

**Protocollo diagnostico per  
'*Candidatus Phytoplasma  
prunorum*'**



## Descrizione della malattia

<b>Agente causale</b>	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum'
<b>Tassonomia</b>	Classe: Mollicutes Gruppo ribosomico: 16SrX (AP - Apple proliferation group) Sottogruppo: 16SrX-B
<b>Cepi individuati</b>	
<b>Avversità</b>	Giallume europeo delle drupacee
<b>Acronimo</b>	ESFY ( <i>European stone fruit yellows</i> )

**ospiti:** albicocco, susino cino-giapponese, susino europeo (solo raramente sintomatico), pesco, mandorlo, diverse specie selvatiche e ornamentali di *Prunus*.

**Vettore:** *Cacopsylla pruni* (Psillide)

### Sintomatologia

Il sintomo più caratteristico delle infezioni da '*Ca. P. prunorum*' è rappresentato dall'emissione anticipata delle foglie durante il riposo vegetativo. Questo sintomo, conseguente agli squilibri ormonali indotti dalla presenza del fitoplasma, consente una facile identificazione in campo delle piante infette che, in questa fase, si distinguono agevolmente dalle piante sane, ancora prive di foglie perchè in riposo o in piena fioritura. Successivamente, nel corso della stagione vegetativa, si ha la progressiva comparsa di alterazioni cromatiche (ingiallimenti e/o arrossamenti) e di consistenza della lamina fogliare e delle nervature principali dovute alla mancata traslocazione della linfa elaborata conseguente all'occlusione meccanica e alla degenerazione dei tubi floematici. In particolare, a primavera inoltrata, le porzioni di pianta colpite dalla malattia presentano foglie clorotiche e di taglia ridotta. A tali alterazioni si accompagna, nel corso dell'estate-autunno, una caratteristica deformazione della lamina fogliare che si ripiega 'a doccia' con i margini rivolti verso l'alto e un'anomala proliferazione di gemme dormienti con produzione di germogli secondari e fiori. A causa di un'estesa necrosi del tessuto floematico si può osservare, infine, anche la comparsa di un caratteristico imbrunimento del legno al di sotto della corteccia (leptonecrosi). I frutti risultano più piccoli e deformati. Generalmente tali sintomi compaiono inizialmente solo su qualche ramo o branca per poi estendersi all'intera chioma con

conseguente morte della pianta nell'arco di 2-5 anni, in funzione della suscettibilità alla malattia del portinnesto e della varietà e della virulenza del ceppo del patogeno.

### ***Epidemiologia e trasmissione***

Il fitoplasma è trasmesso in natura dallo Psillide *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 1998, 2001; Jarausch *et al.*, 2001, 2007) specie strettamente oligofaga che si alimenta su diverse specie spontanee e coltivate di *Prunus* (ospite primario). L'insetto compie una sola generazione all'anno svernando come adulto su piante di conifere (ospite secondario), su cui migrano a partire dal mese di luglio. A febbraio gli adulti svernanti si riportano sulle piante di *Prunus* (reimmigranti) dove avviene l'ovideposizione e lo sviluppo della nuova generazione. Il fitoplasma è trasmesso in maniera persistente sia dagli adulti di nuova generazione sia dai reimmigranti; quest'ultimi trasmettono il fitoplasma acquisito nel corso dell'anno precedente (Carraro *et al.*, 2004).

'Ca. P. prunorum' può essere trasmesso da pianta a pianta tramite innesto. Tale trasmissione può avvenire anche nel corso della stagione invernale dal momento che il fitoplasma è presente sulla parte aerea della pianta anche durante la fase di riposo vegetativo. Il fitoplasma non è, invece, trasmissibile mediante il seme.

### ***Diagnosi***

Come per tutti i fitoplasmii, la diagnosi di 'Ca. P. prunorum' si basa essenzialmente su metodi molecolari in grado di rilevare ed amplificare il DNA del fitoplasma, dopo estrazione dello stesso dalla matrice vegetale. L'impossibilità di coltivare questi patogeni *in vitro* e la loro generalmente scarsa capacità immunogenica ne impediscono, infatti, una identificazione su base morfologica o sierologica.

### ***Normativa fitosanitaria***

- D.M. 31 gennaio 1996, (suppl. ord. n. 33 alla G.U. n. 41 del 19 febbraio 1996), concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nel territorio della Repubblica italiana di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e successive modificazioni;
- D.lgs 19 agosto 2005, n. 214 "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"
- Tale patogeno, inoltre, è soggetto alle disposizioni contenute nel D.M. del 14/4/1997 (recepimento delle direttive 93/48/CEE, n. 93/64/CEE e n. 93/79/CEE), recante le 'Norme tecniche sulla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e delle piante da frutto destinate alla produzione di frutto.
- Infine, a seguito della istituzione del Servizio Volontario di Certificazione Nazionale (D.M. del 23 ottobre 1987), tale patogeno è soggetto alle disposizioni contenute nel D.M. del 20 novembre 2006 recante le "Norme tecniche per la produzione di materiale di propagazione vegetale certificato di Prunoidee".



**Metodologie  
diagnostiche**

## Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione di 'Ca. P. prunorum' agente del giallume europeo delle drupacee (ESFY) nei laboratori presenti sul territorio italiano. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base della loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità.

Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazione dettagliatamente specificati e di seguito riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- 1- CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma - Coordinatore del Gruppo (Graziella Pasquini, Luca Ferretti, Elisa Costantini)
- 2- CNR-IVV, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino (Cristina Marzachì, Sabrina Palmano)
- 3- Di.Pro.Ve sez. Patologia Vegetale, Università degli Studi Milano (Piero Attilio Bianco, Paola Casati)
- 4- DISTA - Patologia vegetale, Università di Bologna (Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri)
- 5- DISA, Università di Udine (Marta Martini)

***Nota.** La definizione del parametro di riproducibilità verrà effettuata a seguito di un ringtest nazionale che è in fase di allestimento e vedrà coinvolti i laboratori dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR).*

La diagnosi di 'Ca. P. prunorum' può essere effettuata esclusivamente su base molecolare, mediante:

Metodo diagnostico	Componente fitoplasmale riconosciuta
PCR <i>nested</i>	acido nucleico del fitoplasma (DNA)
TaqMan real time PCR (rt PCR)	acido nucleico del fitoplasma (DNA)

## Prove di validazione

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri utilizzando campioni di riferimento.

- **Sensibilità specifica:** capacità del protocollo di rilevare la presenza del patogeno nei campioni sicuramente infetti;
- **Specificità:** capacità del protocollo di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti dal patogeno in esame;
- **Accuratezza:** il valore risultante dal calcolo della sensibilità specifica e della specificità;
- **Sensibilità analitica:** la più piccola quantità di entità infettiva che può essere identificata dal protocollo di diagnosi (nel caso di patogeni virali vegetali, che non possono essere quantificati *in vitro*, corrisponde alla diluizione limite dell'estratto iniziale nella quale il protocollo riesce ad individuare il patogeno);
- **Ripetibilità:** corrispondenza dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso protocollo con gli stessi campioni di riferimento e nelle stesse condizioni di lavoro (strumentazioni, operatore, laboratorio), ripetendo la metodica a brevi intervalli di tempo;
- **Riproducibilità:** corrispondenza dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso protocollo con gli stessi campioni di riferimento in diversi laboratori, usando diversa attrezzatura.

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

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

**Campioni di riferimento 'non target':** i) isolati di fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi nell'ambito del gruppo 16SrX, ii) patogeni geneticamente correlati (batteri fitopatogeni associati allo stesso ospite vegetale), iii) campioni non infetti appartenenti alla stessa specie vegetale ospite.

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

- fine riposo vegetativo, a partire da tessuto sottocorticale prelevato da piante sintomatiche ed asintomatiche;
- fine stagione vegetativa, a partire da nervature fogliari prelevate da piante sintomatiche ed asintomatiche

### Validazione delle metodologie diagnostiche

In entrambi i periodi di campionamento, per la validazione dei metodi diagnostici sono stati utilizzati 28 campioni di riferimento, di cui:

- **21 campioni 'target'** infetti da 'Ca. P. prunorum' e provenienti da diversi areali geografici italiani, così ripartiti:
  - 7 campioni sintomatici di albicocco;
  - 9 campioni sintomatici di susino cino-giapponese;
  - 3 campione asintomatici di susino europeo;
  - 2 campioni sintomatici di pesco

- **4 campioni 'non target'** rappresentati da DNA di batteri fitopatogeni comunemente associati a drupacee e campioni infetti da fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi dal 16SrX-B, come di seguito specificato:
  - 1 estratto di DNA di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolato da albicocco;
  - 2 campioni infetti da 'Ca. P. mali' (sottogruppo ribosomico 16SrX-A, ceppo AP e AT rispettivamente);
  - 1 campione infetto da 'Ca. P. pyri' (sottogruppo ribosomico 16SrX-C);
- **3 campioni 'non target'** rappresentati da specie ospiti di 'Ca. P. prunorum', esenti da infezione di ESFY, così ripartiti:
  - 1 campione di **albicocco** esente da ESFY;
  - 1 campione di **susino** esente da ESFY;
  - 1 campione di **pescio** esente da ESFY.



## Protocollo PCR *nested*

### 1. Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

**kit commerciali per estrazione DNA totale da tessuto vegetale:** DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106);

**Enzima Taq polimerasi:** GoTaq DNA polimerasi, Promega Corporation (cat. #M3175)

**dNTPs:** Promega, Cat N° C1141

**primers universali (PCR diretta) e gruppo X-specifici (PCR-*nested*):** sintetizzati da Invitrogen Ltd

**Termociclatore:** MJ PTC200, Applied Bioystems 9700

**Transilluminatore:** Biorad Geldoc 2000

**Marker per DNA:** GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas (#SM0311)

Parametri	I campionamento (tessuto sottocorticale)	II campionamento (nervature fogliari)
Sensibilità	86%	86%
Specificità	100%	100%
Accuratezza	93%	93%
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%	100%
Riproducibilità	n.s.	68,7% <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10<sup>-6</sup>

<sup>(2)</sup> La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10<sup>-6</sup>

<sup>(3)</sup> La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori  
n.s. = non saggiato

## Protocollo TaqMan real time PCR

### 1. Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

**Kit estrazione DNA totale da tessuto vegetale:** DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106);

**Master Mix:** KAPA™ PROBE FAST ABI Prism 2X qPCR Master Mix (cod. KK4706); KAPA™ PROBE FAST Universal 2X qPCR Master Mix (cod. KK4702), Kapa Biosystems

**Piastre:** Fast Optical 96-W Barcoded (cod N8010560) Applied Biosystems

**Pellicola per piaster rt PCR:** Optical Adesive Covers (cod. 4311971), Applied Biosystems

**Bustine plastica per campioni vegetali:** Bioreba (cod. 430100)

**Termociclatore:** ABI Prism 7500 Fast Real-Time System, Applied Biosystems;

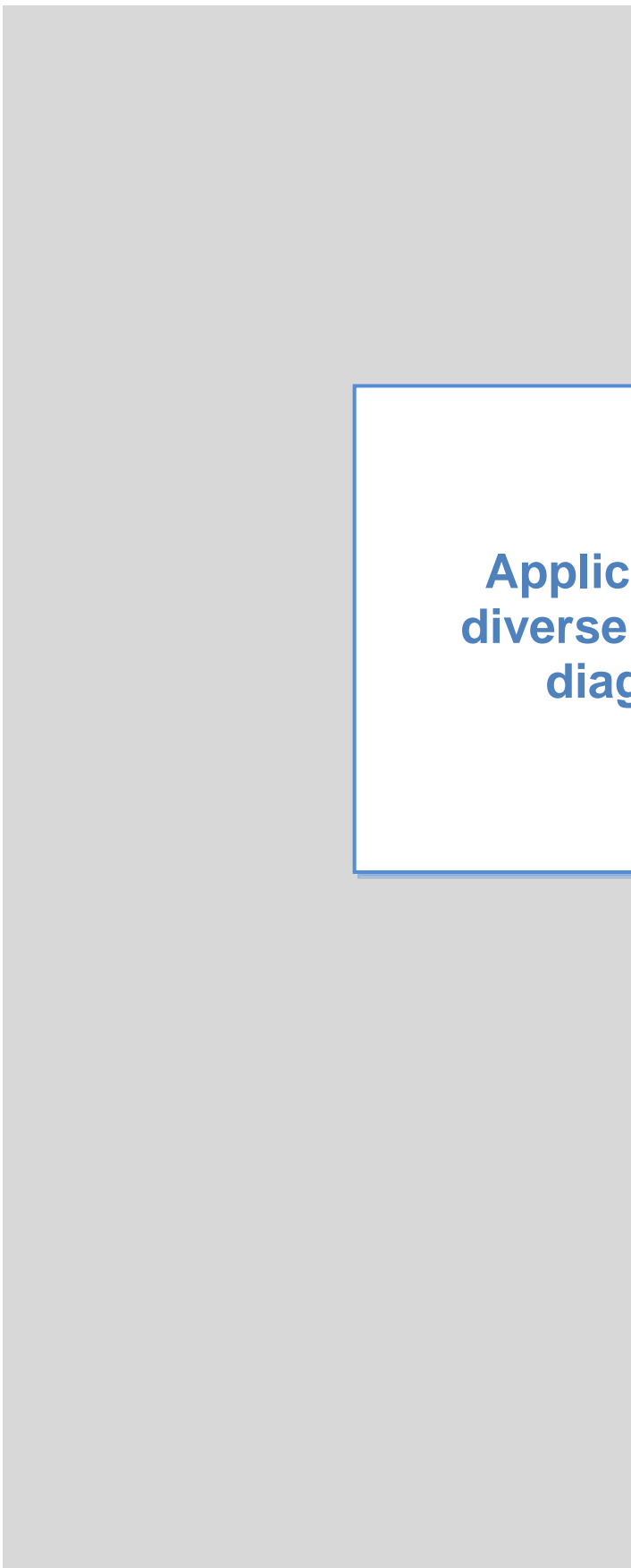
**TaqMan probe e primers:** sintetizzati da Applied Biosystems

Parametri	I campionamento (tessuto sottocorticale)	II campionamento (nervature fogliari)
Sensibilità	100%	86%
Specificità	100%	100%
Accuratezza	100%	93%
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%	100%
Riproducibilità	n.s.	80%

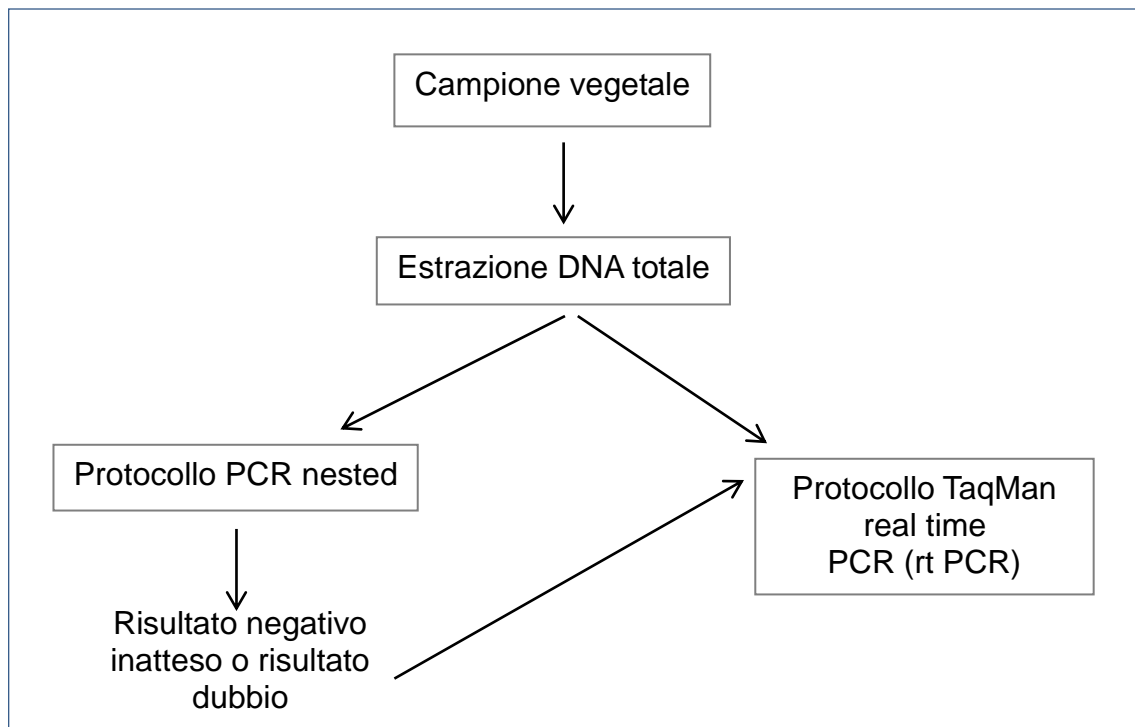
<sup>(1)</sup> La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10<sup>-6</sup>

<sup>(2)</sup> La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10<sup>-6</sup>

<sup>(3)</sup> La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori  
n.s. = non saggiato



**Applicazione delle  
diverse metodologie  
diagnostiche**



- E' possibile saggiare il campione vegetale, prelevato in opportuna fase vegetativa (vedi capitolo campionamento), attraverso l'uso di una PCR diretta effettuata con i primers P1/16S-Sr, seguita da una PCR nested effettuata con i primers fO1/rO1 oppure utilizzando il protocollo di TaqMan real time PCR.
- Nel caso in cui con il protocollo di PCR nested si ottengano risultati dubbi (campione sintomatico negativo o banda non perfettamente identificabile) ripetere l'analisi effettuando la real time PCR (rt PCR).



**CAMPIONAMENTO**

## Periodi e modalità di campionamento

Un corretto campionamento ed il buono stato di conservazione del materiale vegetale da analizzare sono presupposti fondamentali per l'attendibilità del risultato ottenuto con qualsiasi saggio diagnostico.

### 1. Campionamento a fine riposo vegetativo

#### 1.1 Campo

Periodo. Il periodo prossimo alla fine del riposo invernale (fine gennaio-febbraio) risulta particolarmente idoneo per una facile e sicura individuazione delle piante infette da 'Ca. P. prunorum'. A causa, infatti, dell'anticipo vegetativo indotto dal fitoplasma, in questo periodo le piante infette si individuano facilmente poiché mostrano già le foglie rispetto alle piante sane ancora prive di foglie o con i soli fiori.

Poiché il fitoplasma è presente sulla parte area della pianta anche durante tutto il periodo invernale, l'esecuzione di saggi diagnostici alla fine del riposo vegetativo è da ritenersi attuabile ed affidabile.

Matrice. La matrice migliore è costituita da tessuto floematico sottocorticale ottenuto da rametti di 1-2 anni.

Tipologia del campione. Il campione deve essere rappresentativo delle varie porzioni sintomatiche della chioma. I rametti devono essere integri non devono, cioè, 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.

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.

#### 1.2 Laboratorio

I rametti possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 15 giorni. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico (*nota: i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o comparsa di muffe non devono essere processati, perché i risultati potrebbero non essere attendibili*).

Eliminare la corteccia grattando leggermente la superficie dei rametti con un bisturi, quindi prelevare il tessuto floematico sottocorticale grattando, con lo stesso bisturi, più in profondità.

Può essere opportuno mantenere una aliquota di tessuto sottocorticale a -20°C (previa polverizzazione in azoto liquido) o a temperatura ambiente (previa liofilizzazione), per poter ripetere l'analisi in caso di contenzioso.

## 2. Campionamento a fine stagione vegetativa

### 2.1 Campo

Periodo. Fine estate-inizio autunno.

Matrice. La matrice migliore è costituita da nervature fogliari.

Tipologia del campione. Raccogliere 20-30 foglie dalle varie porzioni sintomatiche della chioma o dall'intera chioma. Le foglie devono essere integre e non in avanzato stato di senescenza e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o biotici di altra natura. Prelevare solo foglie con nervature integre, prive di necrosi e/o imbrunimenti.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica, che vanno mantenute in borse termiche. 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.

### 2.1 Laboratorio

I campioni fogliari possono essere mantenuti a 4°C non oltre 4 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico (*nota: i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o comparsa di muffe non devono essere processati, perché i risultati potrebbero non essere attendibili*).

Prelevare con un bisturi la nervatura principale dalle foglie costituenti il campione (incluso, eventualmente, anche una parte di picciolo) fino al raggiungimento del quantitativo richiesto per l'estrazione dell'acido nucleico.

Può essere opportuno mantenere una aliquota di nervature fogliari a -20°C (previa polverizzazione in azoto liquido) o a temperatura ambiente (previa liofilizzazione), per poter ripetere l'analisi in caso di contenzioso.

## **SAGGI MOLECOLARI**

- 1. Protocollo PCR *nested***
- 2. Protocollo TaqMan real time PCR**



# Strumentazione, materiali e reagenti necessari

## Protocollo PCR nested

### a) 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 alla PCR 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

### b) Reagenti

1. Acqua nucleasi free
2. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, TAE, bromuro d'etidio
3. Controllo negativo, sicuramente esente da 'Ca. P. prunorum' ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da 'Ca. P. prunorum'.
5. Etanolo
6. Kit commerciale per estrazione DNA
7. Loading buffer per elettroforesi
8. Marker di DNA (1 Kb)
9. Primers universali
10. Primers 16SrX-specifici
11. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di MgCl<sub>2</sub>
12. Azoto liquido
13. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
14. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
15. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
16. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
17. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)

### c) 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

## Protocollo TaqMan rt PCR

### a) Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V.
7. Congelatore
8. Distillatore
9. Frigorifero
10. Micropipette dedicate all'estrazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
11. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. Omogeneizzatore tipo Homex
13. pHmetro
14. Termociclatore per real time PCR
15. Vortex

### b) Reagenti

1. Acqua sterile nucleasi-free
2. Azoto liquido
3. Controllo negativo, sicuramente esente da 'Ca. P. prunorum' ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da 'Ca. P. prunorum' ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
6. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
7. Etanolo
8. Kit commerciale per estrazione DNA
9. Master Mix per real time PCR
10. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
11. Primers 16SrX-specifici
12. Sonda 16SrX-B-specifica
13. Primers e sonda specifici per 18S (*controllo endogeno*)
14. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
15. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)

### c) Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore tipo Homex
2. Carta da laboratorio
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

## Estrazione del DNA totale (TDNA)

Il protocollo di estrazione del DNA totale dalle matrici vegetali è comune a tutti i protocolli descritti.

L'estrazione del DNA viene effettuata mediante utilizzazione di kit commerciale.

I kit commerciali prevedono generalmente l'uso di azoto liquido per la macerazione iniziale del tessuto vegetale. Nel caso non si disponga di azoto liquido in laboratorio, si può procedere con un protocollo alternativo, di seguito riportato.

### a) Estrazione mediante utilizzo di azoto liquido

Polverizzare accuratamente il tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) in azoto liquido (*nota: è consigliabile polverizzare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e, successivamente prelevare da questa la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del patogeno anche in caso di una sua distribuzione erratica nei tessuti delle piante infette*).

Prelevare 0.1 g di tessuto polverizzato e procedere con l'estrazione seguendo scrupolosamente le istruzioni del kit fornite dalla Ditta produttrice.

### b) Estrazione senza utilizzo di azoto liquido

Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido si può procedere come segue:

- pesare 0.5 g di tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) e collocarli in una bustina 'Bioreba';
- aggiungere nella bustina 3 ml di tampone di estrazione (2,5% CTAB, 100 mM Tris pH8, 1,4 M NaCl, 50 mM EDTA pH8, 1% PVP-40; 0,5% acido ascorbico aggiunto poco prima dell'uso *nota: preparare i tamponi utilizzando H<sub>2</sub>O e reagenti sterili*);
- macerare accuratamente il campione;
- prelevare dalla bustina 400 µl di lisato e trasferirlo in una provetta da 2 ml;
- aggiungere 4 µl di RNase A (100 mg/ml) e porre ad incubare a 65°C per 10 minuti;
- proseguire secondo le istruzioni del kit.

## Protocollo PCR nested

### 1. Primers

Per la diagnosi di 'Ca. P. prunorum' mediante doppia amplificazione genica (PCR diretta e nested) si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

PCR diretta (primers universali)

<b>P1</b>	<b>5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'<sup>(*)</sup></b>
<b>P16S-Sr</b>	<b>5'-GGTCTGTCAAACCTGAAGATG-3'<sup>(**)</sup></b>

<sup>(\*)</sup>Deng and Hiruki, 1991. *J. Microbiol. Methods* 14, 53-61

<sup>(\*\*)</sup>Lee I.M. *et al.*, 2004. *Int. Journal of Systematic Evol. Microbiol.* 54, 337-347.

PCR nested (primers specifici per il gruppo 16SrX)

<b>fO1</b>	<b>5'-CGGAACTTTTAGTTTCAGT-3'<sup>(*)</sup></b>
<b>rO1</b>	<b>5'-AAGTGCCCAACTAAATGAT-3'<sup>(*)</sup></b>

<sup>(\*)</sup>Lorenz *et al.*, 1995. *The American Phytopathological Society*, Vol.85, No 7, 771-776

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 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 d'uso di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

### 2. Preparazione del saggio

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 (Allegato 1), in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: controllo positivo, controllo negativo e controllo in bianco (acqua).

Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da piante sicuramente infette da 'Ca. P. prunorum' e da piante sicuramente esenti da 'Ca. P. prunorum', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

### 3. Esecuzione del saggio

#### 3.1 PCR diretta

**Nota:** Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, sterilizzare i materiali di lavoro sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

1. Indossare guanti puliti.
2. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
3. Scongela i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

<b>Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• 1X Taq DNA polimerasi buffer (inclusente anche 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)</li><li>• 200 µM ciascun dNTP</li><li>• 0,4 µM ciascun primer (P1/16S-Sr)</li><li>• 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi</li><li>• 1 µl DNA totale estratto (TDNA)</li></ul> <p>Volume totale: 25 µl con acqua sterile</p>

4. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
5. Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
6. Aggiungere 1 µl dell'estratto di TDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
7. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
8. Inserire le provette nel termociclatore.
9. Avviare la PCR dopo aver selezionato il seguente programma:

### Ciclo

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	1'	36
	55 °C	1'	
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1
Conservare le provette a 4°C in frigorifero.			

### 3.2 PCR nested

**Nota:** Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, sterilizzare i materiali di lavoro sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

1. Indossare guanti puliti.
2. Siglare un numero di provette pari a quelle usate in PCR diretta e dispensare in ciascuna una quantità d'acqua sterile sufficiente per realizzare una diluizione 1:30 del prodotto di PCR diretta (es. 58 µl di H<sub>2</sub>O per 2 µl di amplificato).
3. Prelevare il volume stabilito dell'amplificato ottenuto in PCR diretta da ciascun campione (incluso il controllo in bianco) e caricarlo nella corrispondente provetta contenente acqua sterile. Cambiare puntale ad ogni campione.
4. Sostituire i guanti e siglare un'altra serie di provette in numero pari a quelle usate in PCR diretta più una, per il controllo in bianco della PCR-nested.
5. Scongelare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata, mantenendoli in ghiaccio.

<b>Miscela di reazione</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)</li> <li>• 200 µM ciascun dNTP</li> <li>• 0,4 µM ciascun primer (fO1/rO1)</li> <li>• 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi</li> <li>• 1 µl DNA totale estratto (TDNA)</li> </ul> <p>Volume totale: 25 µl con acqua sterile</p>

6. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24  $\mu$ l) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
7. Distribuire 24  $\mu$ l di miscela di reazione in ciascuna provetta, mantenendole in ghiaccio.
8. Prelevare 1  $\mu$ l della diluizione 1:30 ottenuta per ciascun campione e caricarlo nella corrispondente provetta contenente la miscela di reazione, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
9. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
10. Inserire le provette nel termociclatore.
11. Avviare la PCR dopo aver selezionato il seguente programma:

### Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	1'	38
	50 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	2'	1
	72 °C	8'	
Step di blocco	4 °C	10'	1
Conservare le provette a 4°C in frigorifero.			

## Visualizzazione dei risultati

Per entrambi i protocolli di PCR descritti, la visualizzazione dei risultati viene effettuata mediante corsa elettroforetica, su gel di agarosio, degli amplificati ottenuti e successiva visualizzazione alla luce UV, dopo colorazione del gel in etidio bromuro.

*Nota: nel caso del saggio di PCR diretta e nested, si può effettuare la corsa elettroforetica dei soli amplificati ottenuti in PCR nested.*

Per l'esecuzione della corsa elettroforetica procedere come segue:

1. preparare il gel di agarosio (1,2% di agarosio in TBE1X);
2. centrifugare brevemente le provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol;
3. prelevare 10 µl di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 2 µl di loading buffer 6X. Caricare ciascun campione in un pozzetto, cambiando il puntale ad ogni campione;
4. caricare in un pozzetto un idoneo marker (dimensione 1Kb);
5. correre per circa 40 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante;
6. estrarre il gel dalla cella elettroforetica e trasferirlo per 15-20 minuti in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro;
7. lavare il gel per circa 5 minuti in H<sub>2</sub>O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

Per entrambi i protocolli di PCR descritti, se il saggio è positivo si osserverà una banda di 1050 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

*Nota: qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto. Nel caso del protocollo di PCR diretta e nested, eventualmente, si può effettuare la corsa elettroforetica degli amplificati ottenuti in PCR diretta e se i controlli in bianco e il controllo sano risultano 'puliti' si può ripetere la sola PCR nested, partendo da nuove diluizioni.*



## Tamponi necessari all'effettuazione 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<sub>2</sub>O distillata

Autoclavare

### Loading buffer 6X in TBE

Blu di bromofenolo	0,3%
Xilencianolo	0,3%
Glicerolo	30%

### Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml

Etidio bromuro	50	µg
acqua	100	ml

Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua

## Punti critici dei protocolli di PCR

- Il punto debole è legato alla alta sensibilità della tecnica PCR che, se da un lato consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi dall'altro, può dare falsi positivi o provocare contaminazioni in laboratorio (a livello di estratti, reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, etc.), se non utilizzata correttamente. Nel caso del saggio di PCR nested, inoltre, il rischio di contaminazioni è notevolmente aumentato dall'esecuzione di una doppia amplificazione genica che implica la manipolazione di ampliconi in fase di preparazione della PCR nested. Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione (in particolare in fase di esecuzione delle diluizioni) 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 sostituirli con aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
  - usare solo acqua sterile 'nucleasi-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 TDNA);
  - in fase di preparazione del saggio di PCR nested, sostituire i guanti dopo aver manipolato gli amplificati di PCR diretta per l'esecuzione delle diluizioni;
  - 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 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.

## Protocollo TaqMan rt PCR

### 1- Primer e sonda

Per la diagnosi di ESFY mediante rt PCR si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers e sonde TaqMan:

Primers e sonda ESFY

<b>qAP-16S-F</b>	<b>5'-CGAACGGGTGAGTAACACGTAA-3'<sup>(*)</sup></b>
<b>qAP-16S-R</b>	<b>5'-CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA-3'<sup>(*)</sup></b>
<b>Sonda qESFY16S</b>	<b>5' - FAM-TAACCTGCCTCTCAGGCG- MGB- 3'<sup>(**)</sup></b>

<sup>(\*)</sup>Baric *et al.*, 2004. *Journal of Microbiological Methods*, 57: 135-145.

<sup>(\*\*)</sup>Pignatta *et al.*, 2008. *Acta Horticulturae*, 781: 499-503

Primers e sonda 18S (*controllo endogeno*)

<b>18S DISTA -F</b>	<b>5' – TGACGGAGAATTAGGGTTCTGA – 3'<sup>(*)</sup></b>
<b>18S DISTA -R</b>	<b>5' – CTTGGATGTGGTAGCCGTTTC – 3'<sup>(*)</sup></b>
<b>Sonda 18S</b>	<b>5' - NED-CGG AGA GGG AGC CTG-MGB 3'<sup>(*)</sup></b>

<sup>(\*)</sup> Minguzzi *et al.*, 2010. *Petria*, 20: 219-220; Osman *et al.*, 2007. *Journal of Virological Methods*, 141: 22-29

I primers e la sonda possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano. I primers vengono consegnati liofilizzati mentre le sonde MGB sono, generalmente, fornite come soluzioni alla concentrazione di 100 µM.

Diluire i primers alla concentrazione d'uso di 100 µM in dH<sub>2</sub>O sterile e suddividerli in aliquote da mantenere a -20°C.

Conservare la soluzione madre della sonda (100 µM) a -20°C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 4 µM in dH<sub>2</sub>O sterile da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione e conservarle a -20°C.

Nota: la soluzione madre e le aliquote della sonda DEVONO essere mantenute rigorosamente al buio.

### 2. Preparazione del saggio rt PCR

Sigliare i campioni e preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare. Ciascun campione deve essere replicato 2 volte nell'esperimento. Preparare un opportuno schema cartaceo (Allegato 2), in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire i seguenti controlli:

- 1 controllo in bianco ogni 30 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 2 µl di acqua sterile al posto del TDNA;
- 1 controllo negativo (campione sicuramente sano) ogni 30 campioni costituito da un estratto di DNA ottenuto da un campione sicuramente esente da 'Ca. P. prunorum' appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri;

- 1 controllo positivo (campione sicuramente infetto) costituito da un estratto di DNA ottenuto da un campione sicuramente infetto da 'Ca. P. prunorum', appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri.

### 3. Esecuzione del saggio

**Nota:** Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare **SEMPRE** indossando guanti monouso e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, sterilizzare i materiali di lavoro sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

1. Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (**nota:** lo stesso camice **NON** deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni).
2. Indossare guanti puliti.
3. Sterilizzare sotto UV pipette, puntali con filtro, provette e portaprovette.
4. Preparare la miscela di reazione in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
5. Disporre le piastre ottiche sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.  
**Nota:** se si utilizzano provette ottiche in luogo delle piastre **NON** siglarle per nessun motivo (il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del 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.

<b>Miscela di reazione</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1X KAPA™ PROBE FAST Universal qPCR Master Mix<sup>(*)</sup> (Kapa Biosystems)</li> <li>- 900 nM primer qAP-16S-F (10 μM)</li> <li>- 900 nM primer qAP-16S-R (10 μM)</li> <li>- 150 nM primer 18S-F (10 μM)</li> <li>- 150 nM primer 18S-R (10 μM)</li> <li>- 100 nM sonda qESFY16S (4μM)</li> <li>- 75 nM sonda 18S (4μM)</li> <li>- 2 μl estratto DNA totale (TDNA)</li> </ul> <p>Volume totale: 25 μl con acqua sterile</p>

<sup>(\*)</sup> Se si utilizza un termociclatore ABI Prism (Applied Biosystems) aggiungere alla miscela di reazione il ROX (1X) fornito insieme alla Master Mix, riducendo il quantitativo di acqua per mantenere invariato il volume di reazione.

8. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 23  $\mu$ l) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, master mix, primers, sonda; mescolare e mantenere in ghiaccio.
9. Distribuire 23  $\mu$ l di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
10. Cambiare area di lavoro e caricare 2  $\mu$ l di estratto di TDNA con una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo.

**Nota:** distribuire i controlli negativi all'interno della piastra alternando circa un controllo negativo (campioni sani e controlli in bianco alternati) ogni 10 campioni.

11. Inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver selezionato il seguente programma:

### Ciclo

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

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

### Valutazione dei risultati

Considerare positivi tutti i campioni a cui il software del termociclatore attribuisce un valore di Ct, con il limite soglia (threshold) stabilito AUTOMATICAMENTE dalla macchina.

## Punti critici del Protocollo rtPCR

- 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 contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micropipette contaminate, 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 nucleasi-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 TDNA);
  - 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.

**ALLEGATO 1**

**Schema per saggio PCR nested**

## Protocollo PCR nested

**Tipo estrazione TDNA**

Data:

N° riferimento:

Operatore:

N° campioni:

Primers:

Dimensione prodotto:

Tipo di enzima	Marca	Unità/reazione
Taq DNA polimerasi		

**Miscela di reazione PCR diretta:**

Prodotto (conc. finale)	Quantità per campione	Quantità totale
Taq polimerasi buffer (1X)		
dNTPs (200 µM ciascuno)		
Primer P1 (0,4 µM)		
Primer 16S-Sr (0,4 µM)		
Taq DNA polimerasi (0,625 U)		
acqua		
<b>Totale</b>	<b>24 µl</b>	
<b>estratto TDNA</b>	<b>1 µl</b>	<b>-</b>

**Ciclo PCR diretta:**

Step	Temperatura in °C	Tempo	N° cicli
<b>Denaturazione</b>			
<b>Amplificazione:</b>			
<b>Denaturazione</b>			
<b>Annealing</b>			
<b>Estensione</b>			
<b>Estensione finale</b>			

Firma operatore

\_\_\_\_\_

Firma responsabile

\_\_\_\_\_



**PCR  
nested**

Data:

N° riferimento:

Operatore:

N° campioni:

Primers:

Dimensione prodotto:

**Diluizione (1:30) PCR diretta:**

Acqua (µl)	Amplificato (µl)

**Miscela di reazione PCR nested:**

Prodotto (conc. finale)	Quantità per campione	Quantità totale
Taq polimerasi buffer (1X)		
dNTPs (200 µM ciascuno)		
Primer fO1 (0,4 µM)		
Primer rO1 (0,4 µM)		
Taq DNA polimerasi (0,625 U)		
acqua		
<b>Totale</b>	<b>24 µl</b>	
<b>estratto TDNA</b>	<b>1 µl</b>	<b>-</b>

**Ciclo PCR nested:**

Step	Temperatura in °C	Tempo	N° cicli
<b>Denaturazione</b>			
<b>Amplificazione:</b>			
<b>Denaturazione</b>			
<b>Annealing</b>			
<b>Estensione</b>			
<b>Estensione finale</b>			

Firma operatore

Firma responsabile

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Elenco campioni:**

1-
2-
3-
4-
5-
6-
7-
8-
9-
10-
11-
12-
13-
14-
15-
16-
17-
18-
19-
20-
21-
22-
23-
24-
25-
26-
27-
28-
29-
30-
31-
32-
33-
34-
35-
36-
37-
38-
39-
40-
41-
42-
43-
44-
45-
46-
47-
48-

**Gel**

Firma operatore

---

Firma responsabile

---

**ALLEGATO 2**

**Schema Protocollo TaqMan rt PCR**

## Protocollo TaqMan rt PCR

<b>Data</b>	<b>N° riferimento</b>
<b>Operatore</b>	<b>N° campioni</b>

**Tipo estrazione TDNA:**

**Marca della chimica utilizzata:**

**Miscela di reazione:**

Prodotto (conc. finale)	Quantità per campione	Quantità totale
Master mix (1X)		
primer qAP-16S-F (900 nM)		
primer qAP-16S-R (900 nM)		
primer 18S-F (150 nM)		
primer 18S-R (150 nM)		
sonda qESFY16S (100 nM)		
sonda 18S (75 nM)		
acqua		
<b>Totale</b>	<b>23 µl</b>	
<b>estratto TDNA</b>	<b>2 µl</b>	<b>-</b>

**Ciclo:**

Step	Temperatura in °C	Tempo	N° cicli
Denaturazione	95	10'	1
Denaturazione	95	15''	40
Annealing	60	1'	

Firma operatore

\_\_\_\_\_

Firma responsabile

\_\_\_\_\_

**Elenco campioni:**

1-
2-
3-
4-
5-
6-
7-
8-
9-
10-
11-
12-
13-
14-
15-
16-
17-
18-
19-
20-
21-
22-
23-
24-
25-
26-
27-
28-
29-
30-
31-
32-
33-
34-
35-
36-
37-
38-
39-
40-

### Schema caricamento campioni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Ready Disconnected NUM

Firma operatore

\_\_\_\_\_

Firma responsabile

\_\_\_\_\_

# INDICE

<b>Descrizione della malattia</b>	<b>pag. 3</b>
<b>Metodologie diagnostiche</b>	<b>pag. 5</b>
Premessa	pag. 6
Prove di validazione	pag. 7
<b>Applicazione delle diverse metodologie</b>	<b>pag. 11</b>
<b>Campionamento</b>	<b>pag. 13</b>
Periodi e modalità di campionamento	pag. 14
<b>Saggi molecolari</b>	<b>pag. 16</b>
Strumentazione, materiali e reagenti necessari	pag. 17
Protocollo PCR nested	pag. 17
Protocollo Sybr Green rtPCR	pag. 18
Estrazione del DNA totale (TDNA)	pag. 19
Protocollo PCR nested	pag. 20
Primers	pag. 20
Preparazione del saggio	pag. 20
Esecuzione del saggio	pag. 21
Visualizzazione dei risultati	pag. 24
Punti critici dei protocolli di PCR	pag. 26
Protocollo TaqMan rt PCR	pag. 27
Primers e sonda	pag. 27
Preparazione del saggio	pag. 27
Esecuzione saggio real time	pag. 28
Valutazione dei risultati	pag. 29
Punti critici del saggio	pag. 30
<b>Allegato 1 - Schema per saggio PCR nested</b>	<b>pag. 31</b>
<b>Allegato 2 – Schema per saggio real time TaqMan PCR</b>	<b>pag. 36</b>