

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO  
PER  
*PEPINO MOSAIC VIRUS (PepMV)*  
SU POMODORO**

**A. Tiberini<sup>1</sup>, M. Ciuffo<sup>2</sup>, T. Mascia<sup>3</sup>, SW. Davino<sup>4</sup>, D. Gallitelli<sup>3</sup>,  
M. Turina<sup>2</sup>, L. Tomassoli<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura  
Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

<sup>2</sup> Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli  
Studi di Bari “Aldo Moro”, Bari

<sup>4</sup> Dipartimento Di Scienze Entomologiche, Fitopatologiche, Microbiologiche agrarie  
e Zootecniche (SENFIMIZO) – Università degli Studi di Palermo, Palermo.

## INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	285
1.1 Ospite	285
1.2 Sintomatologia	285
1.3 Morfologia dell'agente eziologico	286
1.4 Epidemiologia e trasmissione	286
1.5 Diagnosi	287
1.6 Normativa fitosanitaria	287
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	288
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	290
3.1 Premessa	290
3.2 Diagramma di flusso	291
3.3 Saggio DAS-ELISA	292
3.4 One step RT-PCR	298
3.5 Real Time RT-PCR (RT-qPCR)	304
4. DATI DI VALIDAZIONE	309
4.1 Campioni utilizzati per la validazione	309
4.2 Valori di validazione ottenuti	310
4.3 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche	313
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	314
Allegato I - strumenti, materiali e reagenti necessari	315

## 1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

<b>Agente causale</b>	<i>Pepino mosaic virus</i>
<b>Tassonomia</b>	Famiglia: <i>Alphaflexiviridae</i> Genere: <i>Potexvirus</i>
<b>Ceppi individuati</b>	PepMV-CH2; PepMV-EU; PepMV-US1
<b>Avversità</b>	Mosaico fogliare su pomodoro
<b>Acronimi</b>	PepMV

### 1.1 Ospite

*Pepino mosaic virus* (PepMV) è stato isolato per la prima volta in Perù negli anni '70 da piante di pepino (*Solanum muricatum*), ma il principale ospite in Europa è il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) che viene colpito principalmente in coltura protetta. In Perù, il virus è stato anche identificato in specie selvatiche di pomodoro in particolare su *S. chilense*, *Lycopersicon chmielewskii*, *L. parviflorum*, *S. peruvianum*.

Infezioni in condizioni di laboratorio indicano che anche altre solanacee quali patata, tabacco, petunia, melanzana e peperone sono potenziali ospiti del virus.

Un solo caso di infezione è stato rinvenuto su basilico (*Ocimum basilicum*), mentre PepMV è stato isolato dalle seguenti specie infestanti: *Amaranthus* spp., *Chenopodium murale*, *Convolvulus arvensis*, *Echium creticum*, *Malva parviflora*, *Nicotiana glauca*, *Plantago afra*, *Rumex* spp, *Solanum nigrum* e *Sonchus oleraceus*.

### 1.2 Sintomatologia

Su pomodoro i sintomi sono rilevabili su foglie e bacche.

I sintomi sulla lamina fogliare consistono in macchie di colore bruno o giallo, piccole ed angolari o irregolari più o meno estese, clorosi, mosaico, bollosità con frastagliatura dei margini soprattutto delle foglie apicali. In alcuni ambienti di coltivazione possono comparire sintomi di necrosi su fusto, steli fiorali e sepal. La pianta raramente subisce riduzioni di sviluppo e perdite di produzione significative, essendo interessati solo 3-4 palchi a ciclo.

Sul frutto i sintomi più frequenti sono una maturazione non uniforme o un aspetto marmorizzato che causa un declassamento qualitativo. In alcuni casi, sono state associate all'infezione da PepMV anche lesioni necrotiche con spaccature. In Sicilia, PepMV è molto diffuso e, in annate particolari, ha causato una forte butteratura dorata sui frutti rendendoli non commerciabili.



### 1.3 Morfologia dell'agente eziologico

Le particelle virali sono filamentose, con lunghezza modale di circa 510 nm e sono costituite da una singola proteina strutturale di circa 26 kDa che avvolge una molecola di RNA a singola elica di polarità positiva.

### 1.4 Epidemiologia e trasmissione

PepMV si trasmette per contatto tra piante infette e piante sane, ma soprattutto si diffonde all'interno delle serre durante le operazioni colturali attraverso l'uso di strumenti e mani contaminate. L'operatore agricolo può inoltre introdurre il virus in altre serre/aziende sfiorando accidentalmente piante sane con indumenti sporchi di succo infetto. Un ruolo, per quanto non considerevole nella diffusione del virus, è stato attribuito al processo di impollinazione sia manuale che mediante i bombi. PepMV si trasmette per innesto, per talea e può rimanere vitale nel materiale vegetale secco anche per 2-3 mesi. Questa longevità favorisce la diffusione a media (comprensori agricoli) e lunga distanza attraverso i frutti e i semi. La trasmissione per seme, di tipo tegumentale, anche se a basse percentuali è stata ritenuta responsabile della prima e rapida fase di diffusione del virus in Europa e rimane la principale via di diffusione del virus a lunga distanza e della sua introduzione in nuovi areali. Infatti, proprio

per l'alta contagiosità del virus, la presenza di poche piante infette in un vivaio può provocare nelle successive fasi di trapianto e coltivazione del pomodoro, il passaggio dell'infezione ad un numero molto più considerevole di piante.

## 1.5 Diagnosi

La diagnosi di PepMV può essere effettuata attraverso diverse metodologie che differiscono tra loro per la componente chimica virale che viene riconosciuta, per sensibilità ed applicabilità.

Si distinguono in:

1. **Metodi sierologici:** rilevano il rivestimento proteico del virus, mediante l'interazione immunochimica con anticorpi specifici, prodotti in animali di laboratorio.
2. **Metodi molecolari:** rilevano l'acido nucleico virale, dopo opportuna estrazione dalla matrice vegetale, mediante l'uso di opportuni inneschi detti oligonucleotidi.

## 1.6 Normativa fitosanitaria

Attualmente, PepMV è ancora regolato dalla Decisione Europea 2004/200/EC che prevede: i) il divieto di introdurre e trasportare semente di pomodoro contaminata dal virus; ii) ispezioni e controlli sulla semente proveniente dai paesi terzi; iii) il monitoraggio delle infezioni lungo la filiera produttiva (seme, vivai, coltivazione, mercati) da parte degli Stati Membri. PepMV è stato inserito nella "A2 List" dell'EPPO (European Plant Protection Organization) per gli organismi da quarantena. Nell'ambito del Progetto Europeo (PEPEIRA Project n. 044189) è stato prodotto il documento di Pest Risk Analysis (PRA) e si è in attesa della decisione della Comunità Europea per la definitiva regolamentazione o deregolamentazione di PepMV.

## 2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico. Anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione può influire sul risultato dell'analisi di laboratorio.

Il corretto campionamento prevede quindi:

- il prelievo del campione vegetale con la metodologia indicata;
- il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

**Matrice foglie:** la longevità del virus e le concentrazioni virali nelle cellule parenchimatiche non pongono condizioni particolari nel prelevamento delle foglie. Buona regola è prelevare sempre foglie ben sviluppate e non in fase di senescenza o affette da altri stress biotici e abiotici.

**Matrice frutto:** il virus è presente in ogni sua parte (buccia e polpa) e può essere identificato anche su frutti asintomatici. Buona regola è campionare frutti in buono stato di conservazione in quanto la presenza di marciumi o altri processi infettivi può causare inibizione nelle reazioni diagnostiche

**Matrice seme:** il virus è presente sui tegumenti e quindi è sufficiente lavorare il seme nella sua integrità. La semente disinfettata con metodi fisici o chimici quali estrazione acida, soluzioni di ipoclorito di sodio, trisodio fosfato, è idonea ai test diagnostici. Semente trattata con altri formulati chimici (fungicidi e insetticidi) potrebbe non dare risultati attendibili ai test a causa di possibili effetti inibitori da parte dei formulati chimici stessi. In questo caso, un sub-campione della partita trattata deve essere contaminato con il virus in laboratorio per accertarne la presenza nei test diagnostici.

Le tecniche di campionamento variano a seconda della tipologia del campione:

**Piante in coltivazione:** il campionamento fogliare può essere effettuato muovendosi lungo le file e prelevando 1 foglia ogni 100 piante o 5 foglie lungo ogni filare. Ai fini dell'analisi il campione rappresentativo per una serra/partita di piante deve essere suddiviso in sub-campioni di 10 foglie per test sierologico e di 25 foglie per test molecolare.

**Piantine da vivaio:** il campione deve essere identificativo per lotto. Il prelevamento deve avvenire in modo random (zig-zag lungo i bancali o area del semenzale). Il campione minimo da prelevare è di 3000 piantine (o seguendo le stesse indicazioni previste per il seme nel caso di lotti piccoli) con sub-campioni di 10 foglie per test sierologico e di 25 foglie per test molecolare.

**Frutti nei mercati:** il campione deve identificare la partita del prodotto. Il campione minimo deve essere di almeno 100 frutti da controllare in sub-campioni di 5 frutti per il test sierologico e di 10 frutti per test molecolare.

**Seme:** Il campione minimo per partite di seme è di 3000 semi da suddividere in sub-campioni da 250 semi ciascuno sia per test sierologico che molecolare. Nel caso di piccole partite, abbassare ulteriormente la quantità di semi riduce di molto la probabilità di individuare un'unità infetta. Seguire comunque il seguente schema:

Grandezza del lotto		Grandezza del campione	
N. semi	Peso (~)	N. semi	Peso (~)
$N \geq 50.000$	$> 150 \text{ gr}$	3000	8.4 gr
$30.000 \leq N < 50.000$	$100 < \text{gr} \leq 150$	2000	5.6 gr
$10.000 \leq N < 30.000$	$30 < \text{gr} \leq 100$	1000	2.8 gr
$N < 10.000$	$\leq 30 \text{ gr}$	500	1.4 gr

Nel caso ci siano problemi con la Ditta sementiera che riceve il materiale, e nel caso il materiale stesso fosse finalizzato a prove di breeding e/o valutazioni in serra, si deve procedere con la tracciabilità del campione e fare dei controlli in fase vegetativa.

**Mantenimento del campione:** Il materiale vegetale deve essere fresco, asciutto e deve essere posto in bustine di plastica opportunamente chiuse.

**Rintracciabilità del campione:** Ogni campione deve essere opportunamente contrassegnato con una sigla riconducibile all'azienda in cui è stato effettuato il prelievo e al lotto.

**Spedizione del campione:** I campioni raccolti devono essere processati il prima possibile, per cui devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 48 ore.

I campioni vegetali possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 7 giorni. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico.

Tutti i campioni vegetali qualora risultassero alterati nella consistenza, ad esempio presenza di imbrunimenti o marciume o muffe, non devono essere ritenuti idonei all'esecuzione dell'analisi, perché i risultati risulterebbero assolutamente inattendibili.

### 3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

#### 3.1 Premessa

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del *Pepino mosaic virus* (PepMV) su pomodoro per i laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi coperti da normative fitosanitarie.

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri di validazione è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** afferenti alle seguenti Istituzioni:

- 1- CRA - Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo),
- 2- CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Torino
- 3- DISSPA Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"
- 4- SENFIMIZO Università degli Studi di Palermo

tenendo conto dei metodi di diagnosi pubblicati su lavori scientifici e del progetto Europeo 6PQ (PEPEIRA) che ha fornito le tecniche, i metodi e i parametri scientifici di valutazione per la stesura del protocollo EPPO PM7/113 - PepMV.

La definizione del parametro di "Riproducibilità" è scaturita dall'effettuazione di un *ring test* nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

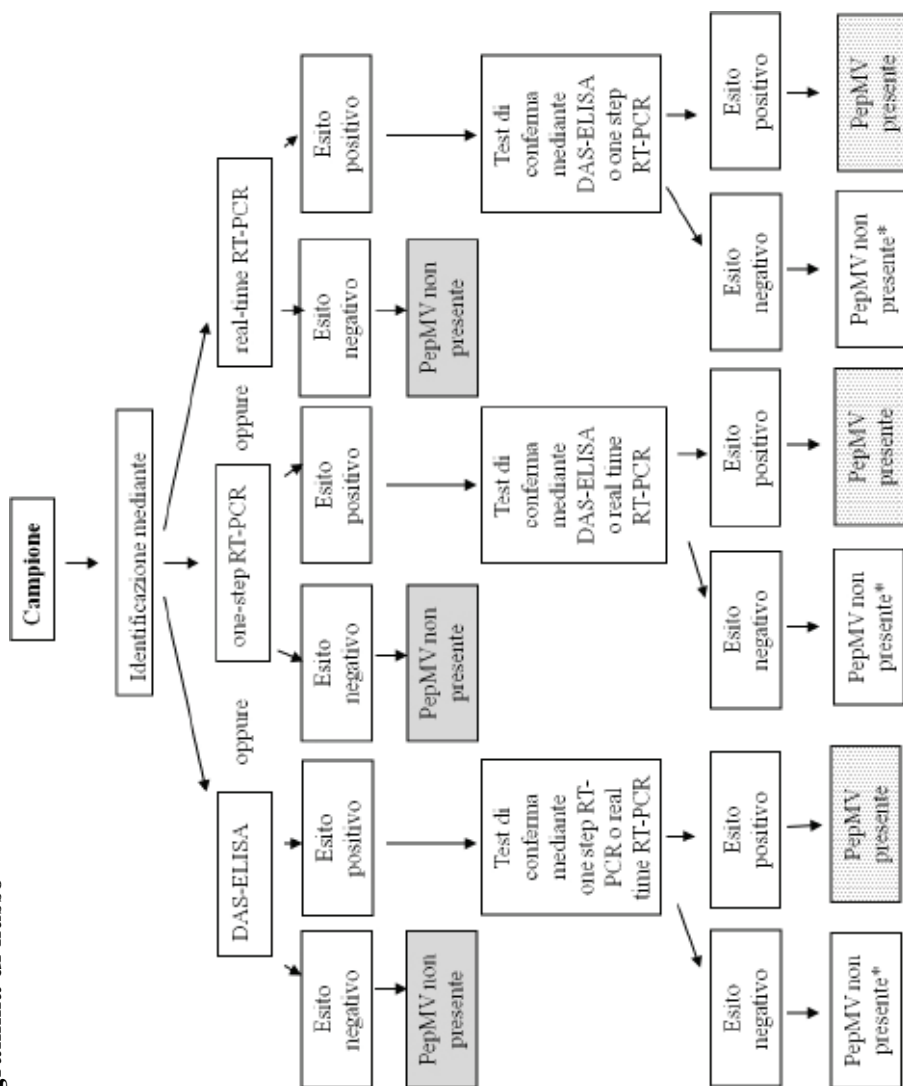
- 1- SFR Basilicata, Centro Ricerche Metaponto Agrobios, referente Dr. Vincenzo Castoro
- 2- SFR Campania, referente Dr. Gennaro Cennamo
- 3- SFR Emilia Romagna, referenti Dr. Valerio Vicchi e Dr. Paolo Fini
- 4- SFR Friuli Venezia Giulia, referente Dr. Gianluca Bianchi
- 5- SFR Molise, referenti Dr. Nicola Zinni e Dr. Martuscelli Enrico
- 6- SFR Piemonte, referenti Dr. Paola Gotta e Dr. Giovanna Mason
- 7- SFR Sardegna, Laboratorio Fitopatologico AGRIS, referente Dr. Annamaria Repetto
- 8- SFR Sicilia, referenti Dr. Giuseppe Greco e Dr. Francesco Saraceno
- 9- SFR Provincia Autonoma di Bolzano, Centro per la Sperimentazione Laimburg, referente Dr. Luigi Lindner

I metodi diagnostici inseriti nel presente protocollo per la identificazione di PepMV sono:

Metodo diagnostico	Componente virale riconosciuta
Sierologico: ELISA diretta	proteina capsidica virale
Molecolare: one step RT-PCR	acido nucleico virale (ssRNA)
Molecolare: real time RT-PCR (RT-qPCR)	acido nucleico virale (ssRNA)



### 3.2. Diagramma di flusso



\*In questa situazione si consiglia comunque di ripetere il test con il terzo metodo se disponibile in laboratorio o con uno dei due utilizzati

### 3.3 Saggio DAS-ELISA

L'ELISA consiste in una reazione specifica antigene (virus) - anticorpo che avviene su un supporto solido, piastra ELISA, e che viene visualizzata mediante una reazione colorimetrica.

L'efficienza del saggio riportata dalla Ditta produttrice è correlata ai test di qualità effettuati nelle condizioni di lavoro espressamente riportate nel foglietto di istruzioni. Seguire, quindi, attentamente le istruzioni della Ditta produttrice. In particolare, effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate ed utilizzare la diluizione consigliata per il campione.

**La validazione ed il ring test hanno dimostrato l'efficienza del saggio anche con l'uso del tampone fosfato 0.1 M pH 7.2 per la macerazione dei campioni al posto del tampone di estrazione consigliato dalla Ditta produttrice del kit.**

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre, il tampone fosfato ed il tampone PBS possono essere preparati precedentemente a partire da una soluzione madre di 10X e mantenuti in laboratorio ed utilizzati entro un mese. Controllare accuratamente il pH del tampone carbonato perché è determinante per l'adesione degli anticorpi alla plastica dei pozzetti.

Il tampone per il substrato può essere preparato prima e mantenuto a 4°C al riparo dalla luce.

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento. Nella prima colonna inserire campione sano. Inserire un controllo negativo, un controllo positivo e un controllo "bianco", a seguire i campioni da analizzare. Il controllo "bianco" è costituito da tampone fosfato o il tampone utilizzato per l'estrazione suggerito dal kit.

Ciascun campione e ciascun controllo deve essere replicato su due pozzetti.

Come controllo positivo e negativo possono essere utilizzati quelli forniti dai kit commerciali oppure possono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti rispettivamente da una pianta sicuramente infetta da PepMV e da una pianta sicuramente esente da PepMV. In questo caso i controlli devono essere macerati congiuntamente ai campioni da saggiare facendo attenzione che il campione sano venga lavorato per primo ed il campione infetto per ultimo.

Si riporta la procedura del saggio:

### 3.3.1 Preparazione del campione matrice “seme”

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta, da sostituire ad ogni fase dell'analisi.

- Preparare il tampone di estrazione (tampone fosfato:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M pH 7.2) e conservarlo a 4°C
- Preparare sub-campioni costituiti massimo da 250 semi (i sub-campioni si possono ottenere anche sulla base del calcolo del peso medio di almeno 3 - 5 gruppi di 250 semi della varietà da analizzare)
- Mettere ogni sub-campione in una singola busta da estrazione (es: Bioreba cat. no. 480100 o 430100) e segnare la sigla del campione e numero sub-campione
- Aggiungere 10 ml di tampone fosfato
- Chiudere le buste con la termo-saldatrice (se non disponibile collocare le buste in altre bustine sigillabili e disporle verticalmente ben separate tra loro controllando che tutti i semi siano ben immersi)
- Incubare il seme a 4-6°C per una notte

### 3.3.2 Esecuzione DAS-ELISA

#### Sensibilizzazione della piastra ELISA.

- Diluire con tampone carbonato 1X gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta del kit.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Riempire ciascun pozzetto con 200 µl di soluzione di anticorpi.
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperature e per il tempo richiesti dalla ditta produttrice: 30°C per 4 ore oppure 37°C per 2.5 ore oppure 4-6°C per una notte.

*I pozzetti non utilizzati vanno riempiti con il tampone carbonato.*

#### Preparazione dei campioni.

Per la macerazione dei campioni fogliari, di frutti e di semi utilizzare bustine 'tipo Bioreba' e omogeneizzatore (Bioreba 400004, 400005) o una testa rotante azionata manualmente o montata su trapano (Agdia ACC 00900, Bioreba 400010).

Riportare su ciascuna bustina la sigla del campione corrispondente.

- a) FOGLIE:** pesare il campione in modo da ottenere la percentuale di diluizione peso/volume richiesta dalla ditta produttrice del kit sierologico. La quantità pesata DEVE essere rappresentativa dell'intero campione, per cui è necessario raggiungere la quantità richiesta prelevando piccoli frammenti dal maggior numero di foglie possibile. Aggiungere nella bustina la giusta quantità di tampone di estrazione freddo e macerare accuratamente.

- b) **FRUTTO:** prelevare piccoli pezzi di buccia e polpa con bisturi. La quantità pesata DEVE essere rappresentativa dell'intero campione, per cui è necessario raggiungere il peso richiesto prelevando piccoli frammenti da frutti appartenenti allo stesso campione. Aggiungere la giusta quantità di tampone di estrazione freddo e macerare accuratamente.
- c) **SEME:** recuperare le buste con i semi e macerare gli stessi mantenendoli nelle buste sigillate con l'omogeneizzatore manuale o a trapano per 2 min fino ad ottenere una soluzione lattescente (la completa macerazione del seme non è necessaria). Tagliare la bustina e prima di ogni taglio disinfettare con etanolo 70% le forbici o il bisturi.
- Effettuare sempre per primo la macerazione del controllo sicuramente esente dall'infezione virale ed eseguire per ultimo la macerazione del controllo sicuramente infetto dal virus.

*Durante le operazioni di preparazione mantenere i campioni in ghiaccio*

### **Lavaggio della piastra**

- Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.
- Lavare la piastra con PBS-T come riportato sulle istruzioni o con le modalità impostate sul lavatore automatico.
- Asciugare la piastra fino ad eliminare bolle o residui di tampone sbattendo la piastra su carta da bancone o carta asciugamani da laboratorio.

### **Distribuzione dei campioni**

- Caricare i campioni (200 µl per pozzetto) seguendo lo schema cartaceo precedentemente impostato, replicando ciascun campione in due pozzetti. Nella prima colonna caricare solo il campione sano. I pozzetti non utilizzati vanno riempiti con il tampone di estrazione.
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla ditta produttrice: 4-6°C per una notte.

*Quando si preleva la soluzione macerata dalle bustine fare attenzione a non versare nei pozzetti residui vegetali solidi.*

### **Lavaggio della piastra**

- Eliminare energicamente il materiale verde dalla piastra
- Lavare la piastra con PBS-T come riportato sulle istruzioni o con le modalità impostate sul lavatore automatico
- Asciugare la piastra fino ad eliminare bolle o residui di tampone sbattendo la piastra su carta da bancone o carta asciugamani da laboratorio.

### **Coniugato**

- Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla ditta produttrice.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Riempire ciascun pozzetto con 200 µl della soluzione ottenuta
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperature e per il tempo richiesti dalla ditta produttrice: 30°C per 5 ore oppure 37°C per 2 ore.

*I pozzetti non utilizzati vanno riempiti con il tampone coniugato.*

### **Lavaggio della piastra**

- Lavare la piastra con PBS-T come riportato sulle istruzioni o con le modalità impostate sul lavatore automatico
- Asciugare energicamente la piastra fino ad eliminare bolle o residui di tampone sbattendo la piastra su carta da bancone o carta asciugamani da laboratorio.

*Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.*

### **Preparazione del substrato**

- Sciogliere il substrato PNP alla concentrazione riportata dalla ditta produttrice in tampone per substrato. La concentrazione del substrato è molto critica e per questo motivo si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in compresse .

*Mescolare bene la soluzione ottenuta.*

### **Caricamento del substrato**

Caricare 200µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Incubare la piastra, preferibilmente al riparo dalla luce, a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

### **3.3.3 Valutazione dei risultati**

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo (in genere da 5 min ad 1 ora dopo il caricamento del substrato in funzione della concentrazione virale)

I risultati sono attendibili fino a che i controlli negativi non superano l'assorbanza di 0,2 OD.

Quantificare la colorazione tramite lettura in un apposito fotometro a 405nm. Eseguire almeno 3 letture a partire dall'inizio della colorazione del controllo positivo (o del primo campione risultato infetto) e proseguire fino a che il controllo negativo non supera l'assorbanza di 0,2 OD.

Lo sviluppo del colore può essere bloccato aggiungendo 50 µl/pozzetto di sodio idrossido 3M.

I campioni infetti vengono identificati mediante la seguente formula:

$$C = A + (3 \times B)$$

dove:

*Background* o *rumore di fondo* (A) = media dei controlli negativi

*Deviazione standard* (B) = dispersione dei valori ottenuti per i controlli negativi

*Threshold* o *limite soglia* (C) = A + (3 x B)

*Campione positivo*: > C

*Campione negativo*: < C

### Punti critici

- a. Essendo l'ELISA una reazione antigene-anticorpo che avviene su un supporto solido la scelta della piastra è molto importante perché influisce sul legame degli anticorpi e sull'eventuale background della reazione. Esistono diversi tipi di piastre ELISA in commercio: ad alta, media e bassa capacità di legame con gli anticorpi, dovuta a pre-trattamenti del materiale plastico. Si consiglia di cambiare il tipo di piastra o il lotto utilizzato nel caso si osservino fenomeni ripetuti di background (giallo diffuso sui controlli negativi) o reazioni molto deboli. Accertarsi, comunque, che la piastra sia specifica per il saggio ELISA (esistono in commercio molti tipi di piastre a 96 pozzetti dedicate ad altri scopi).
- b. Controllare sempre il numero di lotto delle piastre utilizzate perché possono insorgere differenze di comportamento da un lotto all'altro (soprattutto nel caso di piastre pre-trattate).
- c. Nello schema del test riportare anche il numero di lotto del kit sierologico (può essere determinante per la uniformità dei risultati).
- d. Utilizzare il kit sierologico entro la data di scadenza.
- e. Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.
- f. Controllare con accuratezza il pH dei tamponi utilizzati, perché è determinante per la loro efficienza.
- g. Effettuare un controllo interno della taratura delle micropipette utilizzate almeno ogni tre mesi.
- h. L'efficienza del test ELISA è strettamente dipendente da una buona conservazione e macerazione del campione vegetale per cui è necessario effettuare con molta cura le operazioni di raccolta e preparazione del campione da analizzare.
- i. La reazione di legame antigene-anticorpo che avviene all'interno dei pozzetti ELISA è efficiente e specifica solo se ad ogni passaggio vengono eliminati i reagenti che non si sono legati. Le fasi di lavaggio sono, quindi, molto importanti per la buona riuscita del test. Se si utilizzano macchinari per il lavaggio automatico delle piastre ELISA è NECESSARIO controllare ogni settimana la perfetta pulizia ed efficienza di ogni canale di lavaggio. In particolare, dopo il caricamento dei campioni fare molta attenzione ad eliminare qualunque residuo di materiale vegetale (le piastre devono risultare assolutamente trasparenti).

- j. Controllare sempre le etichette dei reagenti del kit ed i fogli di istruzione della ditta produttrice, prima di effettuare le opportune diluizioni (possono variare in funzione del lotto utilizzato)
- k. Le diluizioni di anticorpo o coniugato devono essere effettuate secondo le istruzioni, in contenitori di vetro o di polietilene (o opportuna plastica a bassa capacità di legame delle proteine) poco prima dell'uso.
- l. Tenere le piastre ELISA sempre coperte con pellicola trasparente o l'apposito coperchio durante le incubazioni.
- m. Controllare sempre la pulizia e le condizioni asettiche dei contenitori in cui vengono preparati e mantenuti i tamponi.
- n. Utilizzare sempre guanti nella manipolazione delle piastre ELISA
- o. I pozzetti delle righe e colonne esterne della piastra possono essere soggetti al cosiddetto 'effetto bordo', dovuto al contatto con l'aria, che consiste nella colorazione gialla dei pozzetti indipendentemente dall'avvenuta reazione antigene-anticorpo. Caricare i campioni su doppio pozzetto in modo da evitare che alcuni risultino collocati solo su tali righe e colonne.

### Tamponi necessari all'effettuazione del test ELISA

<b>Tampone carbonato 1X (sensibilizzazione delle piastre)</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93g
NaN <sub>3</sub>	0,20g
H <sub>2</sub> O distillata fino ad 1 litro	

Controllare accuratamente il pH che DEVE essere 9,6

<b>PBS 1X</b>	
NaCl	8,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2,9 g
KCl	0,2 g
H <sub>2</sub> O distillata fino ad 1 litro di soluzione	

Controllare accuratamente il pH che DEVE essere 7,4

**Tampone di lavaggio 1X**

PBS	1 Lt
Tween 20 <sup>(*)</sup>	0,5 ml

(\*) Essendo il Tween 20 molto denso e, quindi, di difficile manipolazione si consiglia di preparare una soluzione di Tween 20 al 10% e di aggiungere 5 ml di questa soluzione e portare a un litro con PBS.

<b>Tampone coniugato</b>	<b>Tampone coniugato 'generico'</b>	
Preparare quello riportato sulle istruzioni del kit sierologico.	PBS 1X	1 Lt
	PVP P.M. 24.000	20 g
	BSA	2 g
	Tween 20	0,5 ml

**Tampone PNP (substrato)**

Dietanolammina	97 ml
H <sub>2</sub> O distillata fino ad 800 ml di soluzione	
Portare il pH a 9,8 mediante aggiunta di HCl	
Portare ad 1 litro con acqua distillata	
Aggiungere 0,2 g di NaN <sub>3</sub>	

### 3.4 One step RT-PCR

#### 3.4.1 Preparazione del saggio RT-PCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo e un controllo "bianco". Si consiglia di non superare il numero di 20 campioni per evento di amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta da PepMV e da una pianta sicuramente esente da PepMV, rispettivamente.

Il controllo "bianco" è costituito da acqua RNase-free caricata al posto dell'estratto di RNA.



### 3.4.2 Estrazione dei campioni con kit commerciale:

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice del kit di estrazione RNA.

**SEME:** preparare, incubare e macerare i sub-campioni come descritto per l'analisi DAS-ELISA

- Trasferire 100 µl di estratto in una provetta da 1,5 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit
- Ripetere l'ultimo passaggio utilizzando i 50 µl di eluito e raccogliendo nello stesso tubo di raccolta in modo da aumentare la concentrazione

**FOGLIE E/O POLPA DA FRUTTO:** macerare accuratamente il tessuto vegetale(\*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette.

Includere sempre nella prova di estrazione un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto dal virus (ultimo da estrarre), appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggata.

(\*) Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile).

- Pesare 0.5 g di tessuto vegetale e collocarli nella bustina 'Bioreba'
- Aggiungere 5 ml di tampone nella bustina
- Macerare il campione
- Trasferire 100 µl di omogenato in una provetta da 1,5 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

### 3.4.3 Esecuzione RT-PCR

#### Oligonucleotidi

Per la diagnosi del PepMV gli oligonucleotidi suggeriti sono i seguenti (Ling, 2008):

KL05-13 (forward)            5'-GTCCTCACCAATAAATTAG- 3'

KL05-14 (reverse)         5'-AGGAAAACCTTAACCCGTTTC- 3'

Gli oligonucleotidi possono essere ordinati presso apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati o in sospensione a concentrazione nota. E' conveniente diluire gli oligonucleotidi ad una concentrazione di 100 µM in dH<sub>2</sub>O sterile (seguendo le istruzioni della ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri

a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

### Preparazione del saggio

- Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Indossare guanti monouso.
- Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli
- Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongelare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.
- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

### Miscela di reazione per un campione

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH <sub>2</sub> O RNase free	9.5	-
2X Reaction Mix (PCR buffer)	12.5	1X
Oligonucleotide KL05-13 (10 µM)	0.5	0.2 µM
Oligonucleotide KL05-15 (10 µM)	0.5	0.2 µM
SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix	1.0	-
RNA totale estratto (TRNA)	1.0	
<b>Totale</b>	<b>25.0</b>	

Procedimento:

- Mescolare bene la soluzione.
- Distribuire 24µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Aggiungere l'estratto di RNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
- Accertarsi che nelle provette tutta l'aliquota della miscela di reazione sia sul fondo della provetta. Eventualmente centrifugare per pochi secondi.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la RT-PCR dopo aver impostato o selezionato il programma specifico.

## Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Trascrizione inversa	50 °C	30'	1
Denaturazione	94 °C	2'	1
	94 °C	30"	
Amplificazione	55 °C	30"	33
	72 °C	60"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1

### 3.4.4. Elettroforesi su gel di agarosio

Per l'esecuzione del saggio seguire le seguenti tappe operative:

- Preparare il gel di agarosio 1 % in TBE1X.
- Centrifugare brevemente (spin) le provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formata sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
- Caricare 10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 µl di loading buffer 10X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
- Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
- Far correre gli amplificati per circa 30-40 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante che non deve uscire dal gel.
- Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro (oppure colorante gel-red diluito 1:20.000).
- Lavare il gel per circa 5 minuti in H<sub>2</sub>O.
- Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V., farne una fotografia salvandola in tiff o jpg.

### 3.4.5 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserverà una sola banda di 200 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo in corrispondenza della banda di riferimento del marker. La presenza di altre bande più deboli indica una reazione di amplificazione non ben riuscita e il test deve essere ripetuto.

### Punti critici

- a) Il punto debole della RT-PCR è la sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra,

- se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.
- b) Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
- organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per amplificazione e laboratorio per elettroforesi). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati;
  - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
  - usare solo acqua sterile RNase-free
  - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti RNA);
  - usare solo puntali sterili con filtro;
  - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNase reperibili in commercio.
- c) Controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (la concentrazione in Unità/μl di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- d) Mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della RT-PCR.
- e) Fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.
- f) Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti. In particolare mantenere sempre in ghiaccio gli enzimi quando vengono utilizzati nella preparazione della miscela di reazione.

**Tamponi necessari alla corsa elettroforetica:**

---

**TBE 10X**

---

Tris	108 g
Acido borico	55 g
0,5 M EDTA (pH 8)	40 ml

Portare ad 1litro con H<sub>2</sub>O distillata

Autoclavare

---

**LOADING BUFFER 10X IN TBE**

---

Blu di bromofenolo	0,3%
Xilencianolo	0,3%
Glicerolo	60%

---

**SOLUZIONE DI ETIDIO BROMURO 0,5 µG/ML**

---

Etidio bromuro	50 µg
Acqua	100 ml

Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua

---

### 3.5 Real Time RT-PCR (RT-qPCR)

#### 3.5.1. Preparazione del saggio RT-qPCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli. Ciascun campione deve essere replicato due volte nell'esperimento. Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli:

- 1 controllo "bianco" ogni 30 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 1 µl di acqua sterile al posto dell'estratto;
- 1 controllo negativo ogni 30 campioni costituito da un campione sicuramente esente da PepMV, appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri.
- 1 controllo positivo costituito da un campione sicuramente infetto dal PepMV, preparato congiuntamente agli altri.

#### 3.5.2. Estrazione con kit commerciale:

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice del kit di estrazione per RNA. In particolare per:

**SEME:** preparare, incubare e macerare i sub-campioni come descritto nel test DAS-ELISA

- Trasferire 100 µl di estratto in una provetta da 1,5 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit
- Ripetere l'ultimo passaggio utilizzando i 50 µl di eluito e raccogliendo nello stesso tubo di raccolta in modo da aumentare la concentrazione

**FOGLIE E/O POLPA DA FRUTTO:** macerare accuratamente il tessuto vegetale con azoto liquido (\*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette.

Inserire sempre nella prova di estrazione un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto da PepMV (ultimo da estrarre), appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggata.

(\*) Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0.5 g di tessuto vegetale e collocarli nella bustina ‘Bioreba’
- Aggiungere 5 ml di tampone nella bustina
- Macerare il campione
- Trasferire 100 ml di omogenato in una provetta da 1,5 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

### 3.5.3. Esecuzione del saggio RT-qPCR

#### Oligonucleotidi e sonde

Per la diagnosi del PepMV si utilizzano gli oligonucleotidi e la sonda TaqMan (Ling *et al.*, 2007) di seguito riportati:

Oligonucleotide KL05-fr48	5'-ACT CCT AGA GCT GAC CTC AC-3'
Oligonucleotide KL05-fr49	5'-ACT CCT AGA GCT GAT CTT AC-3'
Oligonucleotide KL05-51	5'-TCT CCA GCA ACA GGT TGG TA-3'
Oligonucleotide KL05-52	5'-TCA CCT GCA ACT GGT TGA TA-3'
Sonda TaqMan KL05-50	5'-FAM -TGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAA-TAMRA-3'

Per la reazione di controllo sul gene endogeno (citocromo ossidasi) del campione vegetale si utilizzano gli oligonucleotidi e la sonda TaqMan di seguito riportati:

Oligonucleotide COX F	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'
Oligonucleotide COX R	5'-CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG-3'
Sonda TaqMan COX SOL 1511T	5'-VIC-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-TAMRA-3'

Gli oligonucleotidi e le sonde possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati o in sospensione a concentrazione nota.

Diluire gli oligonucleotidi alla concentrazione d'uso di 100µM in dH<sub>2</sub>O sterile e mantenere a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 10µM in dH<sub>2</sub>O sterile e conservarle a -20°C da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione.

E' conveniente diluire la sonda ad una concentrazione di 50µM in dH<sub>2</sub>O sterile e conservare la soluzione madre a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 5µM in dH<sub>2</sub>O sterile e conservarle a -20°C. La soluzione madre e le aliquote DEVONO essere mantenute rigorosamente al buio.

### **Preparazione del saggio**

- Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta
- Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (un camice che non deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni)
- Usare solo provette e puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso
- Indossare guanti puliti
- Sterilizzare sotto UV pipette, puntali con filtro, portaprovette
- Preparare la mix in un area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR)
- Se si utilizzano provette al posto della piastra NON siglarle per nessun motivo (il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore)
- Se si utilizzano piastre disporle sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore
- Scongellare i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione
- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio



**Miscele di reazione per un campione:**

Componenti per PepMV	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH <sub>2</sub> O RNase free	7.375	-
2X Master Mix	12.50	1X
40X RNase Inhibitor	0.625	1X
oligonucleotide KL05-48 (10 µM)	0.75	0.3 µM
oligonucleotide KL05-49 (10 µM)	0.75	0.3 µM
oligonucleotide KL05-51 (10 µM)	0.75	0.3 µM
oligonucleotide KL05-52 (10 µM)	0.75	0.3 µM
sonda TaqMan KL05-50 (5 µM)	0.5	0.1 µM
<b>Totale</b>	<b>24.00</b>	

Componenti per COX	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH <sub>2</sub> O RNase free	8.875	-
2X Master Mix	12.50	1X
40X RNase Inhibitor	0.625	1X
oligonucleotide COX F (10 µM)	0.75	0.3 µM
oligonucleotide COX R (10 µM)	0.75	0.3 µM
sonda TaqMan COX SOL (5 µM)	0.5	0.1 µM
<b>Totale</b>	<b>24.0</b>	

- Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
- Cambiare area di lavoro e caricare 1 µl di estratto (TRNA) con una micro pipetta dedicata SOLO a questo scopo.
- In caso di utilizzo di piastra, chiuderla con pellicola specifica
- Effettuare una breve centrifugata (spin)
- Inserire le provette o la piastra nel termociclatore
- Avviare la RT-qPCR dopo aver impostato o selezionato il programma:

## Ciclo

Temperatura	Tempo	N° di cicli
48 °C	30'	1
95 °C	10'	1
95 °C	15''	40
60 °C	1'	

Controllare i risultati mediante la visualizzazione del grafico delle curve di amplificazione e del valore di Ct di ciascun campione.

### 3.5.4. Valutazione dei risultati

Una volta impostato il limite soglia (*threshold*):

- considerare **positivi** tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di Ct < 38 per il virus (PepMV) e per il rispettivo controllo interno (COX).
- considerare **negativi** i campioni con un valore di Ct > 38 per PepMV se il rispettivo controllo interno (COX) ha un valore di Ct < 38
- i campioni con un valore di Ct > 38 devono essere analizzati di nuovo se il rispettivo controllo interno (COX) ha un analogo valore di Ct > 38

#### Punti critici

- a Il punto debole della RT-qPCR è l'elevata sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni all'interno della piastra o tra i microtubi durante il caricamento dei singoli estratti di RNA o nella preparazione della miscela. Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.
- b Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
  - organizzare il laboratorio, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per la preparazione della mix e laboratorio per l'amplificazione). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali o aree separate per le tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione nell'area dove si maneggiano amplificati e non portare gli amplificati nell'area dedicata alla preparazione della miscela di reazione;
  - tenere i componenti e i reagenti aperti il minor tempo possibile;
  - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
  - usare solo acqua sterile RNase-free;

- cambiare i guanti ogni qual volta si sospetta di averli contaminati durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti RNA);
  - usare SOLO puntali sterili con filtro;
  - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse o che la pellicola per la copertura delle piastre sia ben sigillata;
  - pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%;
- c Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

## 4. DATI DI VALIDAZIONE

Le prove di validazione sono state effettuate sulla sola specie pomodoro (*Solanum lycopersicum*) utilizzando diverse matrici:

- foglie
- frutto
- semi.

### 4.1 Campioni utilizzati per la validazione

Complessivamente per i test di validazione sono stati utilizzati 29 campioni di riferimento così distribuiti:

- **17 campioni 'target'** ossia **infetti da PepMV** comprendenti isolati provenienti da diversi areali geografici italiani e isolati di riferimento appartenenti alla collezione PEPEIRA (6PQ Project) e in particolare:
  - 6 campioni fogliari sintomatici di diversa origine (varietà e area geografica)
  - 3 campioni di bacche sintomatiche di diversa origine (varietà e area geografica)
  - 4 campioni di semi di diversa origine (varietà e area geografica)
  - 3 campioni fogliari di isolati di riferimento per i tre ceppi di PepMV
  - 1 controllo positivo fornito dal kit Bioreba
- **5 campioni 'non target'** costituiti da materiale **infetto da altri patogeni virali** comunemente presenti in pomodoro di cui uno appartenente al genere *Potexvirus*:
  - 1 campione infetto da Virus X della patata (**PVX**) (*Potexvirus*);
  - 1 campione infetto da Virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (**TSWV**);
  - 1 campione infetto da Virus Y della patata (**PVY**);
  - 1 campione infetto da Virus del mosaico del tabacco (**TMV**);
  - 1 campione infetto da Virus della clorosi del pomodoro (**ToCV**);

- **7 campioni ‘non target’** costituiti da matrici vegetali diverse da piante di pomodoro **esenti da infezione virale:**

- 4 campioni di **foglie** di diversa origine varietale ;
- 2 campioni di **bacche** di diversa origine varietale;
- 2 campioni di **seme** di diversa origine varietale.

Per la valutazione della "riproducibilità" è stato utilizzato un numero inferiore di campioni escludendo quelli “non target” infetti da altri agenti virali e mantenendo le tre matrici di pomodoro. Inoltre, i campioni sono stati forniti ‘*blind*’ per cui l’operatore non ne conosceva la natura e la storia.

## 4.2 Valori di validazione ottenuti

### 4.2.1 Metodo DAS-ELISA

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

**Kit Sierologici:** Kit Bioreba AG (Switzerland) (IgG codice 161515; IgG coniugate-AP codice 161525) fornito da EuroClone SpA. Il kit è stato scelto dopo comparazione tra kit sierologici delle Ditte commerciali più utilizzate a livello nazionale e dopo validazione rispetto al kit Prime Diagnostics, validato nell’ambito del Progetto Europeo PEPEIRA.

**Piastre a 96 pozzetti per ELISA:** Nunc-Immunoplate maxisorp N. catg. 439454; Greiner bio-one N. catg. 655061

**Substrato:** Sigma 104-105

**Bustine per campioni:** Bioreba codice 430100 o 4301 00

**Omogeneizzatore:** a testa rotante Bioreba 400010

**Letto per piastre ELISA:** Labsystems Multiskan EX, TECAN

**Micropipette:** Multicanale Biohit

**Lavaggio piastre:** Athos fluido

Parametri	Valori
Sensibilità diagnostica	100%
Specificità diagnostica	100%
Accuratezza	100%
Specificità analitica	100%
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-2</sup> seme; 10 <sup>-8</sup> polpa; 10 <sup>-6</sup> foglia
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%
Riproducibilità <sup>(3)</sup>	95%

<sup>(1)</sup> La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10<sup>-10</sup>

<sup>(2)</sup> Per la ripetibilità sono stati scelti 1 target per ogni matrice vegetale (seme, foglia, frutto) ed un rispettivo sano; sono state individuate due diluizioni di media e bassa assorbanza dal test sulla sensibilità analitica. I campioni sono stati analizzati dalla stessa persona, con gli stessi reagenti, per tre volte, nella stessa giornata. I valori sono stati calcolati verificando quante volte lo stesso risultato veniva ripetuto a prescindere dal fatto che fosse infetto o meno (es. campione 1 +, +, +, campione 2 +, +, -, campione 3 +, +, - ecc

<sup>(3)</sup> La riproducibilità è stata valutata mediante un *ring test* effettuato da nove laboratori dei SFR e CRA-PAV.

#### 4.2.2 Metodo diagnostico molecolare RT-PCR

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

**Kit commerciale per estrazione RNA totale da tessuto vegetale:**

RNeasy Plant Minikit Qiagen - cod. 74904;

**Miscela di reazione: Superscript III one-Step RT-PCR System con Platinum Taq DNA Polymerase** (Invitrogen cat. No 12574-018 per 25 reaction) che contiene:

50 µl di SuperScript III RT/Platinum Taq

1 µl di Soluzione tampone 2X (0.4 mM per ciascun dNTP, 3.2 mM MgSO<sub>4</sub>)

500 µl di 5 mM MgSO<sub>4</sub>

**Oligonucleotidis specifici per PepMV:** sintetizzati da Invitrogen Ltd

**Termociclatore:** Biorad: MJ PTC200, MJ Chromo4, CFX96, iCycler, S1000 thermal Cycler

**Transilluminatore:** Biorad Geldoc 2000

**Marker per DNA:** Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes G 7541 Promega Corporation

Parametri	Valori
Sensibilità diagnostica	91%
Specificità diagnostica	100%
Accuratezza	93%
Specificità analitica	100%
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-5</sup> seme; 10 <sup>-8</sup> polpa; 10 <sup>-6</sup> foglia
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%
Riproducibilità <sup>(3)</sup>	98%

<sup>(1)</sup> La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10<sup>-10</sup>

<sup>(2)</sup> La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di un estratto per ciascuna matrice seguendo poi le stesse modalità del saggio ELISA

<sup>(3)</sup> La riproducibilità è stata valutata mediante un *ring test* effettuato da quattro laboratori dei SFR e CRA-PAV.

#### 4.2.3. Metodo diagnostico molecolare Real time RT-PCR

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

**Master mix:** TaqMan One step RT-PCR Master Mix cod. 4309169 Applied Biosystem

**Piastre:** Reaction Plate 96-W no barcode cod N8010560 Applied Biosystem

**Pellicola per piastre RT-PCR:** Optical Adesive Covers cod. 4311971 Applied Biosystem

**Termociclatore:** Applied Biosystem: ABIPRISM 7000 e 7500 Fast, StepOne Plus; Biorad: MJ Chromo4, MiniOpticon CFX96;

**TaqMan Sonda e oligonucleotidis:** sintetizzati da Applied Biosystem

Parametri	Valori
Sensibilità diagnostica	100%
Specificità diagnostica	85%
Accuratezza	93%
Specificità analitica	100%
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-7</sup> seme; 10 <sup>-10</sup> polpa; 10 <sup>-10</sup> foglia
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%
Riproducibilità <sup>(3)</sup>	87%

<sup>(1)</sup> La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10<sup>-10</sup>

<sup>(2)</sup> La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento nel test di RT-PCR di un estratto per ciascuna matrice e proseguendo nelle analisi come per gli altri test.

<sup>(3)</sup> La riproducibilità è stata valutata mediante un *ring test* effettuato da due laboratori dei SFR e CRA-PAV.

### 4.3. Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire standard tecnici per la realizzazione delle analisi si riportano alcuni suggerimenti utili:

Saggio diagnostico	Caratteristiche
Saggio diagnostico ELISA	<p><b>Tempi di esecuzione:</b> 36 ore per l'analisi di 20-40 campioni</p> <p><b>Vantaggi:</b> economicità, elevata affidabilità e specificità, semplicità di esecuzione, disponibilità di antisiero efficace verso tutti i ceppi del virus</p> <p><b>Svantaggi:</b> minore sensibilità</p> <p><b>Consigliato come primo test di diagnosi e nelle diagnosi massali per i monitoraggi</b></p>
Saggio molecolare one step RT-PCR	<p><b>Tempi di esecuzione:</b> 8 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione)</p> <p><b>Vantaggi:</b> maggiore sensibilità analitica soprattutto per il seme; consente sequenziamento del virus</p> <p><b>Svantaggi:</b> minore accuratezza e sensibilità; tecnica laboriosa e legata all'utilizzo di specifici reagenti;</p> <p><b>Consigliato per analisi confirmatorie su campioni dubbi in ELISA e/o Real time RT-PCR</b></p>
Saggio molecolare real time RT-PCR	<p><b>Tempi di esecuzione:</b> 4 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione).</p> <p><b>Vantaggi:</b> maggiore sensibilità analitica soprattutto per il seme</p> <p><b>Svantaggi:</b> minore specificità e accuratezza; tecnica laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti e che richiede personale altamente specializzato</p> <p><b>Consigliato per analisi su piccoli numeri, specialmente per sementi in importazione, e per i campioni risultati dubbi in test ELISA</b></p>

## 5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- AGUILAR JM., MD. HERNANDEZ-GALLARDO, JL.CENIS., A. LACASA, MA. ARANDA, 2002. Complete sequence of the *Pepino mosaic virus* RNA genome. *Archives of Virology*, **147**, 2009–2015.
- EPPO Standard, PM7/113 (1), 2013. Pepino mosaic virus. *Eppo Bulletin* **43**(1), 94-104
- JONES R.A.C., R. KOENIG, DE. LESEMANN, 1980. *Pepino mosaic virus*, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology*, **94**, 61–68.
- LING, K., 2008. *Pepino mosaic virus* on tomato seed: virus location and mechanical transmission. *Plant Disease*, **9**, 1701–1705.
- LING, K., WP. WECHTER, R. JORDAN, 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.
- SOLER S., J. PROHENS, MJ. DIEZ, F. NUEZ., 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in Lycopersicon species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology*, **150**, 49–53.
- VAN DER VLUGT R.R.A., 2009. *Pepino mosaic virus*. *Hellenic Plant Protection Journal*, **2**, 47–56.



## **ALLEGATO I - strumentazione, materiali e reagenti**

### ***DAS-ELISA***

#### **Strumentazione**

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Distillatore
4. Frigorifero e congelatore
5. Incubatore termostatico (37°C)
6. Lavatore di piastre automatico (non indispensabile)
7. Lettore piastre ELISA (fotometro) con filtro 405 nm
8. Micropipette calibrate dedicate (P10, P20, P50, P200, P1000)
9. Misuratore di pH
10. Omogeneizzatore a testa rotante manuale o su trapano
11. Pipetta multicanale a 8 o 12 canali

#### **Reagenti**

1. Kit sierologico ELISA anti-PepMV (Bioreba)
2. Reagenti chimici per i tamponi (PBS, PBS-T, tampone carbonato, tampone di estrazione, tampone per substrato)
3. Controllo positivo, sicuramente infetto da PepMV
4. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PepMV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
5. Tampone p-nitrophenyl phosphate substrate

#### **Materiali**

1. Acqua distillata
2. Bustine di plastica per omogeneizzatore
3. Carta da bancone
4. Guanti monouso
5. Pellicola trasparente
6. Piastre polistirene a 96 pozzetti per ELISA.
7. Puntali per micro pipette e multicanale
8. Vetreria varia o materiale plastico monouso

### ***One step RT-PCR***

#### **Strumentazione**

1. Agitatore magnetico
2. Alimentatore per apparati elettroforetici
3. Apparati elettroforetici orizzontali

4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Cappa aspirante
7. Cappa di lavoro per PCR con lampade U.V. (non indispensabile)
8. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
9. Congelatore
10. Distillatore
11. Frigorifero
12. Macchina produttrice di ghiaccio
13. Micropipette calibrate dedicate all'amplificazione (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
14. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione dell'acido nucleico (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
15. Misuratore di pH
16. Termociclatore
17. Transilluminatore
18. Vortex

### Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua RNase free
3. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, TAE, bromuro di etidio o gel-red
4. Azoto liquido (non indispensabile)
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PepMV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
6. Controllo positivo, sicuramente infetto da PepMV
7. Etanolo
8. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 7490450 per 50 campioni)
9. Superscript III one-Step RT-PCR System con Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen cat. No 12574-018)
10. Loading buffer per elettroforesi
11. Marker di DNA (100bp)
12. Oligonucleotidi specifici per PepMV (Ling, 2008)
13. Tampone fosfato 0,1 M pH 7,2

### Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore (per macerazione con tampone fosfato)
2. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
3. Guanti
4. Carta da bancone
5. Mortai e pestelli sterili (macerazione con azoto liquido)
6. Portaprovette

7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1,5 e 2 ml

### ***Real time RT-PCR***

#### **Strumentazione**

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Cappa di lavoro per PCR con lampade U.V. (non indispensabile)
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Congelatore
6. Frigorifero 4-10°C
7. Macchina produttrice di ghiaccio
8. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Micropipette calibrate dedicate all'amplificazione (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
10. Misuratore di pH
11. Omogeneizzatore
12. Termociclatore per real time
13. Vortex

#### **Reagenti**

1. Acqua sterile RNase free
2. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 7490450 per 50 campioni)
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PepMV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da PepMV
5. TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystem Cod. N. 4309169)
6. RNase inhibitor (incluso nel kit ABI Master Mix)
7. Oligonucleotidi e sonda specifici per PepMV
8. Oligonucleotidi e sonda specifici per controllo endogeno per pianta

#### **Materiali**

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore
2. Carta da bancone
3. Guanti
4. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
5. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
6. Provette da 1,5 e 2 ml
7. Puntali sterili per micropipette con filtro