracht onder de paragraaf herhaalbaarheid daar het herhalen van dit experiment ook op deze parameter van toepassing is.

- Homogeniseer een staal geïnfecteerde tomatenbladeren zoals beschreven in W03V09 met ELISA extractiebuffer.
- Maak een 10-voudige verdunningsreeks (10^0 tot 10^{-8}) in extractiebuffer.
- Sluit een positieve en negatieve controle mee in de test (1^{ste} lijnscontroles).
- Voer de RNA extractie uit met de RNeasy kit (QIAGEN) volgens het protocol van de leverancier (zie W03V07).
- Analyseer de verschillende stalen in 2-voud. Voer de analyse uit volgens het standaard protocol zoals beschreven in de werkinstructie qPCR TYLCV (W03V05).
- Bepaal de Ct-waarden volgens de vastgelegde analysemethode in W03V05.
- Herhaal de opzet 2x – 1x zelfde operator, 1x andere operator.
- Bepaal de aantoonbaarheid van TYLCV in het geïnfecteerd plantenweefsel in de verschillende verdunningen in vergelijking met de voorgeschreven verdunning.



Resultaat test 1

Alle Ct-waarden liggen hoger dan 35 voor elk individueel staal dat geen TYLCV bevat. Het is zelfs zo dat voor geen enkele reactie een verhoogd fluorescentiesignaal werd optepikt bij de standaardprocedure tot 40 cycli: alle waarden “undetermined”. Een variatie op de Ct-waarden is dan ook niet te berekenen. Dit betekent uiteraard ook dat voor geen enkel staal een fluorescentiesignaal werd waargenomen voordat de vastgelegde drempelwaarde van 35 cycli werd overschreden. Voor de test is het gemiddelde COX signaal $30,30 \pm 0,34$ voor het niet geïnfecteerde tomatenbladweefsel.

De variatie op een met RefV_TYLCV_03 geïnfecteerd plantenmateriaal (tomaat) is voor de 14 gelopen reacties ook beperkt. De gemiddelde Ct was $18,43 \pm 0,33$, met een hoogste Ct van 18,91 en een laagste waarde van 17,97. De variabiliteit op de meetresultaten voor deze 14 parallellen blijft dus beperkt tot minder dan 1 Ct. Ook de COX meetwaarden die meeliepen als interne controle waren bevredigend, en ook daar was de variabiliteit beperkt (Fig.).

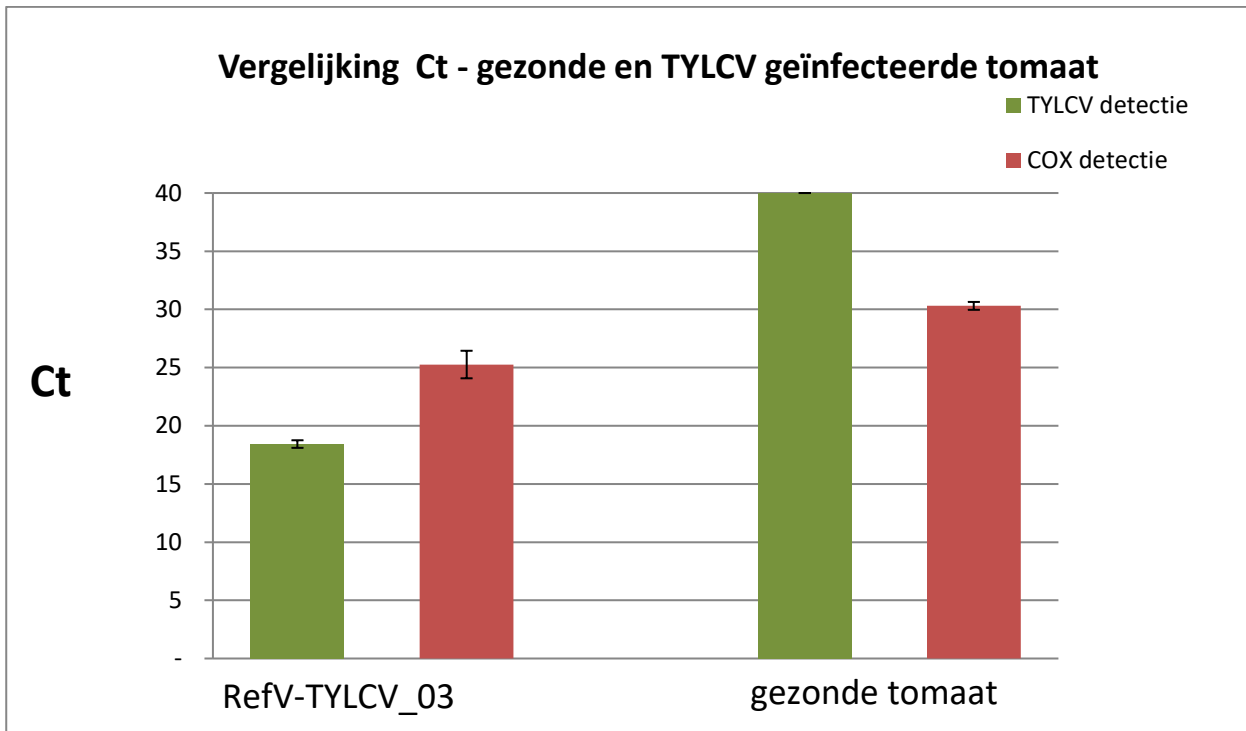


Fig. 3. Variabiliteit op 14 parallellen gezonde matrix en met TYLCV geïnfecteerde matrix + variabiliteit op de interne controle (COX).

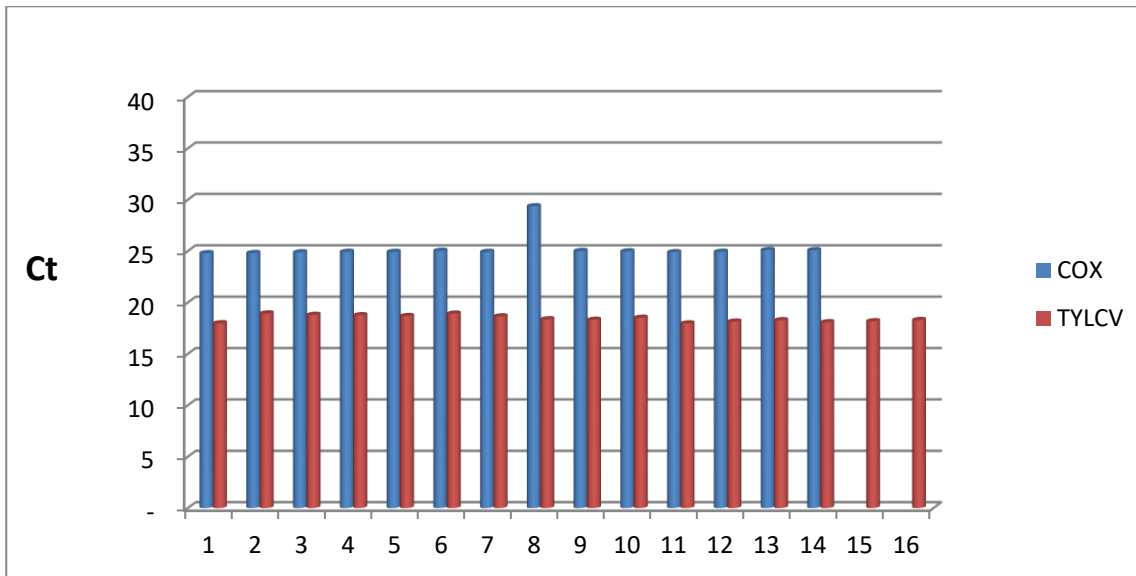


Fig. 4. Individuele COX en TYLCV detectiewaarden (Ct's) voor het geïnfecteerde bladmateriaal van tomaat.

Resultaat test 2:

In bijgevoegde tabel wordt een overzicht gegeven van de resultaten die bekomen werden in de 3 herhalingen. Deze werden uitgevoerd door Rachid Tahzima (RT) en Kris De Jonghe (KDJ).

Er kan gesteld worden dat bij het normaal volgen van de procedure het risico op valse negatieven heel beperkt is daar de aantoonbaarheidsgrens ten minste bij een 10^{-4} verdunning van het uitgangsmateriaal in extractiebuffer ligt. Elk van de meegenomen controles (RNA positieve controle referentiestaal, NTC (= no template controle of technische controle), interne controle (=COX) en gezond matrixmateriaal reageerden zoals verwacht.



Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR

Pagina 11 van 25

Doc: F16_V06

Versie : 09/07/2018

Tabel 1: Samenvattende tabel van de qPCR detectie ter bepaling van de aantoonbaarheidsgrens

AQ Results 1.0
 SDS 2.4
 Filename TYLCV Sensimix Cox Validatie Aantoonbaarh RT 230412
 PlateID
 Assay Type Absolute Quantification
 Run DateTime 23/04/2012 18:46
 Operator
 threshold **automatic 0.02234**

Well	Sample Name	Staalidentificatie	Detector Name	Reporter	Ct	Gemiddelde Ct	Stdev
4	A4	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	COX	VIC	18.14		
53	E5	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	COX	VIC	17.90	18.02	0.17
1	A1	RefV_TYLCV_18 onverdund	TYLCV	FAM	16.00		
50	E2	RefV_TYLCV_18 onverdund	TYLCV	FAM	14.93	15.46	0.76
16	B4	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	COX	VIC	21.68		
65	F5	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	COX	VIC	21.41	21.55	0.19
13	B1	RefV_TYLCV_18 dil-1	TYLCV	FAM	17.47		
62	F2	RefV_TYLCV_18 dil-1	TYLCV	FAM	16.96	17.21	0.36
28	C4	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	COX	VIC	25.32		
77	G5	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	COX	VIC	25.25	25.29	0.05
25	C1	RefV_TYLCV_18 dil-2	TYLCV	FAM	22.24		
74	G2	RefV_TYLCV_18 dil-2	TYLCV	FAM	22.59	22.41	0.24
40	D4	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	COX	VIC	28.30		
89	H5	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	COX	VIC	27.83	28.06	0.33
37	D1	RefV_TYLCV_18 dil-3	TYLCV	FAM	25.91		
86	H2	RefV_TYLCV_18 dil-3	TYLCV	FAM	25.86	25.89	0.03
6	A6	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	COX	VIC	30.72		
52	E4	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	COX	VIC	30.85	30.79	0.09
3	A3	RefV_TYLCV_18 dil-4	TYLCV	FAM	27.77		
49	E1	RefV_TYLCV_18 dil-4	TYLCV	FAM	28.55	28.16	0.55
18	B6	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	COX	VIC	33.21		
64	F4	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	COX	VIC	35.23	34.22	1.42
15	B3	RefV_TYLCV_18 dil-5	TYLCV	FAM	30.67		
61	F1	RefV_TYLCV_18 dil-5	TYLCV	FAM	31.04	30.85	0.26



Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR

Pagina 12 van 25

Doc: F16_V06

Versie : 09/07/2018

30	C6	RefV_TYLCV_18 dil-6	COX	VIC	37.48		
76	G4	RefV_TYLCV_18 dil-6	COX	VIC	undet.	undet.	undet.
27	C3	RefV_TYLCV_18 dil-6	TYLCV	FAM	35.59		
73	G1	RefV_TYLCV_18 dil-6	TYLCV	FAM	36.90	36.25	0.92
42	D6	RefV_TYLCV_18 dil-7	COX	VIC	37.10		
88	H4	RefV_TYLCV_18 dil-7	COX	VIC	34.61	35.86	1.76
39	D3	RefV_TYLCV_18 dil-7	TYLCV	FAM	undet.		
85	H1	RefV_TYLCV_18 dil-7	TYLCV	FAM	38.64	undet.	undet.
5	A5	RefV_TYLCV_18 dil-8	COX	VIC	undet.		
54	E6	RefV_TYLCV_18 dil-8	COX	VIC	undet.	undet.	undet.
2	A2	RefV_TYLCV_18 dil-8	TYLCV	FAM	undet.		
51	E3	RefV_TYLCV_18 dil-8	TYLCV	FAM	undet.	undet.	undet.
17	B5	Tomaat gezond	COX	VIC	20.63		
66	F6	Tomaat gezond	COX	VIC	20.89	20.76	0.19
14	B2	Tomaat gezond	TYLCV	FAM	38.04		
63	F3	Tomaat gezond	TYLCV	FAM	undet.	undet.	undet.
41	D5	NTC H2O	COX	VIC	undet.		
90	H6	NTC H2O	COX	VIC	undet.	undet.	undet.
38	D2	NTC H2O	TYLCV	FAM	undet.		
87	H3	NTC H2O	TYLCV	FAM	undet.	undet.	undet.
29	C5	RefV_TYLCV_01 RNA	COX	VIC	19.59		
78	G6	RefV_TYLCV_01 RNA	COX	VIC	19.56	19.58	0.02
26	C2	RefV_TYLCV_01 RNA	TYLCV	FAM	13.44		
75	G3	RefV_TYLCV_01 RNA	TYLCV	FAM	13.98	13.71	0.38

Controles

OK

Verdunningsreeks - aantoonbaarheidsgrens

Betrouwbaar tot en met dil -5

Conclusie:

- COX is bruikbaar als interne controle;
- De aantoonbaarheid van een standaard geïnfecteerde plant met duidelijke symptomen is stabiel tot en met verdunning 10^5 . Uiteraard is het zo dat bij een planteninfectie de concentratie virus in een plant sterk variabel kan zijn, en dus ook een stuk lager. Echter, dit is een vervolgtest op de duidelijk minder gevoelige ELISA procedure. Als we deze resultaten koppelen aan de ELISA validatieresultaten dan kan er kan gesteld worden dat de aantoonbaarheidsgrens een

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 13 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

stuk lager ligt dan bij de ELISA en dat voor een positieve screeningstest in de ELISA er geen gevaar is op een negatief resultaat op voor deze parameter. Hierbij wordt verwezen naar een vergelijkende test tussen ELISA en qPCR resultaten van verschillende referentiestammen op 06 & 07/08/2013. Voor RefV06 en RefV07 ligt de ELISA meting na 1 u nog in de twijfelzone en na 2u tussen 0.1 en 0.25 (drempelwaarde is 0.1). De Ct waarde van de qPCR op deze referentie-isolaten ligt rond de 15, ruim onder de drempelwaarde (35) en vergelijkbaar met het onverdunde startmateriaal van RefV_18 uit de bovenstaande test.

- *Drempelwaarde Ct 35: is aanvaardbaar voor gebruik in de praktijk.*
- *Niet met TYLCV geïnfecteerde planten geven geen signaal en de variatie op herhaalde metingen op een geïnfecteerde plant is beperkt tot < 1 Ct.*

8.2 Selectiviteit en analytische specificiteit

Geborgd door de auteur van de gebruikte qPCR methode, Powell et al. 2012, en gevalideerd binnen het EUPHRESKO project (zie hoger). Om een beeld te krijgen van de analytische specificiteit op basis van de interne procedure (vervolg op ELISA, infrastructuur en bekwaamheid van de medewerkers) werden tijdens de validatie van de methode op het ILVO verdunningsreeksen getest door verschillende operatoren en dat in meerdere herhalingen.

8.3 Juistheid

Er werd een zo breed mogelijke collectie van stammen aangelegd die binnen Europa (en België) het grootste risico op insleep vormen. Zo werden isolaten van Jordanië, Israël, Italië, Tunesië en Marokko bekomen. Behalve het Marokkaanse isolaat dat slechts recent in ons bezit zijn gekomen werden al deze isolaten, net zoals het ook het geval was voor de validatie van de ELISA procedure, betrokken bij de validatie van de real time PCR.

Verschillende isolaten werden ook herhaaldelijk gebruikt in de ELISA procedure zoals beschreven in W03V09. Voor alle referentieculturen geldt dat ze zonder fout in de ELISA en in de vervolgpcedure via qPCR werden gedetecteerd.

Regelmatig worden de referentie isolaten ook terug meegenomen in nieuwe testen om afbraak van het virus als gevolg van langdurige bewaring op verschillende manieren (extractiebuffer, N2, DNA) na te gaan. Indien afbraak wordt vastgesteld wordt het materiaal uit de opslag verwijderd, en eventueel vervangen door nieuw aangevraagd referentiemateriaal. Er wordt ook steeds een levende, met TYLCV geïnfecteerde, tomatenplant bijgehouden in het Q compartiment van de serre.

Een voorbeeld van resultaten van een test met verschillende referentiestammen die de juistheid van de test aantonen, werd opgenomen onder de parameter robuustheid. Hierbij werd de invloed van het gebruik van verschillende extractiekits nagegaan.

8.4 Herhaalbaarheid

8.4.1 Detectie van TYLCV met behulp van W03V05. De test wordt met voldoende parallellen en herhalingen uitgevoerd door dezelfde operator en met dezelfde referentiestalen.



Doel: Testen van de invloed van een herhaling op de meetresultaten bij het volgen van de standaard analyseprocedure.

Uitvoering

- Dezelfde referentiestalen als deze voor de test onder 8.1 (aantoonbaarheidsgrens) worden onderworpen aan de detectie volgens dezelfde procedure (W03V05) door dezelfde operator.

Herhaling van de aantoonbaarheidstest door RT:

Tabel 2: Samenvattende tabel van de herhaling van de qPCR detectie ter bepaling van de aantoonbaarheidsgrens

SDS 2.4 AQ Results 1
 Filename TYLCV FleSco Test RefVreezer Culturen RT 210813
 PlatelD
 Assay Type Absolute Quantification
 Run DateTime 21/08/2013 13:50
 Operator RT
 Automatic 0.0448 COX detector VIC reporter
 Automatic 0.0587 TYLCV detector FAM reporter

Sample Information

Well	Sample Name	Detector Name	Staalidentificatie	Ct	Gem. Ct	stdev
49	E1	COX	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	<i>20.24</i>		
50	E2	COX	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	<i>20.66</i>	<i>20.45</i>	<i>0.15</i>
1	A1	TYLCV	RefV_TYLCV_18 onverdund	16.83		
2	A2	TYLCV	RefV_TYLCV_18 onverdund	18.05	17.44	0.43
51	E3	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	<i>24.09</i>		
52	E4	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	<i>23.94</i>	<i>24.01</i>	<i>0.05</i>
3	A3	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-1	21.31		
4	A4	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-1	20.93	21.12	0.14
53	E5	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	<i>26.17</i>		
54	E6	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	<i>27.29</i>	<i>26.73</i>	<i>0.40</i>
5	A5	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-2	24.73		
6	A6	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-2	24.30	24.52	0.15



Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR

Pagina 15 van 25

Doc: F16_V06

Versie : 09/07/2018

55	E7	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	28.02		
56	E8	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	29.33	28.67	0.46
7	A7	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-3	25.56		
8	A8	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-3	25.82	25.69	0.09
58	E10	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	31.34		
57	E9	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	31.71	31.53	0.13
10	A10	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-4	26.11		
9	A9	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-4	26.60	26.36	0.17
59	E11	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	30.97		
60	E12	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	30.97	30.97	0.00
11	A11	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-5	28.68		
12	A12	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-5	29.25	28.96	0.20
61	F1	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-6</i>	31.00		
62	F2	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-6</i>	31.40	31.20	0.14
13	B1	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-6	29.12		
14	B2	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-6	28.77	28.95	0.12
63	F3	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-7</i>	31.88		
64	F4	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-7</i>	31.61	31.74	0.09
15	B3	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-7	29.14		
16	B4	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-7	29.19	29.16	0.02
65	F5	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	32.26		
66	F6	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	31.65	31.95	0.22
17	B5	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-8	28.95		
18	B6	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-8	28.67	28.81	0.10
67	F7	COX	<i>Tomaat gezond</i>	22.97		
68	F8	COX	<i>Tomaat gezond</i>	23.19	23.08	0.08
19	B7	TYLCV	Tomaat gezond	Undetermined		
20	B8	TYLCV	Tomaat gezond	Undetermined	Undetermined	
75	G3	COX	<i>RefV_TYLCV_04 onverdund (TYLCSV)</i>	24.96		
76	G4	COX	<i>RefV_TYLCV_04 onverdund (TYLCSV)</i>	24.99	24.97	0.01
27	C3	TYLCV	RefV_TYLCV_04 onverdund (TYLCSV)	18.89		
28	C4	TYLCV	RefV_TYLCV_04 onverdund (TYLCSV)	18.45	18.67	0.16



Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR

Pagina 16 van 25

Doc: F16_V06

Versie : 09/07/2018

91	H7	COX	RefV_TYLCV_16 RNA	19.95	
43	D7	TYLCV	RefV_TYLCV_16 RNA	14.57	
92	H8	COX	RefV_TYLCV_18 RNA	18.69	
44	D8	TYLCV	RefV_TYLCV_18 RNA	16.68163	
93	H9	COX	tomaat gezond RNA	Undetermined	
96	H12	COX	tomaat gezond RNA	Undetermined	Undetermined
45	D9	TYLCV	Tomaat gezond RNA	Undetermined	
48	D12	TYLCV	Tomaat gezond RNA	Undetermined	Undetermined
95	H11	COX	NTC H2O	36.969288	
47	D11	TYLCV	NTC H2O	Undetermined	Undetermined

Conclusie

In de analyseprocedure W03V09 (Algemene ELISA procedure) werd de “analytische gevoeligheid” vastgelegd op een OD₄₀₅ waarde van 0,100. Deze werd berekend op basis van standaard aanvaarde richtlijnen met als doel een ruime marge tussen negatieve en positieve waarden te creëren om zo de kans op valse positieven te minimaliseren. Deze marge bedraagt drie keer de standaardafwijking op de gemiddelde meetwaarden OD₄₀₅ van niet met TYLCV geïnfecteerde stalen.

Vervolgens wordt de procedure voor alle stalen verdergezet met W03V05 (Detectie van het tomatengeelkrulbladvirus (Tomato yellow leaf curl virus – TYLCV) via real-time RT-PCR). Methode W03V05 wordt dus niet als alleenstaande detectiemethode geaccrediteerd, maar wordt gebruikt als bevestigingstest, volgend op W03V09.

De resultaten van de onder deze paragraaf opgenomen experimenten ter validatie van de parameter “aantoonbaarheidsgrens en analytische gevoeligheid”, tonen aan dat bij de opgelegde procedure een voldoende ruime marge tussen gezond en ziek gehanteerd wordt om de kans op valse negatieven en valse positieven te minimaliseren. Dit geldt in het bijzonder bij monsters waarbij in een minder gevoelige test (cfr resultaten validatiedossier parameter robuustheid) reeds een vermoeden van aanwezigheid van TYLCV bestaat (reeds positief in de ELISA). Enkel als beide testen positief zijn, wordt de waardplant als geïnfecteerd beschouwd, en wordt de meldingsprocedure opgestart.

8.4.2. Herhaalbaarheid van de analyseprocedure binnen een substaal in de test

Doel. Bepalen van de standaard afwijking op de herhaling van de meetresultaten binnen één experiment

Uitvoering

- Voor deze test werden isolaat RefV_TYLCV_03 en gezond bladmateriaal gebruikt.
- De stalen werden in 14-voud en gerandomiseerd over de 96-well plaat ingebracht. Ook voor de COX detectie (interne controle) werd het staal in 14-voud de ingebracht om daarop de variatie na te gaan.

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 17 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

Resultaat en conclusies

Zie onder aantoonbaarheidsgrens en onder robuustheid.

8.5 (Binnen labo) reproduceerbaarheid

Herhaling van de uitvoering van de testen zoals beschreven onder “aantoonbaarheidsgrens” en onder “herhaalbaarheid”, maar door een andere uitvoerder (= operator) dan de testen die werden uitgevoerd onder de twee vorige parameters.

- Het experiment dat werd uitgevoerd in het kader van het aantonen van de reproduceerbaarheid is hetzelfde als weergegeven onder de parameter “herhaalbaarheid” (daar uitgevoerd door RT). Hierbij werd de volledige procedure, inclusief RNA extractie, uitgevoerd door een andere operator (KDJ).
- De testen voor de aantoonbaarheidsgrens werden uitgevoerd door RT en KDJ.
- Alle stalen werden in 2-voud gerandomiseerd over de 96-well plaat ingebracht. Om de variatie in de interne controle na te gaan werd het staal ook in tweevoud in gebracht voor de COX detectie.

Resultaat

Deze test werd uitgevoerd voor hetzelfde referentiestaal RefV_TYLCV_18 als gebruikt in de testen voor de parameters “aantoonbaarheidsgrens” en “herhaalbaarheid”, maar zoals het doel van deze parameter omschrijft door een andere operator.

Er werden opnieuw geen problemen ondervonden om TYLCV aan te tonen wanneer de test wordt uitgevoerd zoals beschreven in W03V05 (Detectie van het tomatengeelkrulbladvirus (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) via real-time RT-PCR) (zie Tabel 3).

Tabel 3: Samenvattende tabel van de resultaten van de qPCR detectie ter bepaling van de aantoonbaarheidsgrens door een andere operator dan onder de parameters aantoonbaarheidsgrens en onder herhaling.

SDS 2.4	AQ Results	
Filename	TYLCV reproduceerbaarheid _kdj_21-08-2013	
PlateID		
Assay Type	Absolute Quantification	
Run DateTime	21/08/2013 15:45	
Operator	KDJ	
Automatic Ct	0.38386	COX: VIC reporter
Automatic Ct	0.20284	TYLCV: FAM reporter



Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR

Pagina 18 van 25

Doc: F16_V06

Versie : 09/07/2018

Id	Sample Name	Detec	Staalidentificatie	Ct	gem Ct	stdev
25	C1	COX	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	23.24		
37	D1	COX	<i>RefV_TYLCV_18 onverdund</i>	23.04	23.14	0.14
1	A1	TYLCV	RefV_TYLCV_18 onverdund	18.59		
13	B1	TYLCV	RefV_TYLCV_18 onverdund	18.65	18.62	0.04
26	C2	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	25.07		
38	D2	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-1</i>	25.07	25.07	0.00
2	A2	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-1	20.37		
14	B2	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-1	20.39	20.38	0.01
27	C3	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	27.61		
39	D3	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-2</i>	27.60	27.60	0.01
3	A3	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-2	22.41		
15	B3	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-2	22.91	22.66	0.35
28	C4	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	30.31		
40	D4	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-3</i>	30.26	30.29	0.04
4	A4	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-3	25.06		
16	B4	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-3	25.03	25.05	0.02
29	C5	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	32.20		
41	D5	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-4</i>	32.44	32.32	0.17
5	A5	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-4	26.77		
17	B5	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-4	27.36	27.06	0.42
30	C6	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	33.63		
42	D6	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-5</i>	33.95	33.79	0.22
6	A6	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-5	28.97		
18	B6	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-5	29.37	29.17	0.28
31	C7	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-6</i>	<i>Undetermined</i>		
43	D7	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-6</i>	35.37	35.37	
7	A7	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-6	29.93		
19	B7	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-6	29.82	29.88	0.08
32	C8	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-7</i>	33.98		
44	D8	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-7</i>	34.08	34.03	0.07
8	A8	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-7	30.06		
20	B8	TYLCV	RefV_TYLCV_18 dil-7	30.03	30.04	0.02



33	C9	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	34.92		
45	D9	COX	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	35.10	35.01	0.12
9	A9	TYLCV	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	31.55		
21	B9	TYLCV	<i>RefV_TYLCV_18 dil-8</i>	31.38	31.46	0.12
34	C10	COX	<i>Tomaat gezond</i>	24.70		
46	D10	COX	<i>Tomaat gezond</i>	24.72	24.71	0.01
10	A10	TYLCV	<i>Tomaat gezond</i>	37.14		
22	B10	TYLCV	<i>Tomaat gezond</i>	36.59	36.87	0.39
35	C11	COX	<i>NTC H2O</i>	<i>Undetermined</i>		
47	D11	COX	<i>NTC H2O</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>
11	A11	TYLCV	<i>NTC H2O</i>	<i>Undetermined</i>		
23	B11	TYLCV	<i>NTC H2O</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>	<i>Undetermined</i>
36	C12	COX	<i>RefV_TYLCV_18 RNA</i>	23.91		
48	D12	COX	<i>RefV_TYLCV_18 RNA</i>	23.61	23.76	0.21
12	A12	TYLCV	<i>RefV_TYLCV_18 RNA</i>	18.44		
24	B12	TYLCV	<i>RefV_TYLCV_18 RNA</i>	19.04	18.74	0.43

Conclusie

De reproduceerbaarheid, zowel op de qPCR test in zijn geheel, als enkel voor de extractie, zijn zeer goed (zie figuur hierboven en onder de parameter "herhaalbaarheid"). De extractie en detectie van een reeks TYLCV isolaten van diverse oorsprong resulteren in gelijkaardige resultaten bij het uitvoeren van protocol W03V05. Dit geldt voor verschillende operatoren en op verschillende tijdstippen.

8.6 Robuustheid

Methodevalidatie van test van W03V05 als vervolgtest op ELISA (bevestigingstest) met RNA-of DNA extractie vanuit ELISA extractiebuffer.

De resultaten van deze methodevalidatie zijn ook van toepassing voor de parameter juistheid daar een bewuste spreiding werd gekozen van de verschillende stammen in de collectie op die op het ILVO aanwezig is. Verder wordt deze test ook gebruikt als controle van de referentie-isolaten die als bladmateriaal werden opgeslagen en bewaard bij -80°C.

Doel. validatie van de DNA/RNA extractie vertrekkend van gehomogeniseerd bladmateriaal in ELISA extractiebuffer afkomstig van de standaard staalvoorbereiding zoals beschreven in W03V09. Aangezien het genetisch materiaal van TYLCV uit enkelstrengig DNA bestaat werd er gekozen voor de vergelijking van twee DNA extractie kits en een RNA extractiemethode.,

Uitvoering.

1. Uitvoeren van de TAS-ELISA procedure op 8 referentiestalen uit de -80°C (gehomogeniseerd geïnfecteerd bladmateriaal van tomaat) + 1 referentiestaal op levend tomatenweefsel volgens geaccrediteerde procedure W03V09.
2. RNA extractie met de RNeasy Kit (QIAGEN) en DNA extractie met de DNeasy kit (QIAGEN) en de Invisorb DNA kit (Invitek).
3. Vervolgtest. qPCR detectie van het Tomato yellow leaf curl virus volgens opgelegde methode W03V05. Als interne controle wordt standaard COX meegenomen.

Tabel 4. Samenvattende resultaten

	DNeasy	Invisorb DNA	RNeasy	DNeasy	Invisorb DNA	RNeasy	DNeasy	Invisorb DNA	RNeasy
	Gemiddelde Ct waarden			Standaard afwijkingen					
RefV_TYLCV_01	17.64	20.10	15.69	17.71	20.02	15.66	0.099	0.107	0.038
RefV_TYLCV_01	17.78	19.95	15.64						
RefV_TYLCV_02	35.19	34.28	30.59	35.43	34.00	30.78	0.339	0.390	0.273
RefV_TYLCV_02	35.67	33.73	30.98						
RefV_TYLCV_03	18.15	15.04	13.06	18.14	15.00	12.92	0.017	0.051	0.187
RefV_TYLCV_03	18.12	14.97	12.79						
RefV_TYLCV_04	36.96	29.34	31.24	36.89	29.45	31.41	0.097	0.157	0.241
RefV_TYLCV_04	36.82	29.57	31.58						
RefV_TYLCV_06	21.95	23.69	19.79	21.66	23.78	19.64	0.402	0.125	0.214
RefV_TYLCV_06	21.38	23.86	19.49						
RefV_TYLCV_16	33.86	32.28	30.95	33.87	32.16	30.72	0.012	0.163	0.322
RefV_TYLCV_16	33.88	32.05	30.49						
RefV_TYLCV_17	16.29	17.03	13.95	16.48	17.11	13.83	0.267	0.110	0.172
RefV_TYLCV_17	16.66	17.19	13.71						
RefV_TYLCV_18	18.07	17.04	14.09	17.98	17.07	13.81	0.119	0.052	0.385
RefV_TYLCV_18	17.90	17.11	13.54						
NC			Undetermined						
NC			Undetermined						
NTC			Undetermined						
NTC			Undetermined						
Positieve controle RNA			14.49			14.45			0.070
Positieve controle RNA			14.40						
RefV_TYLCV_18			14.00			13.94			0.083
RefV_TYLCV_18			13.88						

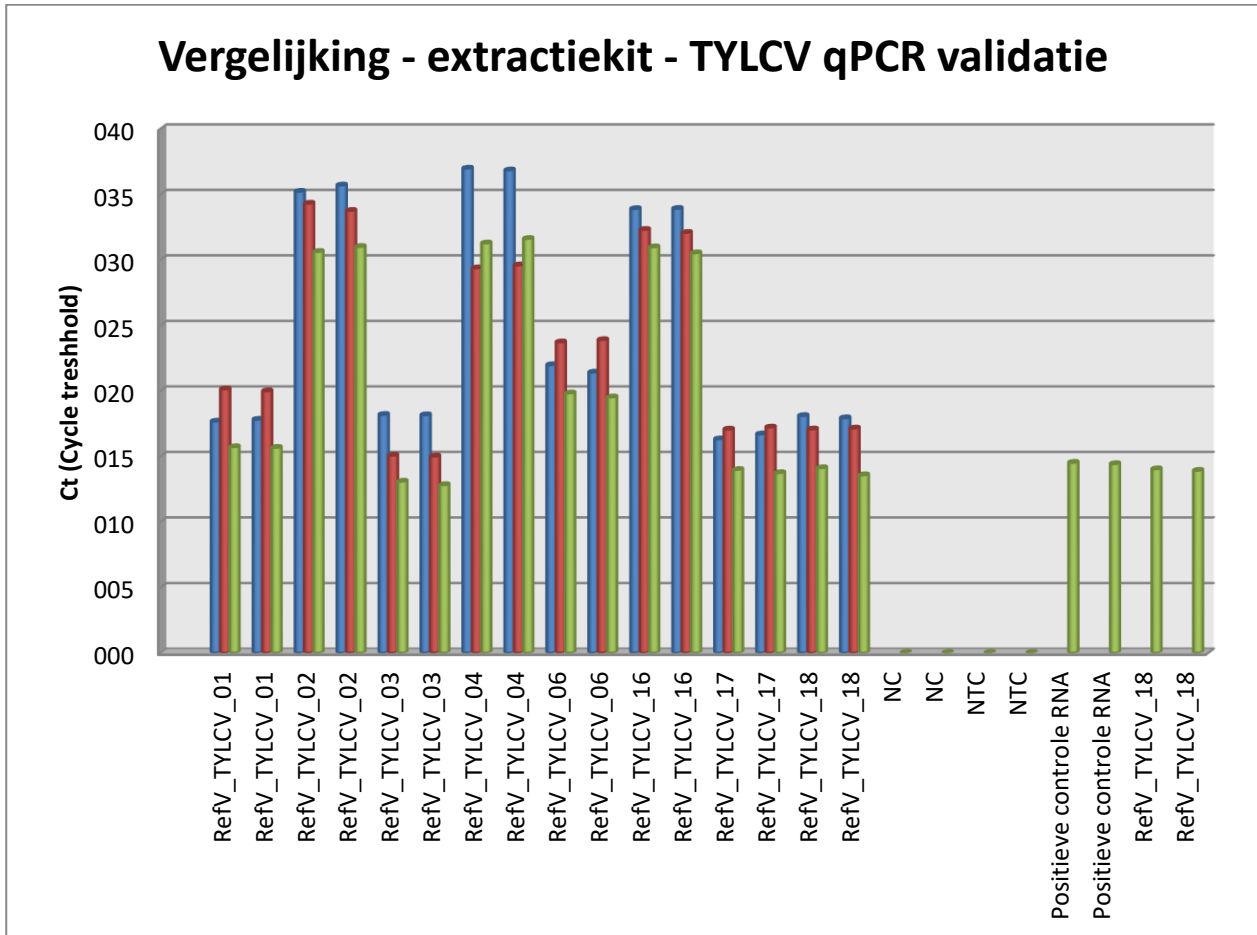


Fig. 5 Vergelijking van 2 DNA extractiekits en een standaard RNA extractiekit voor de detectie van TYLCV via real time PCR methode.

LEGENDE – Blauwe balken: Dneasy; Rode balken: invisorb DNA; Groene balken: Rneasy.

In aanvulling van de experimenten die werden uitgevoerd in het kader van de validatie van de ELISA procedure, werden net zoals voor PPV enkel nog het effect van de randeffecten in de plaat opnieuw bekeken.

Doel. nagaan van mogelijke afwijkingen van de meetwaarden binnen de 96-well plaat, ondanks het feit dat de specificaties van het toestel geborgd worden door de leverancier.

Uitvoering.

- Zie onder aantoonbaarheid (plaatsing van de monsters in de 96-well PCR plaat).

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 22 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

Resultaat

De resultaten van deze test werden reeds opgenomen onder aantoonbaarheidsgrens. De variatie op de resultaten in functie van de plaats op de plaat (rand, midden, boven, onder, links, rechts) bleef beperkt voor stalen van diverse met TYLCV geïnfecteerde tomaten en gezonde matrix. Zie hoger en het traceerformulier voor details (layout en resultaten).

Conclusie

Vergelijking van de drie extractiemethodes toont een verschil in gevoeligheid aan voor de real time PCR procedure en bevestigt de juistheid van de qPCR methode.

De keuze van de extractiekit blijkt roch belangrijk waarbij het gebruik van de RNeasy kit gemiddeld een lagere Ct (Cq) waarde oplevert dan de invisorb DNA kit en de DNeasy kit. Er zal dus bij het uitvoeren van protocol W03V05 gebruik gemaakt worden van de RNeasy kit om de kans op valse negatieven in het grenswaardegebied (bij lage TYLCV concentraties) te minimaliseren.

Extractie vanuit het gehomogeniseerde matrixmateriaal in ELISA extractiebuffer blijkt betrouwbaar en bruikbaar als vertrekbasis voor de qPCR procedure. Ze zal als dusdanig worden opgenomen in de W03V05 procedure.

Het protocol is robuust genoeg om verschillen in plaatsing van de duplo stalen en controles binnen de plaat, ook rand of midden, op te vangen. De plaatsing heeft geen invloed op het resultaat.

ROBUUSTHEID:

Vergelijking BIO-RAD cfx96 & ABI7900HT

Uitvoeringsdatum 06/11/2015 – Inge De Roo

In het najaar 2015 werd omwille van de stopzetting van de technische ondersteuning van het ABI7900HT toestel van Applied Biosystems in 2016 een BIO-RAD cfx96 module gekocht die het moet mogelijk maken om het uit dienst stellen van de ABI7900HT op te vangen.

Er werden verschillende vergelijkende testen uitgevoerd, parallel aan elkaar, op het ABI7900HT toetsel en het BIO-RAD toestel. Nagenoeg allemaal deze testen geven voor de BIO-RAD waarden weer die tussen de 2 en 3 Ct's hoger liggen dan het parallelle resultaat in de ABI7900HT. De duplo's geven stabiele waarden.

Onderstaand tabel is een voorbeeld van dergelijk resultaat voor de detectie van TYLCV.

TYLCV (Reporter: FAM)	AB				Bio-Rad			
Sample Name	Ct	Ct Median	Ct Mean	Ct StdDev	Ct	Ct Median	Ct Mean	Ct StdDev
NC extr	Undetermined				-	-	-	-
NC extr	Undetermined				-	-	-	-
NC qPCR	Undetermined				-	-	-	-
NC qPCR	35,58				38,49	-	-	-
NTC	Undetermined				-	-	-	-



NTC	Undetermined				-	-	-	-
NTC	Undetermined				-	-	-	-
NTC	Undetermined				-	-	-	-
PC extr	13,94	14,16	14,16	0,32	16,58	16,72	16,72	0,14
PC extr	14,39	14,16	14,16	0,32	16,87	16,72	16,72	0,14
PC qPCR	23,81	23,72	23,72	0,13	26,51	26,58	26,58	0,07
PC qPCR	23,63	23,72	23,72	0,13	26,64	26,58	26,58	0,07
Verdunningsreeks 10 ⁰	23,56	24,04	24,04	0,67	26,56	26,52	26,52	0,04
Verdunningsreeks 10 ⁰	24,51	24,04	24,04	0,67	26,48	26,52	26,52	0,04
Verdunningsreeks 10 ¹	27,04	26,73	26,73	0,44	30,27	30,12	30,12	0,16
Verdunningsreeks 10 ¹	26,42	26,73	26,73	0,44	29,96	30,12	30,12	0,16
Verdunningsreeks 10 ²	31,05	31,01	31,01	0,06	32,56	32,97	32,97	0,40
Verdunningsreeks 10 ²	30,96	31,01	31,01	0,06	33,37	32,97	32,97	0,40
Verdunningsreeks 10 ³	34,59	34,42	34,42	0,25	36,54	36,84	36,84	0,30
Verdunningsreeks 10 ³	34,24	34,42	34,42	0,25	37,14	36,84	36,84	0,30
Verdunningsreeks 10 ⁴	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁴	37,42				39,86	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁵	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁵	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁶	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁶	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁷	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁷	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁸	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁸	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁹	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ⁹	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ¹⁰	Undetermined				-	-	-	-
Verdunningsreeks 10 ¹⁰	Undetermined				-	-	-	-

Conclusie:

De BIO-RAD cfx96 is bruikbaar als vervanging van de ABI7900HT, maar heeft een lagere gevoeligheid. Hiervoor is geen oplossing, daar de productie van het ABI7900HT werd stopgezet, er ook na 2016 geen technische ondersteuning zal zijn, en er bovendien geen alternatief beschikbaar is. Voor de testen die worden uitgevoerd als vervolgtest op de ELISA is dit helemaal geen probleem, daar de ELISA een nog veel lagere gevoeligheid heeft dan het BIO-RAD cfx 96 toestel. Voor de testen waarin de qPCR als screenings-test wordt gebruikt, zal standaard nog steeds het ABI7900HT toestel worden gebruikt tot de technische ondersteuning volledig wegvalt. Dit is het geval voor de pospiviroïdentest en de Liberibacter test. Laatste onderhoud wordt uitgevoerd in december 2016 waarna het toestel nog 1 jaar kan meedraaien in het systeem. Zie ook validatiedossier pospiviroïden qPCR (F16_V11).

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 24 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

9. BESPREKING EN CONCLUSIE - GOEDKEURING

De eenstaps- real-time RT-PCR methode als bevestigingsmethode voor de detectie van het tomatengeelkrulbladvirus (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) zoals beschreven in W03V05 is geschikt voor het beoogde doel.

Gebruikte drempelwaarde positief/negatief. Theoretisch wordt in de literatuur vaak 35 als drempelwaarde voor de beoordeling positief/negatief gehanteerd. Ook in de validatie van deze test werd deze drempelwaarde gebruikt om de resultaten van de verschillende parameters op te evalueren. Op basis van de bekomen resultaten kan echter gesteld worden dat deze keuze ook te rechtvaardigen is op basis van de validatieresultaten zelf. Er is geen reden om een andere drempelwaarde in te stellen voor het praktisch gebruik van deze diagnostische test.

Nota:

Indien er om welke reden dan ook besloten zou worden om af te stappen van het gebruik van de standaardmethode voor de extractie (zoals gebruikt bij de bepaling van de verschillende prestatiekenmerken tijdens de labo validatie), dient een vergelijking te worden uitgevoerd van de nieuwe extractiemethode waarop overgeschakeld zou willen worden, met de standaardmethode. Het volstaat echter om dit enkel voor prestatiekenmerk mbt. de bepaling van de analytische gevoeligheid/aantoonbaarheidsgrens te beoordelen. Er dient dus een vergelijkend experiment te worden opgezet met een 10-voudige verdunningsreeks van een geïnfecteerde matrix tot beneden de detectielimiet, en uitgevoerd in duplo. Op die manier kan een invloed op de detectielimiet worden geëvalueerd.

10. GEBRUIKTE DOCUMENTEN

- W03V01 Richtlijnen voor de aanmaak producten labo virologie
- W03V02 Beheer virologisch referentiemateriaal
- W03V05 TYLCV detectie via PCR volgens de methode van FERA en het EUPHRESCO project Validation of diagnostic methods for the detection and identification of whitefly transmitted viruses of regulatory or quarantine concern to the EU
- W03V06 Detectie van het pruimensharkavirus (Plum pox virus – PPV) via real-time PCR.
- W03V09 Algemene ELISA procedure
- F03_V01 Gebruik en beoordeling standaard referentieculturen virologie
- F03_V05 Aandachtspunten bij het uitvoeren van de ELISA procedure
- F03_V10 Traceerformulier qPCR 96 well plaat
- F03_V12 TYLCV QPCR mix template
- F16_V04 Validatierapport qPCR PPV
- DC/L/V/Q&S_08 Toelichtend document voor de validatie van detectiemethoden van plantpathogenen en –aantasters (Van der Vlugt et al., Rapport 135, PRI-WUR, NI)
- DC/L/V/Q&S_09 Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin 40, 5-22.
- DC/L/V/TYLCV_01 EPPO Diagnostic protocol for regulated pests : TYLCV and ToMoV (anonymous)” PM 7/50 (EPPO Bulletin 34, 271-273)

	Werkinstructie : Validatierapport TYLCV via eenstaps qPCR	Pagina 25 van 25
		Doc: F16_V06
		Versie : 09/07/2018

Powell, M. E., Cuthbertson, A. G., Bell, H. A., Boonham, N., Morris, J., and Northing, P. (2012). First record of the Q biotype of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, intercepted in the e UK. Eur. J. Plant Pathol. 133, 797–801. doi:10.1007/s10658-012-9976-6