

**Protocollo diagnostico
per
'*Candidatus Phytoplasma
mali*'**

Descrizione della malattia

Agente causale	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'
Tassonomia	Classe: Mollicutes Gruppo ribosomico: 16SrX (AP - Apple proliferation group) Sottogruppo: 16SrX-A
Ceppi individuati	AT-1, AT-2, AP-15
Avversità	Scopazzi del melo
Acronimo	AP (<i>Apple proliferation</i>)

Ospiti: melo

Vettori: *Cacopsylla melanoneura* Förster, *C. picta* Förster (syn. *C. costalis*)

Caratteristiche genomiche

Nel 2008 è stata ottenuta una sequenza completa del genoma di '*Ca. P. mali*' (Kube et al., 2008) che ha evidenziato la presenza di un cromosoma lineare di 602 Kb caratterizzato da un basso contenuto di GC (21,4%) e da un ridotto numero di sequenze codificanti per proteine (496).

Sintomatologia

Come per tutte le fitoplasmosi i sintomi indotti da '*Ca. P. mali*' sono conseguenti allo squilibrio fisiologico-ormonale indotto dalla presenza del fitoplasma nei tessuti floematici della pianta. I sintomi osservabili in campo sono diversi e possono essere o meno contemporaneamente presenti sulla pianta. Il sintomo più caratteristico, in grado di indicare con certezza la presenza della malattia anche se presente da solo, è rappresentato dalle 'scope'. Queste risultano particolarmente evidenti in inverno, associate alla presenza di legno arrossato, non maturo, di consistenza elastica e a rami con internodi raccorciati e dall'andamento anomalo. Per tutti gli altri sintomi osservabili, invece, l'associazione certa con la malattia è subordinata alla contemporanea presenza di almeno due sintomi, come di seguito specificato:

- arrossamento e mele piccole;
- arrossamento e stipole ingrandite;
- stipole e mele piccole;

- clorosi e scope;
- ritorni a fiore tardivi e scope

I sintomi possono interessare solo alcune parti della pianta e compaiono sia alla ripresa vegetativa - fioritura (ripresa anticipata, vegetazione lussureggiante, mazzetti fiorali con stipole ingrandite e, soprattutto in presenza di ritorni di freddo, foglioline arrossate) sia a fine stagione (presenza di scope, foglie di consistenza cartacea e con stipole ingrandite, arrossamenti fogliari, clorosi, filloptosi precoce, ritorni a fiore, mele piccole).

Da sottolineare che non tutte le piante infette manifestano sintomi e che, talvolta, su piante sintomatiche si può assistere ad una regressione temporanea dei sintomi per alcuni anni o alla loro definitiva scomparsa, sebbene la pianta continui a rimanere infetta per tutto il suo ciclo di vita.

Epidemiologia e trasmissione

La diffusione in natura di AP avviene ad opera di insetti vettori che trasmettono il fitoplasma con una modalità di tipo persistente-propagativo. In Italia i vettori accertati di 'Ca. P. mali' sono le psille *Cacopsylla picta* Förster e *C. melanoneura* Förster (Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi e Alma, 2004). Entrambe le specie compiono una sola generazione all'anno, svernando come adulti su piante rifugio, abitualmente rappresentate da conifere. Da questi ricoveri invernali gli adulti re-immigranti si spostano sulle piante di melo a partire da fine gennaio (*C. melanoneura*) e marzo/aprile (*C. picta*). Qui si compie l'ovideposizione e lo sviluppo della nuova generazione che si alimenta sull'ospite arboreo fino al raggiungimento dello stadio adulto, per poi tornare nei siti di svernamento.

Oltre a queste psille, diverse specie di afidi sono stati ritrovati infetti da 'Ca. P. mali' tuttavia, in nessun caso, è stata riscontrata una capacità di trasmissione del fitoplasma a piante sane di melo ad opera di questi insetti (Cainelli *et al.*, 2007).

In natura la trasmissione di 'Ca. P. mali' può avvenire anche attraverso ponti radicali formati spontaneamente fra piante contigue (Vindimian *et al.*, 2002; Ciccotti *et al.*, 2008), con una percentuale di trasmissibilità, nelle condizioni di campo, che può risultare anche molto elevata.

Infine, un ruolo importante nella diffusione di AP è rivestito dal materiale vivaistico, come dimostrato dal rinvenimento di piante infette da 'Ca. P. mali' già prima dell'impianto. In tal senso, occorre sottolineare che la trasmissione del fitoplasma può essere realizzata anche attraverso le comuni tecniche di moltiplicazione vegetativa, quali l'innesto, a partire da materiale di propagazione infetto.

Diagnosi

Sebbene per questo fitoplasma siano stati prodotti anticorpi monoclonali per l'esecuzione del test sierologico ELISA, la diagnosi di 'Ca. P. mali' si basa essenzialmente su metodi molecolari in grado di rilevare ed amplificare il DNA del fitoplasma, dopo estrazione dello stesso dalla matrice vegetale.

Normativa fitosanitaria

Trattandosi di un patogeno da quarantena, inserito nella lista A2 dell'OEPP, 'Ca. P. mali' è soggetto a lotta obbligatoria definita, a livello normativo, dal D.M. 23 febbraio 2006 (*GU n.*

61 del 14-3-2006): "Misure per la lotta obbligatoria contro il fitoplasma Apple Proliferation Phytoplasma". Tale decreto scaturisce in considerazione di una serie di provvedimenti fitosanitari nazionali già vigenti e, in particolare:

legge 18 giugno 1931, n. 987, recante disposizioni per la difesa delle piante coltivate e dei prodotti agrari dalle cause nemiche e sui relativi servizi;

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 Pomoidee".



**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. mali' agente degli scopazzi del melo (Apple proliferation - AP) 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 Marzachi, 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. mali' può essere effettuata su base molecolare, mediante:

Metodo diagnostico	Componente fitoplasmale riconosciuta
PCR	acido nucleico del fitoplasma (DNA)
PCR nested	acido nucleico del fitoplasma (DNA)
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. mali' che coprono la diversità genetica e la distribuzione geografica 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 su campioni raccolti a fine stagione vegetativa, a partire da nervature fogliari prelevate da piante sintomatiche.

Validazione delle metodologie diagnostiche

Per la validazione dei metodi diagnostici sono stati utilizzati 30 campioni di riferimento di cui:

- **20 campioni 'target'** infetti da 'Ca. P. mali' e provenienti da diversi areali geografici italiani;
- **5 campioni 'non target'** rappresentati da DNA di batteri fitopatogeni comunemente associati a pomacee e campioni infetti da fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi dal 16SrX-A, come di seguito specificato:
 - 1 estratto di DNA di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolato da pero;
 - 1 estratto di DNA di *Erwinia amylovora* isolato da melo;
 - 2 campioni infetti da 'Ca. P. prunorum' (sottogruppo ribosomico 16SrX-B);
 - 1 campione infetto da 'Ca. P. pyri' (sottogruppo ribosomico 16SrX-C);
- **5 campioni 'non target'** rappresentati da piante di melo esenti da infezione di 'Ca. P. mali'.

Protocollo PCR

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 sottogruppo- specifici: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Termociclatore: MJ PTC200, Applied Biosystems 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

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

Parametri	Valori
Sensibilità	81%
Specificità	100%
Accuratezza	90,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	89,1%

⁽¹⁾ 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 10⁻⁶

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

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori

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: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Termociclatore: MJ PTC200, Applied Biosystems 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

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

Parametri	Valori
Sensibilità	83%
Specificità	100%
Accuratezza	91,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	63,6%

⁽¹⁾ 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 10⁻⁶

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

⁽³⁾: La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori

Protocollo Sybr Green rt 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);

SybrGreen: KAPA SYBR® FAST Master Mix (2X) ABI Prism™, Kapa Biosystems (cod. KK4604); iQ™ SYBR Green I Supermix, Bio-Rad (cod. 170-8880)

Piastre: Fast Optical 96-W Barcoded Plate (cod N8010560), Applied Biosystems; iQ 96-Well PCR Plates (cod. 223-9441), Bio-Rad

Pellicola per piastre rt PCR: Optical Adhesive Covers (cod. 4311971), Applied Biosystems; Optical Sealing Tapes (cod. 223-9444), Bio-Rad

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

Termociclatore: ABI Prism 7500 Fast Real-Time System, Applied Biosystems; Bio-Rad iCycler (Bio-Rad)

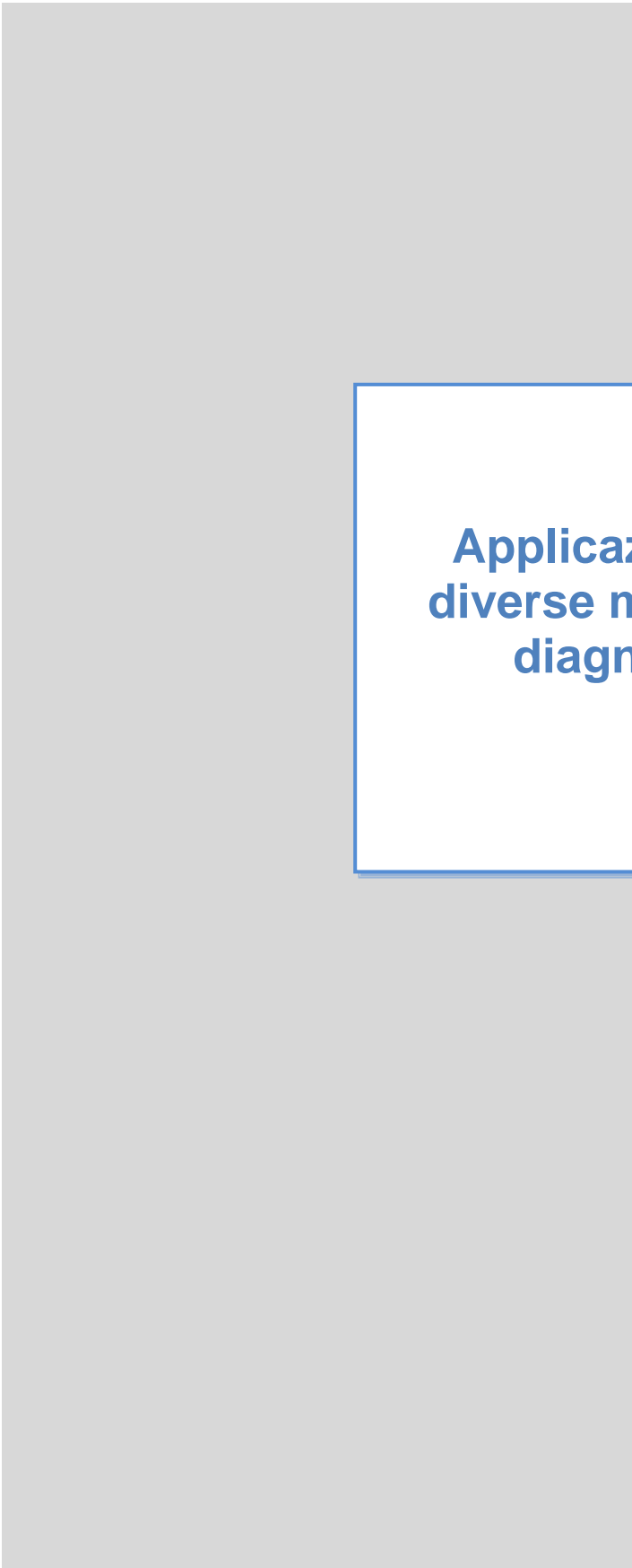
Primers: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Parametri	Campionamento fine stagione vegetativa (nervature fogliari)
Sensibilità	83%
Specificità	100%
Accuratezza	91,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁵
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	90,9%

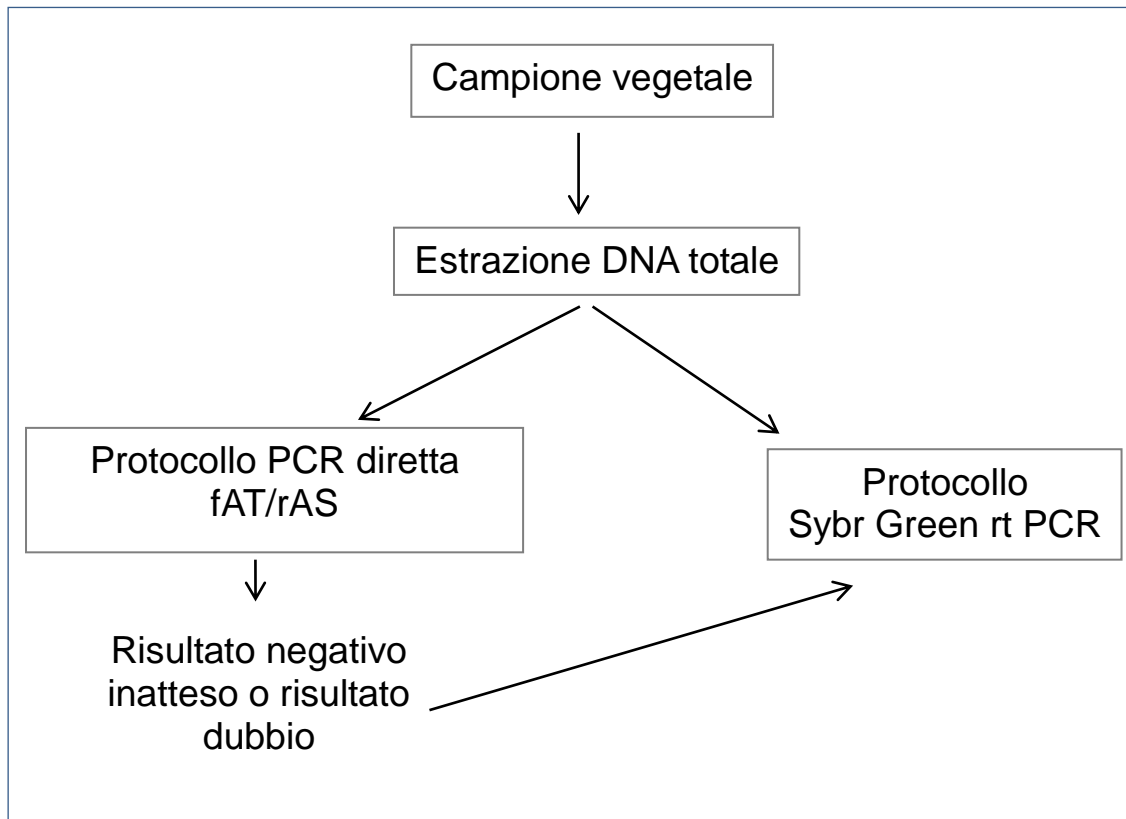
⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶

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

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori



**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 con i primers fAT/rAS oppure utilizzando il protocollo di real time PCR.
- Nel caso in cui con il protocollo di PCR diretta si ottengano risultati dubbi (campione sintomatico negativo o banda non perfettamente identificabile) ripetere l'analisi con la real time PCR (rt PCR).
- Nel caso in cui non si dispone di un termociclatore per real time si può sostituire la rt PCR con una PCR nested.



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 stagione vegetativa

1.1 Campo

Periodo. Seconda metà di ottobre-inizio novembre.

Matrice. La matrice migliore è costituita da nervature fogliari.

Tipologia del campione. Raccogliere 20-30 foglie dalle varie porzioni sintomatiche della chioma. Le foglie devono essere integre, 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. 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.

1.2 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 (includendo, 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

- **Protocollo PCR**
- **Protocollo PCR nested**
- **Protocollo Sybr Green real time PCR**

Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Protocollo PCR e 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. Azoto liquido
4. Controllo negativo, sicuramente esente da 'Ca. P. mali' ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Controllo positivo, sicuramente infetto da 'Ca. P. mali'
6. Etanolo
7. Kit commerciale per estrazione DNA
8. Loading buffer per elettroforesi
9. Marker di DNA (1 Kb)
10. Primers universali
11. Primers 16SrX -specifici
12. Primers 16SrX-A/C -specifici
13. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
14. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
15. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
16. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
17. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
18. 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 Sybr Green 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 mali' ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da 'Ca. P mali'
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. Sybr Green Master mix
10. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
11. Primers 16SrX-A -specifici
12. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
13. 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 metterlo in una provetta da 2 ml quindi 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 H₂O 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

1. Primers

Per la diagnosi di 'Ca. P. mali' in PCR si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

fAT	5'- CATCATTTAGTTGGGCACTT- 3' (*)
rAS	5'- GGCCCCGGACCATTATTTATT- 3'(*)

(*)Smart *et al.*, 1996. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 8, 2988-2993

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 50 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 d'uso di 5 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: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua).

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

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 e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto 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. Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali)
<ul style="list-style-type: none"> • 1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl₂) • 200 μM ciascun dNTP • 0,25 μM ciascun primer (fAT/rAS) • 1,25 U enzima Taq DNA polimerasi • 1 μl TDNA <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 impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	95 °C	5'	1
	94 °C	30''	
Amplificazione	56 °C	75''	35
	72 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	7'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1
Conservare le provette a 4°C in frigorifero.			

Protocollo PCR nested

1. Primers

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

PCR diretta (primers universali)

P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'^(*)
P16S-Sr	5'- GGTCTGTCAAACCTGAAGATG-3'^(**)

^(*)Deng and Hiruki, 1991. *J. Microbiol. Methods* 14, 53-61

^(**)Lee I.M. *et al.*, 2004. *Int. Journal of Systematic Evol. Microbiol.* 54, 337-347.

PCR nested (primers specifici per il gruppo ribosomico 16SrX)

fO1	5'-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3'^(*)
rO1	5'-AAGTGCCCAACTAAATGAT-3'^(*)

^(*)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 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 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: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua).

Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da 'Ca. P. mali' e da una pianta sicuramente esente da 'Ca. P. mali', 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 e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto 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. Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali)
<ul style="list-style-type: none">• 1X Taq DNA polimerasi buffer (inclusente anche 1,5 mM MgCl₂)• 200 μM ciascun dNTP• 0,4 μM ciascun primer (P1/16S-Sr)• 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi• 1 μl DNA totale estratto (TDNA) <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 impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
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 e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto 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 H₂O 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.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali)

- 1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl₂)
- 200 µM ciascun dNTP
- 0,4 µM ciascun primer (fO1/rO1)
- 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi
- 1 µl DNA totale estratto (TDNA)

Volume totale: 25 µl con acqua sterile

6. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 μ l) in funzione del numero totale di campioni da saggiare (quelli della PCR diretta + un controllo acqua specifico per la PCR nested) e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
7. Distribuire 24 μ l di miscela di reazione in ciascuna provetta, mantenendole in ghiaccio.
8. Prelevare 1 μ 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 impostato 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'	
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
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 formata sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol;
3. prelevare 5-10 µl di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 1 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 H₂O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

Valutazione dei risultati

Per il protocollo di PCR, se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 500 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

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

Nota: per entrambi i protocolli, 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 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 ₂ O distillata	
Autoclavare	

Loading buffer 6X in TBE

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

Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml

Etidio bromuro	50 µg
acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua	

Punti critici del saggio

- Per entrambi i saggi descritti, 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 diretta e 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 Sybr Green rt PCR

1. Primer

Per la diagnosi di 'Ca. P. mali' mediante Sybr Green rt PCR si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

Primers specifici sottogruppo ribosomico 16SrX-A

fAP₂	5'- AAGAGCAATTCGTA CTTTCG -3'^(*)
rAP₂	5'- GCCGAAGTAGTTTCTAATTGAC-3'^(*)

^(*)Galetto *et al.*, 2005. *Annals of Applied Biology*, 147: 191-201

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 30 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 d'uso di 3 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 in un opportuno schema cartaceo (Allegato 2), in cui vengono anche riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo e più controlli negativi (campioni sani e controlli in bianco).

Nota: distribuire i controlli negativi all'interno della piastra alternando un controllo ogni 10 campioni.

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

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 e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto 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. Preparare la miscela di reazione in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).

4. 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).

5. Scongelare i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione sotto specificata.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali)	
• 1X	Sybr Green Master Mix
• 300 nM	primer fAP ₂ (3 μM)
• 300 nM	primer rAP ₂ (3 μM)
Volume totale: 25 μl con acqua sterile	

6. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 23 μl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, Master Mix, primers; mescolare e mantenere in ghiaccio.
7. Distribuire 23 μl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto,
8. Cambiare area di lavoro e caricare 2 μl di estratto di TDNA con una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo.
9. Inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

Ciclo

Temperatura	Tempo	N° di cicli
95 °C	5'	1
95 °C	15"	45
57 °C	1'	
<i>Curva di Melting</i>		
95 °C	1'	1
65 °C	1'	1
0.5°C/ciclo fino a 95°C		

11. Controllare i risultati mediante visualizzazione delle curve di Melting.

Valutazione dei risultati

Considerare positivi tutti i campioni con temperatura di Melting (TM) e picco di Melting (PM) coincidenti con quelli del controllo positivo.

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.
- Nella real time effettuata con chimica Sybr Green può succedere di ottenere curve di amplificazione con valori di Ct riferibili ad un campione positivo anche con i controlli negativi. Ciò è dovuto al Sybr Green che, essendo un intercalante aspecifico del DNA, può legarsi anche a primers dimerizzati. L'unico metodo di valutazione della positività di ciascun campione è la verifica della corrispondenza della temperatura e del picco di Melting con il controllo positivo, indipendentemente dai valori di Ct osservati.

ALLEGATO 1

Schema per saggio PCR

Protocollo PCR

Data:	N° riferimento:
Operatore:	N° campioni:
Primers:	Dimensione prodotto:

Tipo estrazione TDNA

Tipo di enzima	Marca	Unità/reazione
Taq DNA polimerasi		

Miscela di reazione: Prodotto (conc. finale)	Quantità per campione	Quantità totale
Taq polimerasi buffer (1X)		
dNTPs (200 µM ciascuno)		
Primer fAT (0,25 µM)		
Primer rAS (0,25 µM)		
Taq DNA polimerasi (1,25 U)		
acqua		
Totale	24 µl	
estratto TDNA	1 µl	-

Ciclo: Step	Temperatura in °C	Tempo	N° cicli
Denaturazione			
Amplificazione:			
Denaturazione			
Annealing			
Estensione			
Estensione finale			

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 per saggio rt PCR

Protocollo Sybr Green rt PCR

Data

N° riferimento

Operatore

N° campioni

Tipo estrazione TDNA:

Marca della chimica utilizzata:

Miscela di reazione:

Prodotto (conc. finale)	Quantità per campione	Quantità totale
Sybr Green Master mix (1X)		
primer fAP ₂ (300 nM)		
primer rAP ₂ (300 nM)		
acqua		
Totale	23 µl	
estratto TDNA	2 µl	-

Ciclo:

Temperatura in °C	Tempo	N° cicli
95	5'	1
95	15''	45
57	1'	
<i>Curva di Melting</i>		
95 °C	1'	1
65 °C	1'	1
0.5°C/ciclo fino a 95°C		

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

Descrizione della malattia	pag. 3
Metodologie diagnostiche	pag. 6
Premessa	pag. 7
Prove di validazione	pag. 8
Applicazione delle diverse metodologie	pag. 12
Campionamento	pag. 14
Periodi e modalità di campionamento	pag. 15
Saggi molecolari	pag. 15
Strumentazione, materiali e reagenti necessari	pag. 17
Estrazione del DNA totale (TDNA)	pag. 19
Protocollo PCR	pag. 20
Primers	pag. 20
Preparazione del saggio	pag. 20
Esecuzione del saggio	pag. 20
Protocollo PCR nested	pag. 22
Primers	pag. 22
Preparazione del saggio	pag. 22
Esecuzione del saggio	pag. 23
Visualizzazione dei risultati	pag. 26
Punti critici dei protocolli di PCR	pag. 28
Protocollo Sybr Green rt PCR	pag. 29
Primers e sonda	pag. 29
Preparazione del saggio	pag. 29
Esecuzione saggio	pag. 29
Valutazione dei risultati	pag. 30
Punti critici del saggio	pag. 31
Allegato 1 - Schema per saggi PCR	pag. 32
Allegato 2 – Schema per saggio Sybr Green rt PCR	pag. 36