

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
PLUM POX VIRUS (PPV)

**G. Pasquini¹, P.A. Bianco², D. Boscia³, L. Campus¹, P. Casati²,
M. Digiario⁴, F. Palmisano³, C. Poggi-Pollini⁵, F. Punelli¹, C. Rubies⁵**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca
per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

²DISAA, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli studi di Milano

³CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR Sezione di Bari

⁴IAM Istituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano (BA)

⁵DipSA, Patologia Vegetale *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	353
1.1 Ospite	353
1.2 Sintomatologia	354
1.3 Morfologia	355
1.4 Epidemiologia e trasmissione	355
1.5 Diagnosi	356
1.6 Normativa fitosanitaria	356
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	357
2.1 Numeri di campioni	357
2.2 Periodi e modalità di campionamento	359
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	361
3.1 Applicazione delle diverse metodologie di diagnosi	363
3.2 Metodo diagnostico 1: ELISA diretta o DAS-ELISA	364
3.3 Metodo diagnostico 2: ELISA indiretta o DASI-ELISA	368
3.4 Metodo diagnostico 3: one step RT-PCR	374
3.5 Metodo diagnostico 4: real time RT-PCR	380
4. DATI DI VALIDAZIONE	384
4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche in primavera	384
4.2 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi	385
4.3 Metodi diagnostici 1 e 2: ELISA	386
4.4 Metodo diagnostico 3: one step RT-PCR	387
4.5 Metodo diagnostico 4: real time RT-PCR	387
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	389
Allegato I - Strumenti, materiali e reagenti necessari	391

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Plum Pox Virus</i>
Tassonomia	Genere: <i>Potyvirus</i> , Famiglia: <i>Potyviridae</i>
Ceppi individuati	PPV-D; PPV-M; PPV-C; PPV-EA; PPV-W; PPV-Rec; PPV-T
Avversità	Vaiolatura delle drupacee o ‘Sharka’
Acronimo	PPV

Il virus della vaiolatura delle drupacee (= PPV acronimo di *Plum pox virus*) appartiene alla famiglia *Potyviridae*, genere *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005). E’ l’agente di una delle principali malattie delle drupacee, nota come *Sharka* diffusa in tutto il mondo.

La *Sharka* venne descritta per la prima volta da Atanassov (1932), anche se la malattia era già stata segnalata in Bulgaria nel 1917-18 su *Prunus domestica* cv. Kjustendil.

Negli anni successivi si è diffusa in tutta l’area Balcanica e nei Paesi circostanti dell’Europa orientale. Nel 1962 è stata trovata in Ungheria per la prima volta su piante di pesco (Németh, 1963) e negli anni ‘60 e ‘70, in seguito all’espansione del commercio internazionale del materiale vivaistico, si è diffusa progressivamente in gran parte del continente europeo e dei Paesi asiatici bagnati dal Mediterraneo (Roy & Smith, 1994).

Al di fuori del continente europeo e dei Paesi del bacino del Mediterraneo la malattia è migrata nel continente americano (Cile, USA, Canada e Argentina) e in Asia (Cina, Kazakistan, Pakistan e Giappone) (Roy & Smith, 1994; Levy *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2001; Spiegel *et al.*, 2004; Navratil *et al.*, 2005; Dal Zotto *et al.*, 2006; Kollerova *et al.*, 2006; Maejima *et al.*, 2010).

1.1 Ospiti

Per lungo tempo la malattia ha interessato solo susino ed albicocco. Agli inizi degli anni ‘60 ha fatto la sua comparsa in Ungheria su pesco (Németh, 1986) e, più recentemente, su ciliegio acido in Moldavia e Bulgaria e ciliegio dolce in Italia e Bulgaria (Crescenzi *et al.*, 1995; Kalashyan *et al.*, 1994). Attualmente la *Sharka* interessa tutti i Paesi europei e del Bacino del Mediterraneo ed è stata individuata in Cile, Canada, Stati Uniti e India nord-occidentale e Giappone.

Diverse prunoidee ornamentali e spontanee sono ospiti naturali della vaiolatura delle drupacee: *Prunus armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. glandulosa*, *P. insititia*, *P. persica*, *P. brigantina*, *P. laurocerasus*, *P. spinosa*, *P. salicina*, *P. tomentosa*, *P. triloba*, *P. avium*, *P. cerasus* e *P. amygdalus*. Anche alcune specie erbacee appartenenti alle famiglie delle *Solanaceae*, delle *Papillonaceae* e delle *Compositae* sono suscettibili al virus ed alcune di esse sono utilizzate per saggi biologici e la purificazione del virus in laboratorio. La pianta modello *Arabidopsis thaliana* può essere ospite del PPV.

1.2 Sintomatologia

L'espressione dei sintomi della malattia è influenzata da vari fattori quali: la varietà dell'ospite, le condizioni climatiche, la fase vegetativa della pianta, il ceppo virale.

In generale i sintomi si manifestano in maniera più evidente sulle foglie in primavera per poi attenuarsi nel periodo estivo. I sintomi possono comparire sui frutticini non ancora maturi per poi raggiungere la massima intensità di espressione in prossimità dell'epoca di maturazione. In generale, i frutti delle piante infette, indipendentemente dalla specie, sono soggetti a cascola, maturano irregolarmente ed hanno caratteristiche organolettiche scadenti; spesso si osserva una irregolare pigmentazione dell'epidermide con conseguente deprezzamento del prodotto e la polpa sottostante l'anulatura può andare incontro a marcescenza.

1.2.1 Pesco

I primi sintomi rilevabili in pieno campo consistono in una caratteristica rottura di colore dei petali, alterazione cromatica tipica del pesco. Le foglie, alla ripresa vegetativa, presentano deformazioni, distorsioni ed irregolare crescita della lamina, spesso accompagnate da maculature e punteggiature giallo – clorotiche. I frutti manifestano anulature bianco – giallastre più o meno evidenti (Fig.A).

1.2.2 Albicocco

Le foglie manifestano aree clorotiche lineari o sotto forma di anelli che sono più evidenti con temperature inferiori ai 25 °C, mentre tendono ad attenuarsi nei periodi più caldi. I frutti presentano all'invaiaitura lievi depressioni della superficie. Nelle albicocche mature si osservano deformazioni e/o butterature con variegature di colore rossastre a forma di anello. Caratteristica è la presenza sul nocciolo di anelli clorotici ben definiti. Questa sintomatologia è tipica dell'albicocco ed ha un potere diagnostico altamente specifico (Fig.B).

1.2.3 Susino

Le foglie sono interessate da maculature clorotiche lineari o anulari che possono colpire l'intera pianta o solo parte della chioma. I frutti mostrano malformazioni o butterature accompagnate da infossature più o meno accentuate che si manifestano prevalentemente nella fase di invaiatura (Fig. C).



1.3 Morfologia

Le particelle virali, flessuose ed allungate (~660-750 x ~12.5-20 nm), sono costituite da una singola proteina strutturale di circa 36 kDa che avvolge una molecola di RNA a singola elica di polarità positiva di circa 9800 nucleotidi recante una proteina codificata dal virus all'estremità 5' (VPg) e una coda Poli A all'estremità 3'.

Sono stati identificati diversi ceppi del virus su base biologica, sierologica e molecolare. I ceppi più diffusi nelle aree di coltivazione delle drupacee sono il PPV-D ed il PPV-M, alcuni ceppi sono il risultato di ricombinazioni genetiche tra il ceppo D ed il ceppo M. La normativa fitosanitaria attualmente in vigore sul territorio italiano non prevede misure di controllo differenziate in funzione del ceppo rinvenuto.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

Il PPV è trasmesso naturalmente da afidi; *Aphis spiraecola* e *Myzus persicae*, sono considerate le specie più efficienti ma anche altri afidi possono trasmettere il virus seppur con minore frequenza.

Il virus è trasmesso in maniera non persistente: è sufficiente un tempo di acquisizione di 5–10 minuti perché l'afide rimanga infettivo per alcune ore (3–4) e sia in grado di diffondere l'infezione, anche a lunga distanza, grazie ad un volo passivo.

L'efficacia di trasmissione per questa via è influenzata dalla varietà su cui l'afide acquisisce il virus (varietà resistenti e tolleranti necessitano di un tempo di acquisizione più lungo o di una maggiore densità afidica) e dal ceppo virale. È noto che in pesco il ceppo virale PPV-M è trasmesso in maniera molto efficiente (Adamolle *et al* 1994).

Numerosi studi sono stati effettuati per verificare la possibilità di trasmissione del virus per polline o per seme. I risultati finora ottenuti hanno confermato la presenza del virus sia nei granuli pollinici che nei tessuti del seme (sia nei tegumenti che nei cotiledoni), ma non sembra che entrambi possano giocare un ruolo nella diffusione del virus (Pasquini & Barba, 2006).

Il PPV è trasmissibile per innesto e l'uso di materiale di propagazione infetto (portainnesti, talee, marze) è il principale veicolo d'introduzione in zone indenni.

1.5 Diagnosi

La manifestazione sintomatologica è massima nel periodo di ripresa vegetativa delle piante da frutto.

La diagnosi del virus può essere effettuata attraverso diverse metodiche, che differiscono tra loro per sistema di riconoscimento, sensibilità ed applicabilità.

METODI BIOLOGICI: prevedono l'utilizzo di piante indicatrici erbacee (*Choenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, ecc.) e legnose (GF 305, *Prunus tomentosa*) che, se sperimentalmente inoculate con campioni infetti, manifestano in un arco definito di tempo alterazioni specifiche e facilmente individuabili sulle foglie.

METODI DI LABORATORIO: sono basati sul riconoscimento delle componenti chimiche del virus. Si distinguono in:

- **Metodi sierologici:** rilevano il rivestimento proteico del virus, mediante l'uso di anticorpi specifici, prodotti in animali di laboratorio
- **Metodi molecolari:** rilevano l'acido nucleico virale, dopo una estrazione dello stesso dalla matrice vegetale.

1.6 Normativa Fitosanitaria

L'allevamento, la produzione e la commercializzazione del materiale di moltiplicazione della drupacee in relazione alla Sharka sono regolamentate dai seguenti provvedimenti normativi:

- D.M. 14 aprile 1997 “Recepimento delle direttive della Commissione n. 93/48/CEE del 23 giugno 1993, n. 93/64/CEE del 5 luglio 1993 e n. 93/79/CEE del 21 settembre 1993, relative alle norme tecniche sulla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e delle piante da frutto destinate alla produzione di frutto.
- D.M. 20 novembre 2006 “Norme tecniche per la produzione di materiali di moltiplicazione certificati delle Prunoidee”
- D.lgs 214/2005 “Attuazione della Direttiva 2002/89/CE concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali”
- D. M. 28 luglio 2009 (G.U. n°235 del 09.10.09) “Lotta obbligatoria per il controllo del virus Plum pox virus (PPV), agente della «Vaiolatura delle drupacee» (Sharka)”.
- D.lgs 124 del 25 giugno 2010 “Attuazione della direttiva 2008/90 relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto destinate alla produzione di frutti”.

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

2.1 Numero di campioni

norme scaturite da un Gruppo di Lavoro costituito da:

- CRA-PAV (Dott.ssa Graziella Pasquini)
- SFR Regione Piemonte (Dott.ssa Paola Gotta)
- SFR Regione Emilia-Romagna (Dott. Valerio Vicchi)
- SFR Regione Basilicata (Dott. Vincenzo Castoro)

Impianti commerciali

- Prelevare il campione dalle piante sintomatiche;
- Qualora ci si dovesse trovare nella situazione di effettuare un campionamento significativo in impianti completamente asintomatici o con percentuali molto basse di piante sintomatiche, prelevare campioni da ALMENO il 5% delle piante.

Vivai

- CAMPI DI PIANTE MADRI: raccogliere TUTTE le piante singolarmente
- PIANTE IN VENDITA: Il numero di campioni statisticamente significativo da prelevare dai lotti di piante è determinato sulla base della tabella del documento FAO: International standards for Phytosanitary Measures (ISPM) N° 31 ‘Methodologies for sampling of consignments’ (2008), e scaturisce dalla formula:

$$n = [1 - (1 - k)^{1/d}] \times [N - (d - 1)/2]$$

n = numero campioni
 k = livello di confidenza (95%)
 d = numero di unità supposte positive
 N = consistenza della popolazione

Tale formula determina il numero di campioni da prelevare per avere il 95% di probabilità che in un dato lotto non vi siano piante ammalate con un valore ipotetico di diffusione della malattia prestabilito.

Numero di unità/lotto	P= 95% (livello di confidenza)				
	5 ^(*)	2	1	0,5	0,1
100	45	78	95	-	-
200	51	105	155	190	-
300	54	117	189	285	-
400	55	124	211	311	-
500	56	129	225	388	-
600	56	132	235	379	-
700	57	134	243	442	-
800	57	136	249	421	-
900	57	137	254	474	-
1000	57	138	258	450	950
2000	58	143	277	517	1553
4000	58	146	288	556	2108
6000	59	147	291	569	2358
8000	59	147	293	576	2498
10.000	59	148	294	581	2588
30.000	59	148	297	592	2850
50.000	59	149	298	595	2907
70.000	59	149	298	596	2932
90.000	59	149	298	596	2945
200.000+	59	149	298	597	2972

(*) = valore ipotetico di percentuale di diffusione della malattia all'interno del lotto.

2.2 Periodi e modalità di campionamento

Il PPV è un virus a distribuzione erratica nella pianta e la sua concentrazione nei tessuti vegetali subisce una drastica diminuzione quando le temperature ambientali superano i 28-30°C (pur in presenza di sintomi).

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico e 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 nel periodo idoneo;
- la ricerca, quando possibile, di materiale sintomatico
- la raccolta di materiale vegetale esente da alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura;
- Il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

2.2.1 Campionamento primaverile:

CAMPO:

Periodo: Il periodo migliore per il rilevamento del PPV dalle piante è la primavera: si consiglia di effettuare il monitoraggio ed il relativo campionamento dalla ripresa vegetativa fino a quando le temperature esterne **si mantengono intorno a una media di 25-26°C**.

Poiché con temperature esterne superiori l'attendibilità del metodo si riduce sensibilmente, i saggi in tale periodo dovranno essere evitati o effettuati solo in caso di estrema necessità; in quest'ultimo caso gli eventuali campioni negativi dovranno comunque essere confermati da saggi diagnostici effettuati in periodi più idonei.

Solo il saggio di campioni provenienti da frutti maturi sintomatici risulta attendibile se effettuato al di fuori del range di temperature suggerite.

Matrice: La matrice migliore è costituita da foglie e/o fiori **possibilmente sintomatici**, ma, se necessario, è possibile effettuare l'analisi anche a partire da frutti raccolti (fino alla maturazione).

Tipologia del campione: Il campione deve essere rappresentativo di tutta la chioma della pianta: raccogliere 5 germogli o 10 foglie completamente espanse provenienti da almeno 4 branche della pianta (possibilmente all'interno della chioma) e a diverse altezze delle stesse. Le foglie o i fiori devono essere integri: non devono essere senescenti o presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica, che vanno mantenute in borse termiche anche in campo. L'esposizione diretta ai raggi del sole deve essere assolutamente evitata.

Rintracciabilità del campione: Per ogni azienda o vivaio è opportuno compilare una scheda identificativa in cui riportare tutti i dati. Le piante da cui viene prelevato il materiale vegetale per la costituzione del campione da sottoporre all'analisi di laboratorio devono essere opportunamente siglate. La stessa sigla va riportata sulla busta contenente il campione che viene consegnato al laboratorio di analisi.

Spedizione del campione: I campioni raccolti devono essere processati il prima possibile, per cui devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 24 ore.

Laboratorio:

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

Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa non devono essere processati, perché i risultati sono assolutamente inattendibili.

I campioni vegetali che arrivano al laboratorio di analisi caldi ma in buone condizioni devono essere portati alla temperatura di 4°C prima di procedere all'estrazione.

Può essere opportuno mantenere una aliquota del campione vegetale a -20°C per poter ripetere l'analisi in caso di contenzioso.

2.2.2 Campionamento invernale:

CAMPO:

Periodo: Tutto il periodo di riposo vegetativo

Matrice: La matrice migliore è costituita da rami di un anno (preferibilmente dardi o brindilli).

Tipologia del campione: Raccogliere 5 rametti da almeno 5 branche della pianta. I rametti devono essere integri e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica. Deve essere assolutamente evitata l'esposizione diretta ai raggi del sole e la vicinanza a fonti di calore.

Rintracciabilità del campione: Per ogni azienda o vivaio è opportuno compilare una scheda identificativa in cui riportare tutti i dati. Le piante da cui viene prelevato il materiale vegetale per la costituzione del campione da sottoporre all'analisi di

laboratorio devono essere opportunamente siglate. La stessa sigla va riportata sulla busta contenente il campione che viene consegnato al laboratorio di analisi.

Spedizione del campione: I campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 24 ore.

Laboratorio:

I campioni legnosi possono essere mantenuti a 4°C per non oltre 15 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico.

Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa non devono essere processati, perché i risultati sono assolutamente inattendibili.

I campioni vegetali NON DEVONO essere mantenuti a temperature inferiori agli 0°C.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del virus della vaiolatura del susino (PPV) nei laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base della loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, specificità analitica, ripetibilità e riproducibilità (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98).

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** costituito da:

- CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo), Dott.ssa Graziella Pasquini
- CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR Sezione di Bari, Referente: Dott. Donato Boscia
- Di.Pro.Ve sez. Patologia Vegetale Università degli Studi Milano, Referente: Prof. P.A. Bianco
- DISTA Università di Bologna, Referente: Dott. Carlo Poggi-Pollini
- IAM Istituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano (BA), Referente: Dott. Michele Digiaro

Nelle fasi iniziali di lavoro sono stati selezionati dei protocolli da sottoporre a confronto nei cinque laboratori afferenti al gruppo di lavoro, utilizzando campioni di riferimento target (sicuramente infetti da PPV) e non target (esenti dall'infezione, infetti da patogeni correlati). I protocolli sono stati scelti a partire dal Protocollo EPPO (Standard PM 7/32), e dopo aver interpellato tutti i Servizi Fitosanitari Regionali per conoscere i metodi di diagnosi più diffusi sul territorio nazionale nei laboratori che

effettuano analisi per il rilevamento di questo patogeno da quarantena.

Il confronto effettuato nei laboratori del Gruppo di Lavoro ha consentito, sulla base del calcolo dei parametri di validazione, di selezionare i metodi qui riportati.

Metodo 1: ELISA diretta (metodo sierologico basato sul rilevamento del capsido virale)

Metodo 2: ELISA indiretta (metodo sierologico basato sul rilevamento del capsido virale)

Metodo 3: RT-PCR (metodo molecolare basato sul riconoscimento dell'acido nucleico virale)

Metodo 4: real time RT-PCR (rtRT-PCR) (metodo molecolare basato sul riconoscimento dell'acido nucleico virale)

La definizione del parametro di riproducibilità è scaturita dall'esecuzione di un ringtest nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

- SFR Campania, Referente Dott.ssa Paola Spigno
- SFR Emilia Romagna, Referente Dott. Valerio Vicchi
- SFR Lombardia, Referenti: Dott. Beniamino Cavagna e Dott.ssa Marica Calvi
- SFR Molise, Referente Dott. Nicola Zinni
- SFR Piemonte, Referenti: Dott.ssa Paola Gotta e Dott.ssa Giovanna Mason
- SFR Puglia, Referenti: Dott. Antonio Guario e Dott. Anna Percoco
- SFR Sardegna – Laboratorio Fitopatologico AGRIS, Referente Dott.ssa Annamaria Repetto;
- SFR Provincia di Trento – Fondazione Edmund Mach – IASMA, Referente Dott.ssa Paola Bragagna
- SFR Veneto, Referente Dott. Alberto Saccardi
- SFR Marche, Referente Dott. Lucio Flamini

3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire gli standard tecnici di prelievo dei campioni e realizzazione delle analisi di cui al comma 3 dell'art. 3 del D.M. 28 Luglio 2009 [Lotta obbligatoria per il controllo del virus *Plum pox virus* (PPV) agente della "Vaiolatura delle drupacee" (*Sharka*)] si propone di procedere come segue:

Tipo di campione	Saggio diagnostico da effettuare
<ul style="list-style-type: none"> ● Campioni primaverili sintomatici; ● materiale di propagazione asintomatico diretto verso zone di insediamento, proveniente da vivai ricadenti in zona tampone o in zone di insediamento (art. 9, comma 3). 	<p>Saggio diagnostico ELISA (Metodo diagnostico 1 o 2)^(*)</p> <p>^(*) qualunque risultato dubbio deve essere confermato dal saggio molecolare (RT-PCR o rt RT-PCR)</p>
<p>Fonti di approvvigionamento di cui (art. 10, comma 2a e 2b):</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ● Campioni provenienti da piante madri di nuove varietà di drupacee (comma 2a); ● Fonti di approvvigionamento (comma 2b, leggi "Piante madri"). 	<p>Saggio molecolare rt RT-PCR^(*) (Metodo diagnostico 4)</p> <p>^(*) se non si dispone di attrezzature per l'effettuazione della rt RT-PCR si può effettuare la RT-PCR</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● materiale di propagazione asintomatico diretto verso zone indenni, proveniente da vivai ricadenti in zona tampone o da zone di insediamento (art. 9 comma 3; art. 12 comma 2); ● campioni asintomatici localizzati in aree contaminate, zona tampone o zona indenne; ● campioni prelevati in periodi diversi da quelli espressamente indicati nel protocollo di diagnosi 	<p>Saggio molecolare rt RT-PCR^(*) (Metodo diagnostico 4)</p> <p>^(*) se non si dispone di attrezzature per l'effettuazione della rt RT-PCR si può effettuare la RT-PCR</p>

3.2 Metodo diagnostico 1: ELISA diretta o DAS-ELISA

Consiste in una reazione specifica antigene (virus)-anticorpo che avviene su un supporto solido, i pozzetti di una piastra ELISA, e che viene visualizzata mediante una reazione colorimetrica.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.

Vengono utilizzati kit sierologici commerciali e l'efficienza del saggio riportata dalla Ditta produttrice è correlata ai test di qualità effettuati nelle condizioni di lavoro espressamente riportate nel relativo foglietto di istruzioni.

Seguire, quindi, attentamente TUTTE le istruzioni della Ditta produttrice. In particolare effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate.

Utilizzare la diluizione del campione consigliata. Non modificare il tampone di estrazione.

Si riporta la procedura del saggio:

3.2.1 Preparazione dei tamponi

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre ed il tampone PBS (che può essere preparato alla concentrazione 10X) possono essere preparati precedentemente e mantenuti in laboratorio, per non più di 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.

3.2.2 Preparazione del saggio ELISA

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario calcolando di valutare ciascun campione in duplicato (due pozzetti separati) e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ciascuna piastra ELISA è necessario lasciare la prima colonna vuota e caricare un controllo positivo (PPV-infetto), un controllo negativo (PPV-esente) ed un controllo bianco (acqua), tutti in duplicato.

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 da una pianta sicuramente infetta da PPV e da una pianta sicuramente esente da PPV, rispettivamente. In questo caso i controlli devono essere macerati congiuntamente ai campioni da saggiare.

Il controllo acqua è costituito da tampone di estrazione da caricare nel pozzetto al posto del campione vegetale.

I pozzetti appartenenti alla prima colonna vengono inclusi come controlli bianchi e riempiti di tampone al posto del campione vegetale, ma non vanno considerati nel calcolo del rumore di fondo (vedi il capitolo 'Valutazione dei risultati').

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

3.2.3 Preparazione dei campioni.

Preparare il tampone di estrazione e mantenerlo in ghiaccio o a 4°C.

Per la macerazione dei campioni utilizzare bustine ‘tipo Bioreba’ e un omogeneizzatore appropriato (omogeneizzatore Bioreba 400004 o 400005) o una testa rotante (Agdia ACC 00900, Bioreba 400010) montata su un normale trapano.

Scrivere su ciascuna bustina la sigla del campione corrispondente.

a) FOGLIE o FIORI: pesare la quantità 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) LEGNO: prelevare piccoli pezzettini di corteccia con un coltellino fino a raggiungere il floema. La quantità pesata DEVE essere rappresentativa dell’intero campione, per cui è necessario raggiungere la quantità richiesta prelevando piccoli frammenti di corteccia da diversi rametti e/o da diversi punti del campione. Aggiungere la giusta quantità di tampone di estrazione freddo e macerare accuratamente con apparecchio Homex o con testa rotante, aiutandosi eventualmente con un piccolo martello.

Inserire sempre l’estrusione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall’infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggata.

Durante le operazioni di preparazione mantenere le bustine in ghiaccio o in cella fredda a 4°C.

Mantenere i campioni via via macerati in ghiaccio o a 4°C.

3.2.4 Procedura

Sensibilizzazione della piastra ELISA.

Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sulle istruzioni del kit commerciale in tampone carbonato 1X.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Pipettare la quantità di soluzione di anticorpi riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto.

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato.

Lavaggio della piastra

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Distribuzione dei campioni

Caricare i campioni (quantità riportata sulle istruzioni) seguendo lo schema (eliminare i pozzetti della prima colonna), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo acqua (caricare il tampone di estrazione al posto del campione). Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.

Riempire con tampone anche i pozzetti della prima colonna non utilizzati nella prova.

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.

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

Lavaggio della piastra

Sciquare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Coniugato

Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare la quantità della soluzione ottenuta riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato.

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Diluire il substrato 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 tavolette.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Eseguire il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Caricamento del substrato

Caricare la quantità di soluzione di substrato riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.5 Valutazione dei risultati

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo.

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. Fare 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.

Background o rumore di fondo (A) = media dei controlli negativi (eccetto gli 8 pozzetti della prima colonna).

Threshold o limite soglia (B). $B = A \times 2,0$ se questo valore risulta superiore o uguale a 0,1 OD, in caso contrario il valore soglia sarà pari a 0,1 OD.

Campione positivo: $\geq B$

Campione negativo: $< B$

3.3 Metodo diagnostico 2: ELISA indiretta o DASI-ELISA

Il metodo è basato sullo stesso principio dell'ELISA diretta, ma prevede una fase in cui viene utilizzato un anticorpo monoclonale per il PPV e universale (MAb 5b IVIA) in grado di riconoscere tutti i ceppi.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.

Si riporta la procedura del saggio:

3.3.1 Preparazione dei tamponi

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre ed il tampone PBS (che può essere preparato alla concentrazione 10X) possono essere preparati precedentemente e mantenuti in laboratorio, per non più di 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.

3.3.2 Preparazione del saggio ELISA

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario calcolando di valutare ciascun campione in duplicato (due pozzetti separati) e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ciascuna piastra ELISA è necessario lasciare la prima colonna vuota e caricare un controllo positivo (PPV-infetto), un controllo negativo (PPV-esente) ed un controllo bianco (acqua), tutti in duplicato.

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 da una pianta sicuramente infetta da PPV e da una pianta sicuramente esente da PPV, rispettivamente. In questo caso i controlli devono essere macerati congiuntamente ai campioni da saggiare.

Il controllo acqua è costituito da tampone di estrazione da caricare nel pozzetto al posto del campione vegetale.

I pozzetti appartenenti alla prima colonna vengono inclusi come controlli bianchi e riempiti di tampone al posto del campione vegetale, ma non vanno considerati nel calcolo del rumore di fondo (vedi il capitolo 'Valutazione dei risultati').

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

3.3.3 Preparazione dei campioni

Preparare il tampone di estrazione e mantenerlo in ghiaccio o a 4°C.

Per la macerazione dei campioni utilizzare bustine 'tipo Bioreba' e un omogeneizzatore appropriato (omogeneizzatore Bioreba 400004 o 400005) o una testa rotante (Agdia ACC 00900, Bioreba 400010) montata su un normale trapano.

Scrivere su ciascuna bustina la sigla del campione corrispondente.

a) FOGLIE o FIORI: pesare la quantità 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) LEGNO: prelevare piccoli pezzettini di corteccia con un coltellino fino a raggiungere il floema. La quantità pesata DEVE essere rappresentativa dell'intero campione, per cui è necessario raggiungere la quantità richiesta prelevando piccoli frammenti di corteccia da diversi rametti e/o da diversi punti del campione. Aggiungere la giusta quantità di tampone di estrazione freddo e macerare accuratamente con apparecchio Homex o con testa rotante, aiutandosi eventualmente con un piccolo martello.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall'infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

Durante le operazioni di preparazione mantenere le bustine in ghiaccio o in cella fredda a 4°C.

Mantenere i campioni via via macerati in ghiaccio o a 4°C.

3.3.4 Procedura

Sensibilizzazione della piastra ELISA.

Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Pipettare la quantità di soluzione di anticorpi riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto.

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato

Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni

Caricare i campioni (quantità riportata nelle istruzioni) seguendo lo schema (eliminare i pozzetti della prima colonna), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo acqua (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.

Lavaggio della piastra

Sciacquare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Eseguire il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Caricamento dell'anticorpo monoclonale (MAb 5B IVIA)

Diluire l'anticorpo monoclonale alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare la quantità di soluzione di anticorpo monoclonale riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato

Lavaggio della piastra

Eseguire il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del coniugato

Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta

produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare la quantità di soluzione ottenuta riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto

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.

Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato.

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Diluire il substrato 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 tavolette.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Eseguire il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del substrato

Caricare la quantità di soluzione di substrato riportata nelle istruzioni per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.3.5 Valutazione dei risultati

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo.

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. Fare almeno 3 letture a partire dall'inizio della colorazione del controllo positivo (o del primo campione risultato positivo) e proseguire fino a che il controllo negativo resta trasparente.

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

Background o *rumore di fondo* (**A**) = media dei controlli negativi (eccetto gli 8 pozzetti della prima colonna).

Threshold o *limite soglia* (**B**). $B = A \times 2,0$ se questo valore risulta superiore o uguale a 0,1 OD, in caso contrario il valore soglia sarà pari a 0,1 OD.

Campione positivo: $\geq B$

Campione negativo: $< B$

Punti critici dell'ELISA

- a. La sensibilità del test ELISA non consente spesso di rilevare la presenza del virus in piante asintomatiche, si tratta, quindi, di un saggio applicabile con affidabilità solo su campioni sintomatici.
- b. 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).
- c. 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).
- d. Nello schema del test riportare anche il numero di lotto del kit sierologico (può essere determinante per la uniformità di alcuni risultati)
- e. Utilizzare il kit sierologico entro la data di scadenza.
- f. Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.
- g. Controllare con accuratezza il pH dei tamponi utilizzati, perché è determinante per la loro efficienza.
- h. Controllare almeno una volta al mese la taratura delle micropipette utilizzate.
- i. L'efficienza del test ELISA è strettamente dipendente da una buona macerazione del campione vegetale, effettuare con molta cura le operazioni di preparazione del campione. In modo particolare si suggerisce di fare attenzione alla macerazione di campioni vegetali costituiti da foglie provenienti da piante di albicocco che, essendo più coriacee, possono subire una triturazione più blanda con apparecchi per la macerazione tipo Homex, con il conseguente risultato di false reazioni negative.
- j. 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. Il lavaggio manuale mediante uso di una bottiglia a spruzzo è il più efficiente. 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).
- k. 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)
- l. Le soluzioni 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.
- m. Tenere le piastre ELISA sempre coperte con pellicola trasparente o l'apposito coperchio durante le incubazioni.
- n. Controllare sempre la pulizia e le condizioni asettiche dei contenitori in cui vengono preparati e mantenuti i tamponi.
- o. Utilizzare guanti per la manipolazione delle piastre ELISA o fare molta attenzione a non toccare il fondo delle piastre
- p. 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 sempre su doppio pozzetto in modo da evitare che alcuni risultino collocati solo su tali righe e colonne.

Tamponi necessari per l'effettuazione del test ELISA

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

Controllare accuratamente il pH che DEVE essere 9,6

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

Controllare accuratamente il pH che DEVE essere 7,4

Tampone di lavaggio	
PBS	1 Litro
Tween 20 ^(*)	0,5 ml

Controllare accuratamente il pH che DEVE essere 7,4

^(*) 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 ad un litro di PBS.

Tampone di estrazione
Preparare quello riportato sulle istruzioni del kit sierologico.

Tampone coniugato
Preparare quello riportato sulle istruzioni del kit sierologico.

Tampone PNP (substrato)	
dietanolammina	97 ml
H ₂ 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 ₃	

3.4 Metodo diagnostico 3: one step RT-PCR

Il metodo è basato sul riconoscimento di un tratto dell'RNA virale, corrispondente alla proteina capsidica.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.

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 un controllo positivo (PPV-infetto) e un controllo negativo (PPV-esente) per ogni specie saggiata e un controllo bianco (acqua). Si consiglia di non superare il numero di 30 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 PPV e da una pianta sicuramente esente da PPV, rispettivamente.

Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto degli estratti di acidi nucleici totali (TotRNA).

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

3.4.2 Preparazione dei campioni

Utilizzare kit commerciali per l'estrazione di RNA totale da matrice vegetale e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice^(*).

Macerare accuratamente il tessuto vegetale. 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 è distribuito erraticamente nei tessuti delle piante infette.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall'infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

^(*) Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può

procedere come segue, utilizzando il tampone guanidina isotiocianato (MacKenzie *et al.*, 1997):

Pesare 0.5 g di tessuto vegetale e collocarli nella bustina 'Bioreba'

Aggiungere 5 ml di tampone guanidina isotiocianato (4M guanidina isotiocianato, 0.2 M sodio acetato pH 5.0, 25 mM EDTA, 2.5% PVP-40. Prima dell'uso aggiungere 1% metabisolfito di sodio. Preparare i tamponi con H₂O sterile) nella bustina.

Macerare il campione.

Trasferire 1 ml di omogenato in una provetta da 1,5 ml ed aggiungere 100 µl di sarcosyl 20%

Incubare a 70°C per 10 minuti

Trasferire 650 µl nella prima colonnina del kit di estrazione

Proseguire seguendo il protocollo del kit.

3.4.3 Saggio RT-PCR

Primer

Per la diagnosi del PPV i primers suggeriti sono i seguenti (Wetzel *et al.*, 1991):

P1 5'- ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3'

P2 5'- CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3'

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 100 µM in dH₂O 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

Indossare guanti puliti.

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

Miscela di reazione	Ordine di inserimento
500 µM dNTPs (totale)	
0,4 µM ciascun primer (P1/P2)	1- buffer
1,25 U enzima AMV-RT	2- dNTPs
1,25 U enzima Taq DNA polimerasi	3- primers
10 U enzima inibitore delle RNasi	4- acqua
2 µl RNA totale estratto (TRNA)	5- enzimi
Volume totale: 25 µl con acqua sterile RNasi-free	

Mescolare bene la soluzione.

Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.

Aggiungere l'estratto di TotRNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.

Dare una breve centrifugata alle provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.

Inserire le provette nel termociclatore.

Avviare la RT-PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Trascrizione inversa	46 °C	30'	1
Denaturazione	94 °C	3'	1
Amplificazione	94 °C	30"	35
	60 °C	30"	
	72 °C	45"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1

Conservare le provette in frigorifero.

3.4.4 Elettroforesi su gel di agarosio

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

1. Preparare il gel di agarosio 1,2% in TBE1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formata sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
2. Caricare 5-10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 1 µl di loading buffer 10X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
3. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
4. Correre per circa 30 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro o di altri intercalanti degli acidi nucleici di uguale sensibilità..
6. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
7. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V.

3.4.5 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserverà una banda di 243 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti, estratti, 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.
- 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 *RNAsi-free* (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
 - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TRNA);
 - aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
 - 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 DNasi reperibili in commercio.
- controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della RT-PCR.
- 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.
- 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 per la preparazione del gel di agarosio:

TBE 10X		
Tris	108	g
acido borico	55	g
0,5 M EDTA (pH 8)	40	ml
Portare ad 1litro con H ₂ O distillata		
Autoclavare		

Loading buffer 10X in TBE		
Blu di bromofenolo		0,3%
Xilencianolo		0,3%
Glicerolo		60%

Soluzione di etidio bromuro 0,5µg/ml		
Etidio bromuro	50	mg
acqua	100	ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua		

Acqua bidistillata DEPC		
DEPC		0,1%
Lasciare 12 ore a temperatura ambiente in bottiglia chiusa, possibilmente sotto cappa a flusso laminare		
Autoclavare 121°C per 20'		

3.5 Metodo diagnostico 4: real time RT-PCR

Il metodo è basato sul riconoscimento di un tratto dell'RNA virale.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.

3.5.1 Preparazione del saggio rt RT-PCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli. Ciascun campione deve essere replicato 2 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 negativo ogni 30 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 5 ml di acqua sterile al posto dell'estratto;
- 1 controllo negativo ogni 30 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 5 ml di Triton X100 prelevato dalle provette di controllo contenenti la sola membrana non spottata;
- 1 controllo negativo ogni 30 campioni costituito da un campione sicuramente esente da PPV, appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri.
- 1 controllo positivo costituito da un campione, appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, sicuramente infetto dal PPV, preparato congiuntamente agli altri.

3.5.2 Preparazione dei campioni

- Macerare i campioni in bustine tipo Bioreba alla diluizione di 1/10 (w/v) in PBS, pH 7.2 con aggiunta di 2% PVP-10 e 0.2% DIECA
- Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e uno o più controlli sicuramente esenti dall'infezione virale, appartenenti alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.
- Prelevare dalla bustina 1 ml di estratto e versarlo in provette da 2 ml.
- Centrifugare per 3 minuti a 6.000 rpm.
- Preparare quadratini di membrana della dimensione giusta per essere collocati sul fondo conico di una provetta da 1,5 ml.
- Inserire i quadratini nelle provette
- Spottare 5 µl di estratto su una membrana. Ogni 10 campioni lasciare una provetta con una membrana non spottata come controllo negativo.
- Estrarre l'RNA aggiungendo nel tubo 100 µl di 0.5% Triton X100 (facendo in modo che la membrana resti completamente immersa), vortexare, incubare 2-3 minuti a temperatura ambiente, mettere in ghiaccio.
- Effettuare tale operazione anche sulle membrane di controllo, prive di estratto.

*Nel prelevare l'estratto verde dalle bustine di estrazione fare molta attenzione a non sporcare la micropipetta per evitare contaminazioni a livello di estratto vegetale. Le membrane spottate si possono conservare a 4°C per 2 giorni o a -20 °C per periodi 3 mesi
Le membrane con il Triton X100 possono essere conservate a -20 °C per 3 mesi*

3.5.3 Procedura

Primer e sonda

Per la diagnosi del PPV si utilizzano i primers e la sonda TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) di seguito riportati:

Primer P241	5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3'
Primer P316D	5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3'
Primer P316M	5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3'
TaqMan probe PPV-DM	5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3

- I primers e la sonda possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati.
- Diluire i primers alla concentrazione d'uso di 100µM in dH₂O sterile e suddividerli in aliquote da mantenere a -20 °C.
- E' conveniente diluire la sonda ad una concentrazione di 50µM in dH₂O sterile e conservare la soluzione madre a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 ml totali ad una concentrazione d'uso di 5µM in dH₂O sterile e conservarle a -20°C da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione.
- 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.

1. Indossare guanti puliti.
2. Sterilizzare sotto UV pipette, puntali con filtro, portaprovette.
3. Preparare la mix in un area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR)
4. Se si utilizzano provette NON siglarle per nessun motivo (il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore), metterle

- in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio, distribuire i controlli negativi all'interno della piastra alternando circa un controllo negativo ogni 10 campioni (nitrocellulose, sani e bianchi alternati)
5. Se si utilizzano piastre disporle sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.
 6. Scongela i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione sotto specificata
 7. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

Miscela di reazione:

- 12,5 µl 2X one step RT Master mix TaqMan (Applied Biosystems)
 - 0.625 µl 40X MultiScribe RT e RNase inhibitor mix (Applied Biosystem)
 - 5.635 µl dH₂O
 - 0.25 µl 100µM primer P241
 - 0.12 µl 100µM primer P316D
 - 0.12 µl 100µM primer P316M
 - 0.75 µl 5µM TaqMan probe PPV-DM
8. Distribuire 20 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
 9. Cambiare area di lavoro_e caricare 5 µl di estratto con una micro pipetta dedicata SOLO a questo scopo.
 10. Inserire le provette o la piastra nel termociclatore
 11. Avviare la PCR dopo aver selezionato il programma prescelto:

Ciclo

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

12. Controllare i risultati mediante visualizzazione del grafico e del valore di Ct di ciascun campione.

3.5.4 Valutazione dei risultati

Considerare positivi tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di Ct, mantenendo il limite soglia (threshold) stabilito automaticamente. I campioni con un valore di Ct > 35 devono essere considerati negativi o analizzati di nuovo se i controlli negativi e bianchi hanno un valore di Ct analogo. In ogni caso il valore di Ct soglia va verificato in ciascun laboratorio.

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della rt RT-PCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti, estratti, 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.
- 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 *RNAsi-free* (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
 - 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 TRNA);
 - aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
 - 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; 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 DNasi reperibili in commercio.
 - pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti documenti: ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98.

- **Sensibilità specifica**
- **Specificità**
- **Accuratezza relativa**
- **Sensibilità analitica**
- **Specificità analitica**
- **Ripetibilità**
- **Riproducibilità**

Tutte le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento ('target' e 'non target').

Campioni di riferimento 'target': isolati che coprono la diversità genetica, la distribuzione geografica e le diverse specie ospiti del patogeno.

Campioni di riferimento 'non target': isolati infetti da patogeni simili che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali stesso genere), campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

Le prove di validazione sono state effettuate in due fasi vegetative delle piante:

- primavera, a partire da campioni fogliari sintomatici ed asintomatici
- inverno, a partire da campioni legnosi.

4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche in primavera

Per la validazione dei metodi diagnostici in primavera sono stati utilizzati 46 campioni di riferimento così distribuiti:

- **39 campioni 'target'** infetti da PPV e provenienti da diversi areali geografici italiani:
 - **5** campioni fogliari sintomatici appartenenti a: albicocco, susino, mirabolano e GF305, infetti da **PPV ceppo D**;
 - **9** campioni fogliari sintomatici appartenenti a: albicocco, susino, pesco e GF 305, infetti da **PPV ceppo M**;
 - **1** campione fogliare sintomatico proveniente da pesco infetto da **PPV ceppo El Amar**;
 - **1** campione fogliare sintomatico proveniente da susino infetto da **PPV ceppo Rec** (ricombinazione all'estremità 3' del gene *Nlb*) ;
 - **1** campione fogliare sintomatico proveniente da *Nicotiana benthamiana* infetta da PPV ceppo C;

- **21** campioni fogliari asintomatici provenienti da peschi infetti da **PPV ceppo M**;
- **1** campione di frutto di albicocco sintomatico infetto da **PPV ceppo D**
 - **4 campioni ‘non target’** rappresentati da materiale infetto da altri patogeni virali comunemente presenti nelle drupacee e da un altro virus appartenente al genere *Potyvirus*:
- **1** campione di patata infetto da virus Y della patata (**PVY**) (*Potyvirus*);
- **1** campione di GF 305 infetto dal virus della maculatura clorotica fogliare del melo (**ACLSV**);
- **1** campione di GF 305 infetto dal virus della maculatura anulare necrotica dei *Prunus* (**PNRSV**);
- **1** campione di GF 305 infetto dal virus del nanismo del *Prunus* (**PDV**);
- **3 campioni ‘non target’** rappresentati da specie ospiti del PPV, esenti da infezione virale:
- **1** campione di **albicocco** esente da infezioni virali;
- **1** campione di **susino** esente da infezioni virali;
- **1** campione di **pesco** esente da infezioni virali.

4.2 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi

Per la validazione dei metodi diagnostici in inverno sono stati utilizzati 25 campioni di riferimento così distribuiti:

- **19 campioni ‘target’** infetti da PPV e provenienti da diversi areali geografici italiani:
- **7** campioni legnosi di albicocco, susino, mirabolano, GF 305 infetti da **PPV ceppo D**;
- **10** campioni legnosi di albicocco, susino, pesco, GF 305 infetti da **PPV ceppo M**;
- **1** campione legnoso di pesco infetto da **PPV ceppo El Amar**;
- **1** campione legnoso di susino infetto da **PPV ceppo Rec** (ricombinazione all'estremità 3' del gene N1b);
- **3 campioni ‘non target’** rappresentati da materiale infetto da altri patogeni virali comunemente presenti nelle drupacee:

- 1 campione legnoso di GF 305 infetto dal virus della maculatura clorotica fogliare del melo (**ACLSV**);
 - 1 campione legnoso di GF 305 infetto dal virus della maculatura necrotica anulare dei *Prunus* (**PNRSV**);
 - 1 campione legnoso di GF 305 infetto dal virus del nanismo del *Prunus* (**PDV**);
- **3 campioni ‘non target’** rappresentati da specie ospiti del PPV, esenti da infezione virale:
- 1 campione legnoso di **albicocco** esente da infezioni virali;
 - 1 campione legnoso di **susino** esente da infezioni virali;
 - 1 campione legnoso di **pescio** esente da infezioni virali.

4.3 Metodi diagnostici 1 e 2: ELISA

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

kit sierologici: Kit universale MAb 5B Agritest^(*) codice : K-10 ; Bioreba, codice: 150565;

Piastre a 96 pozzetti per ELISA: Nunc immunoplaste maxisorp F96 735-0199; Falcon 3911; Costar High Binding ELISA plates (Corning Inc., Corning, NY Cat);

Substrato: Sigma S=942 TAB;

Bustine per campioni: Bioreba codice 430100, Sediag SAC-Acc0500

Omogeneizzatore: trapano con testa rotante Bioreba 400010 o Sediag BRO-Acc-100

Lettoce per piastre ELISA: Labsystems Multiskan EX, TECAN

Micropipette: Gilson

Lavaggio manuale delle piastre

(*) Cambra *et al.*, 1994. EPPO Bulletin, 24,569-577.

Valori	Campioni primaverili sintomatici	Campioni primaverili asintomatici	Campioni invernali
Sensibilità	100%	57%	70%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	78%	85%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³	n.s. ⁽²⁾	10 ⁻³
Specificità analitica	100%	100%	100%
Ripetibilità ⁽³⁾	100%	n.s.	n.s.
Riproducibilità ⁽⁴⁾	88,89%	n.s.	n.s.

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹²

⁽²⁾: n.s. = non saggiato

⁽³⁾: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁸

⁽⁴⁾: La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da undici laboratori.

4.4. Metodo diagnostico 3 one step RT-PCR

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 Qiagen; Spectrum Plant Total RNA Kit cat. 000010 Sigma-Aldrich.

Enzima AMV Reverse Trascrittasi: M5108 Promega Corporation

Enzima MuLV Reverse trascrittasi: Promega M-MLV RT M1701

Enzima Taq polimerasi: Go Taq DNA polimerasi M3175 Promega Corporation, AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase 4398823

Enzima inibitore delle RNasi: RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor cod. 10777-019 Invitrogen Ltd

dNTPs: Promega, Cat N° C1141

primers specifici per PPV: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Termociclatore: MJ PTC200, Applied bioystem 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

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

Valori	Campioni primaverili sintomatici	Campioni primaverili asintomatici	Campioni invernali
Sensibilità	100%	66%	65%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	83%	82%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁶	n.s. ⁽²⁾	10 ⁻⁵
Specificità analitica	100%	100%	100%
Ripetibilità ⁽³⁾	100%	n.s.	n.s.
Riproducibilità ⁽⁴⁾	92,03%	n.s.	n.s.

⁽¹⁾: La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹²

⁽²⁾: n.s. = non saggiato

⁽³⁾: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁸

⁽⁴⁾: La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori dei SFR.

4.5 Metodo diagnostico 4: real time RT-PCR

Valori di validazione

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

Bustine plastica per campioni vegetali: Bioreba codice 430100

Termociclatore: ABIPRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystem; CFX96 Biorad;

TaqMan Probe e primers: sintetizzati da Applied Biosystem o Sigma Aldrich

Membrana: Nylon membranes positively charged, Roche; Whatman 3MM carta

Valori	Campioni primaverili sintomatici	Campioni primaverili asintomatici	Campioni invernali
Sensibilità	100%	95%	76%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	97%	88%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁶	n.s. ⁽²⁾	10 ⁻⁶
Specificità analitica	100%	100%	100%
Ripetibilità ⁽³⁾	100%	n.s.	n.s.
Riproducibilità ⁽⁴⁾	100%	n.s.	n.s.

⁽¹⁾: La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹²

⁽²⁾: n.s. = non saggiato

⁽³⁾: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁸

⁽⁴⁾: La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da quattro laboratori dei SFR.

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ADAMOLLE, C.; M. BOEGLIN; G. LABONNE; T. CANDRESSE, JB. QUIOT, 1994. Une souche nécrogène du plum pox potyvirus provoque un dépérissement sur certains cultivars de pêcher. *OEPP/EPPO Bulletin* **24**, 721-730.
- ATANASOFF D., 1932. *Plum pox*. A new virus disease. *Yearbook. University of Sofia. Faculty Agriculture and Silviculture*. **11**, 49- 69.
- CAMBRA M., N. CAPOTE, A. MYRTA, G. LLACER, 2006. *Plum pox virus* and the estimated cost associated with disease. *OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 2002-204.
- CRESCENZI A., M. NUZZACI, L. LEVY, P. PIAZZOLLA, A. HADIDI, 1995. Plum pox virus (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae*, **386**, 219-225.
- DAL ZOTTO A., JM. ORTEGO, JM. RAIGON, S. CALOGERO, M. ROSSINI, D.A. DUCASSE, 2006. First report in Argentina of *Plum pox virus* causing sharka disease in *Prunus*. *Plant Disease* **90**, 523.
- FAUQUET CM., MA. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER, LA. BALL, 2005. <http://www.virologyj.com/content/2/1/64>.
- KALASHYAN JA., ND. BILKEJ, TD. VERDEREVSKAYA, EV. RUBINA, 1994. Plum pox virus on sour cherry in Moldova. *Bulletin OEPP/EPPO*, **24**: 645-649.
- Gottwald e Hughes, 2000. Proceedings of the 14 th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 77-87
- KOLLEROVA E., S. NOVAKOVA, Z. ŠUBR, M. GLASA, 2006. *Plum pox virus* mixed infection detected on apricot in Pakistan. *Plant Disease* **90**, 1108.
- LEVY L., V. DAMSTEEGT, R. WELLIVER, 2000. First report of *Plum pox virus* (Sharka Disease) in *Prunus persicae* in the United States. *Plant Disease*, **84**, 202
- MACKENZIE DJ., MA. MCLEAN, S. MUKERJI, M. GREENET, 1997. Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* **81**, 222-226
- MAEJIMA K., H. HOSHI, M. HASHIMOTO, M. HIMENO, T. KAWANISHI, K. KOMATSU, Y. YAMAJI, H. HAMAMOTO, S. NAMBA, 2010. First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *Journal of General Plant Virology* **76**(3), 229-231.
- NAVRATIL M., D. SAFAROVA, R. KARESOVA, K. PETRZIK, 2005. First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China. *Plant Disease Note* **89**, 338.
- NÉMETH M., 1963. Field and greenhouse experiments with *Plum pox virus*. *Fhytopatologia mediterranea* **2**, 162-166.
- OLMOS A., E. BERTOLINI, M. GIL, M. CAMBRA, 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, **12**, 151-155
- PASQUINI G., M. BARBA, 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *OEPP/EPPO Bulletin*, **36**, 287-292.
- ROY AS., IM. SMITH, 1994. *Plum pox* situation in Europe. *Bulletin OEPP/EPPO*, **24**, 515-524.
- SPIEGEL S., E. KOVALENKO, A. VARGA, D. JAMES, 2004. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan. *Plant Disease* **88**, 973-979.

- THOMPSON D., M. McCANN, M. McLEOD, D. LYE, M. GREEN, D. JAMES, 2001. First report of *Plum pox virus* in Canada. *Plant Disease* **85**,97.
- WETZEL T., T. CANDRESSE, M. RAVELONANDRO, J. DUNEZ, 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to Plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* **33**, 355-365.

ALLEGATO I - Strumentazione, reagenti e materiali

ELISA diretta e indiretta

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
8. Micropipette dedicate e calibrate (P10, P20, P50, P200, P1000)
9. Pipetta multicanale (non indispensabile)
10. Omogeneizzatore tipo Homex
11. pHmetro

Reagenti

1. kit sierologico ELISA anti-PPV
2. reagenti chimici per i tamponi (PBS, PBS-T, tampone carbonato, tampone di estrazione, tampone per substrato)
3. substrato (PNP)
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.

Materiali

1. acqua distillata
2. bustine di plastica per omogeneizzatore tipo Homex
3. carta da bancone
4. carta da laboratorio
5. carta di alluminio
6. guanti monouso
7. pellicola trasparente
8. piastre polistirene a 96 pozzetti per ELISA.
9. puntali per micropipette
10. vetreria varia o materiale plastico monouso

One step RT-PCR

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore
9. Frigorifero
10. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
11. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. pHmetro
13. Termociclatore
14. Transilluminatore
15. Vortex

Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua RNase free
3. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, TAE, bromuro d'etidio
4. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Controllo positivo, sicuramente infetto da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
6. Enzima AMV RT
7. Enzima RNase inhibitor
8. Etanolo
9. Kit commerciale per estrazione RNA
10. Loading buffer per elettroforesi
11. Marker di DNA (100bp)
12. Primers specifici per PPV
13. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
14. azoto liquido
15. guanidina isotiocianato (se non si dispone di azoto liquido)
16. sodio acetato (se non si dispone di azoto liquido)
17. EDTA (se non si dispone di azoto liquido)
18. PVP-40 (se non si dispone di azoto liquido)

Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore tipo Homex
2. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
3. Guanti
4. Mortai e pestelli
5. Carta da laboratorio
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. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
4. Congelatore
5. Distillatore
6. Frigorifero
7. Micropipette dedicate all'estrazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
8. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Omogeneizzatore tipo Homex
10. pHmetro
11. Termociclatore per real time
12. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile RNase free
2. Composti chimici per la preparazione del tampone di estrazione
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da PPV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Mix per real time one step RT-PCR
6. RT inhibitor
7. Primers e sonda specifici per PPV
8. Triton X100

Materiali

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