PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER I VIRUS DELLA VITE COPERTI DA NORME FITOSANITARIE: GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3, GVA, GVB, ArMV, GFLV, GFkV

F. Faggioli[1], F. Anaclerio[2], E. Angelini[3], M. G. Antonelli[1], N. Bertazzon[3], G. Bianchi[4], P. Bianchedi[5], P. A. Bianco[6], S. Botti[7], P. Bragagna[5], M. Cardoni[7], P. Casati[6], R. Credi[8], E. De Luca[2], G. Durante[9], C. Gianinazzi[9], G. Gambino[10], V. Gualandri[5], D. Luison[1], A. Luvisi[11], U. Malossini[5], F. Mannini[10], P. Saldarelli[12], F. Terlizzi[8], E. Triolo[11], N. Trisciuzzi [13], M. Barba[1]

[1]Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Rome. Italy;
[2]Vivai Cooperativi Rauscedo, Rauscedo, Italy;
[3]CRA – Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano Veneto, Italy;
[4]ERSA – Friuli Venezia Giulia; Pozzuolo del Friuli, Italy;
[5]Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario San Michele all'Adige, Italy;
[6]DISA - Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, Italy;
[7]Centro Attività Vivaistiche, Tebano, Italy;
[8]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna,
[9]Italy; IPAD Lab, Lodi, Italy;
[10]CNR – Istituto di Virologia Vegetale, UOS di Grugliasco, Italy;
[11]Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi", Università di Pisa., Italy;
[12]CNR – Istituto di Virologia Vegetale, UOS di Bari, Italy;
[13]CRSA – Basile Caramia, Locorotondo, Italy

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA 569
1.1 GLRaV 1, 2 e 3 569
1.2 GVA 571
1.3 GVB 573
1.4 ArMV 575
1.5 GFLV 576
1.6 GFkV 579

2. METODO DI CAMPIONAMENTO 580

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI 581
3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche 583
3.2 Metodo diagnostico ELISA 584
3.3 Metodo diagnostico di Multiplex RT-PCR 596

4. DATI DI VALIDAZIONE 604
4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi 604
4.2 Metodo diagnostico ELISA 606
4.3 Metodo diagnostico Multiplex RT-PCR 612

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO 613

Allegato I - strumenti, materiali e reagenti necessari 614

1. DESCRIZIONE DELLE MALATTIE E DEI RELATIVI AGENTI EZIOLOGICI

1.1 GLRaV 1, 2 e 3

Agenti causali	*Grapevine leafroll-associated virus* 1 *Grapevine leafroll-associated virus* 3	*Grapevine leafroll-associated virus* 2
Tassonomia	Famiglia: Closteroviridae Genere: Ampelovirus	Famiglia: Closteroviridae Genere: Closterovirus
Avversità	Complesso dell'accartocciamento fogliare (GLRaV 1 e GLRaV 3) e disaffinità d'innesto (GLRaV 2)	
Acronimi	GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3	

1.1.1 Ospite

E' forse la virosi della vite più diffusa al mondo. All'accartocciamento fogliare sono associati numerosi virus alcuni dei quali non chiaramente inquadrati tassonomicamente. Tra le cultivar di vite europea (*Vitis vinifera* L.) più sensibili all'accartocciamento fogliare ci sono: Pinot nero, Cabernet franc, Cabernet Sauvignon, Carmenère, Merlot, Barbera, Riesling, Cortese, Chardonnay. GLRaV 2 può essere trasmesso meccanicamente a diverse specie di *Nicotiana,* utilizzate per il mantenimento e la moltiplicazione del virus

1.1.2 Sintomatologia

I sintomi consistono nel ripiegamento verso il basso della lamina fogliare, che assume consistenza coriacea e colorazione gialla o rossa vinosa (Foto1 e 2) a seconda che colpisca varietà ad uve bianche o rosse.
I primi sintomi sono visibili in estate per poi intensificarsi col procedere della stagione fino a raggiungere la massima espressione in autunno. Sulla pianta, la progressione della sintomatologia è acropeta, iniziando a manifestarsi dalla parte basale dei tralci fino ad interessare le zone apicali.
Questa virosi causa il ritardo e la non uniformità nella maturazione dei grappoli, che risultano tra l'altro meno numerosi. Il risultato è uno scadimento qualitativo (basso tasso zuccherino, anomalo profilo aromatico e contenuto tannico) delle uve e del vino.
GLRaV 2 è associato anche ad una forma di incompatibilità di innesto che si verifica quando viti infette vengono innestate su alcuni portainnesti, quali Kober 5BB, Teleki 5C, 1103 Paulsen (Foto 3 e 4).
Asintomatiche risultano invece le piante di alcuni portainnesti americani.

Fig. 1 - accartocciamento fogliare sulla cv Primitivo infetta da GLRaV 3

Fig. 2 - accartocciamento fogliare sulla cv Primitivo indotto da GLRaV 2

Fig. 3 - moria di giovani piante di un accessione della cv Red Globe infetta da GLRaV 2 ed innestata su portinnesto suscettibile

Fig. 4 - vitalità di piante della stessa accessione di Red Globe innestata sullo stesso portinnesto dopo risanamento

1.1.3 Morfologia

I vari GLRaV sono costituiti da particelle filamentose di lunghezza variabile da 1400 a 2200 nm.

1.1.4 Epidemiologia e trasmissione

La diffusione della virosi è causata prevalentemente dall'uomo, con l'impiego di materiale di propagazione infetto. La trasmissione naturale da vite a vite avviene invece ad opera di alcune specie di Pseudococcidi (generi *Planococcus* e *Pseudococcus*) ed una di Coccidi (*Pulvinaria vitis*) nella trasmissione di GLRaV 1 e 3.

1.1.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante

Saggio biologico: metodo dell'indexaggio su cv sensibili a bacca nera di *V. vinifera* L. (Pinot nero, Cabernet franc, Carmenère, Merlot)
Saggio sierologico: ELISA
Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.1.6 Normativa Fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.2 GVA

Agente causale	*Grapevine virus* A
Tassonomia	Famiglia: Betaflexiviridae Genere: Vitivirus
Avversità	Scanalatura del Kober del complesso del legno riccio "Kober stem grooving"
Acronimo	GVA

1.2.1 Ospiti

Oltre che vite, che ne è l'ospite naturale, GVA può infettare artificialmente anche altri ospiti non naturali, quali *Nicotiana benthamiana* e *N. clevelandii*, utilizzati a scopi sperimentali per il mantenimento del virus.

1.2.2 Sintomatologia

Foto 1 - sintomi classici di legno riccio sul fusto

FUSTO

La sintomatologia di questa virosi è abbastanza complessa. I sintomi si manifestano sul fusto nel piede formato dai portainnesti ibridi americani (es. Kober 5BB); la corteccia si presenta ingrossata e rugosa. Nel legno sottostante si osservano butterature ed infossature longitudinali (Foto 1).

Foto 2: acinellatura dolce su cv Victoria affetta da legno riccio

GRAPPOLO

In alcuni casi, viti affette da legno riccio causato da GVA presentano forti acinellature dei grappoli che compromettono la resa quali/quantitativa della produzione (Foto 2).

1.2.3 Morfologia

Il virus è costituito da particelle filamentose della lunghezza di circa 800 nm, con un genoma di ~7.4 kb.

Foto di C. Pirolo, DPPMA-Bari

1.2.4 Epidemiologia e trasmissione

GVA è un virus trasmesso da alcune specie di cocciniglie appartenenti ai generi *Planococcus, Pseudococcus, Heliococcus e Neopulvinaria*.

1.2.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:

Saggio biologico: metodo dell'indexaggio su portainnesto *V. Berlandieri* x *V. riparia* Kober 5BB
Saggio sierologico: ELISA
Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.2.6 Normativa Fitosanitaria

- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 dicembre 2011 - Linee guida per l'esenzione di analisi fitosanitarie su campi di piante madri

1.3 GVB

Agente causale	*Grapevine virus* B
Tassonomia	Famiglia: Betaflexiviridae Genere: Vitivirus
Avversità	Suberosi corticale del complesso del legno riccio; "Corky bark" (CB)
Acronimo	GVB

1.3.1 Ospite

Gli ospiti naturali appartengono alle diverse specie di *Vitis*. GVB può essere trasmesso meccanicamente alla solanacea *Nicotiana occidentalis,* utilizzata per il mantenimento e la moltiplicazione del virus.

1.3.2 Sintomatologia

Foto 1: butterature del legno

Foto 2 - suberosi corticale su giovane pianta di LN33

GVB causa fessurazioni e/o suberificazioni corticali sui tralci di più anni (Foto 1) e/o sul fusto di indicatori di vite sensibili quali l'ibrido LN33 (Foto 2).
Le piante presentano un ritardo vegetativo e un deperimento più o meno evidente.

1.3.3 Morfologia

GVB è costituito da particelle filamentose della lunghezza di circa 800 nm.

1.3.4 Epidemiologia e trasmissione

GVB è trasmesso in modo semi-persistente da cocciniglie dei generi *Pseudococcus* e *Planococcus*.

1.3.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:

Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su ibrido "LN33"
Saggio sierologico: ELISA
Saggio molecolare: RT-PCR

1.3.6 Normativa fitosanitaria

- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite

1.4 ArMV

Agente causale	*Arabis Mosaic Virus*
Tassonomia	Famiglia: *Secoviridae*
	Sottofamiglia: *Comovirinae* Genere*: Nepovirus*
Avversità	Mosaico dell'arabis
	Degenerazione infettiva della vite
Acronimo	ArMV

1.4.1 Ospiti

Il virus prende il nome dalla specie *Arabis hirsuta,* da cui fu isolato per la prima volta nel 1944. ArMV ha un largo spettro di ospiti appartenenti a circa 30 famiglie botaniche. Gli ospiti principali sono fragola, luppolo, lampone, *Rheum* spp., *Sambucus nigra* e *Vitis* spp.

1.4.2 Sintomatologia

La sintomatologia più comune nei vari ospiti varia dal nanismo e deperimento delle piante alla comparsa di maculature e necrosi fogliari.
Su vite i sintomi sono quelli della degenerazione infettiva e mosaico giallo descritti per il GFLV (vedi scheda).

1.4.3 Morfologia

Le particelle virali, con un genoma bipartito, sono isometriche con un diametro di circa 30 nm. La virulenza di ArMV varia a seconda dell'ospite da cui è isolato.

1.4.4 Epidemiologia e trasmissione

Il virus è trasmesso dal nematode *Xiphinema diversicaudatum* anche se non si esclude il coinvolgimento di altri nematodi appartenenti alla famiglia *Longidoridae*. La trasmissione per contatto sembra essere un evento abbastanza raro.
Per alcune specie è stata accertata la trasmissione per seme, anche se questa evidenza assume scarsa importanza per le piante propagate per via vegetativa.
In vite il virus, la cui diffusione è dovuta soprattutto all'impiego di materiale di propagazione infetto, è spesso rinvenuto in infezioni miste insieme a GFLV.

1.4.5 Diagnosi

Dato l'elevato numero di specie ospiti, il saggio biologico (facoltativo) può essere effettuato utilizzando diverse piante indicatrici erbacee: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus, Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Phaseolus vulgaris* cv. The Prince e *Petunia hybrida.* Quest'ultima specie è particolarmente indicata anche per la conservazione e la purificazione degli isolati. Il periodo migliore per prelevare campioni per i saggi biologici (foglie) è la primavera. Oppure si può effettuare con saggi biologici legnosi usando *V. rupestris* du Lot o *V. rupestris* St. George, come per il GFLV.

La migliore matrice per i saggi di laboratorio è il legno raccolto durante il riposo vegetativo.

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.4.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.5 GFLV

Agente causale	*Grapevine fanleaf virus*
Tassonomia	Famiglia: *Secoviridae* Sottofamiglia: *Comovirinae* Genere: *Nepovirus*
Avversità	Arricciamento o degenerazione infettiva della vite
Acronimo	GFLV

1.5.1 Opsite

GFLV è uno dei primi virus identificati su vite. L'ospite naturale è *Vitis* spp., ma il virus può infettare, in seguito ad inoculazione artificiale, anche altre specie (*Chenopodium amaranticolor, C. quinoa*).

1.5.2 Sintomatologia

La sintomatologia dipende dai ceppi virali, dal vitigno e dalle condizioni ambientali. GFLV causa: 1) malformazioni nello sviluppo di foglie e germogli (degenerazione) e 2) "mosaico giallo" o "giallume infettivo" delle foglie. Le viti malate si individuano facilmente in campo nella stagione primaverile; successivamente, sulle foglie emesse nella stagione estiva, i sintomi si attenuano. Le piante infette danno produzione quantitativa (perdite anche del 50%) e qualitativa scadente.

Foto 1 - foglie prezzemolate e asimmetriche di un'accessione della cv Italia infetta da ceppo malformante di GFLV

FOGLIE

Le foglie assumono una forma a ventaglio con dentellatura acuta ed asimmetria del lembo (Foto 1). Le lamine fogliari (e nervature) possono presentare aree con decolorazioni giallo-cromo (mosaico giallo). La superficie appare arricciata, rugosa (Foto 2).

Foto 2- foglie decolorate di un'accessione della cv italia infetta da ceppo cromogeno di GFLV

TRALCI

I tralci presentano un accentuato accorciamento degli internodi, fasciazione che può interessare anche il grappolo (Foto 3) e biforcazione degli apici, emissione anormale di femminelle.

GRAPPOLO

Sul grappolo si osserva l' irregolare sviluppo e maturazione delle bacche (acinellatura) che si riflette in perdite quantitative e in una riduzione del tenore zuccherino (Foto 4).

Foto 3- fasciazione del rachide ed aborto fiorale su grappolo della cv Italia

Foto di C.Pirolo, DPPMA-Bari

Foto 4- danni alla produzione con acinellatura verde

1.5.3 Morfologia

GFLV è un virus poliedrico con un diametro di 28 nm sierologicamente abbastanza uniforme. Nelle preparazioni purificate è possibile distinguere tre componenti denominate T (Top), M (Middle) che contiene RNA2 e B (Bottom) che contiene sia RNA2 che RNA1. Il capside di GFLV si compone di 60 subunità.

1.5.4 Epidemiologia e trasmissione

Il virus viene trasmesso in condizioni naturali dal nematode *Xiphinema index*. Il gene CP è determinante per la specificità di trasmissione da parte di questo nematode. Sospetti coinvolgimenti di altre specie appartenenti al genere *Xiphinema* non hanno mai trovato conferma sperimentale.
Nella lunga distanza, la diffusione della virosi è stata favorita dal trasporto e commercializzazione di materiale di propagazione infetto.

1.5.5 Diagnosi

Il momento migliore per effettuare la diagnosi in pieno campo è il periodo primaverile quando risulta facilitato il riconoscimento dei sintomi. Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante
Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su *V. rupestris* du Lot, *V. rupestris* St.George
Saggio sierologico: ELISA (DAS-ELISA).
Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.5.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.6 GFkV

Agente causale	*Grapevine fleck virus*
Tassonomia	Famiglia: *Tymoviridae*
	Genere*: Maculavirus*
Avversità	Maculatura infettiva della vite
Acronimo	GFkV

1.6.1 ospite

Il virus ha come ospiti diverse specie appartenenti al genere *Vitis*, in cui resta solitamente latente, ad eccezione di *V. rupestris* su cui causa la maculatura infettiva, una virosi descritta per la prima volta in California

1.6.2 Sintomatologia

I sintomi causati da GFkV sono evidenti su alcuni portainnesti americani di *Vitis rupestris* (cv. St. George). Sulla maggior parte degli altri portinnesti e su tutte le cultivar di vite europea (*Vitis vinifera*) rimangono invece latenti.

FOGLIE
Nelle foglie giovani si osservano schiarimenti delle nervature di terzo e quarto ordine con spot visibili in controluce. I ceppi più virulenti possono causare anche malformazioni e distorsioni della lamina fogliare. La primavera è il periodo migliore per effettuare monitoraggi in campo, successivamente la sintomatologia si attenua.

foto: ucce.ucdavis.edu/files/datastore

1.6.3 Morfologia

Il virus è costituito da particelle isometriche di ca. 30 nm di diametro. E' un virus a singola elica di RNA.

1.6.4 Epidemiologia e trasmissione

GFkV è trasmissibile solo per innesto. Al momento non sono noti vettori del virus.

1.6.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:
Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su piante indicatrici (*Vitis rupestris* cv. St. George e *Vitis rupestris* cv du Lot).
Saggio sierologico: ELISA
Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.6.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Per la diagnosi degli 8 virus della vite la matrice da utilizzare in tutti i protocolli è il tessuto floematico ottenuto da materiale legnoso raccolto nel periodo invernale.
Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico e anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione può influire sul risultato dell'analisi di laboratorio.

Il corretto campionamento prevede quindi:
- il prelievo del campione vegetale nel periodo idoneo;
- la raccolta di materiale vegetale esente da alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura;
- il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

Norme da osservare per i prelievi in campo:
Periodo: Tutto il periodo di riposo vegetativo.
Matrice: La matrice migliore è costituita da tralci lignificati dell'anno.
Tipologia del campione: raccogliere 2 porzioni legnose dalla parte basale di tralci

dell'anno. I campioni legnosi devono essere integri e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.
Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto, deve essere posto in buste di plastica da conservare a basse temperature o in luoghi freschi tali da evitare eventuale disidratazione.
Rintracciabilità del campione: Ogni campione deve essere opportunamente siglato sulla busta e sulla pianta.
Spedizione del campione: I campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore preferibilmente in borse termiche.

Norme da osservare in laboratorio:
I campioni legnosi possono essere mantenuti a 4 °C non oltre i 60 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico.
Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa o seccumi non devono essere processati.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione degli 8 virus della vite coperti da norme fitosanitarie (Direttiva n. 2005/43/CE; D.M. 8 febbraio 2005; D.M. 7 luglio 2006; Decreto 24 giugno 2008, D.M. 13/12/2011): *Grapevine leafroll associated virus 1, 2 e 3* (GLRaV-1, -2 e -3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV*), Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Grapevine fleck virus* (GFkV). La diagnosi è stata effettuata in laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati 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 (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98)..
Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state condotte con materiali, reagenti e strumentazione dettagliatamente 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 secondo i parametri ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98 è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- Francesco Faggioli CRA-PAV, Coordinatore del gruppo del lavoro
- Francesco Anaclerio, Vivai Cooperativi Rauscedo
- Elisa Angelini, CRA-VIT
- Pier Luigi Bianchedi, IASMA - Fondazione Edmund Mach

- Gianluca Bianchi, ERSA-Friuli Venezia Giulia
- Piero Attilio Bianco, Università di Milano
- Michele Borgo, CRA-VIT
- Simona Botti, CAV –Tebano
- Paola Bragagna, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Marco Cardoni, CAV -Tebano
- Paola Casati, Università di Milano
- Rino Credi, Università di Bologna
- Giorgio Gambino, CNR – IVV Grugliasco
- Valeria Gualandri, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Andrea Luvisi, Università di Pisa
- Umberto Malossini, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Franco Mannini, CNR – IVV Grugliasco
- Gian Luca Mordenti, C.I.V.V. Ampelos
- Pasquale Saldarelli, CNR – IVV Bari
- Federica Terlizzi, Università di Bologna
- Enrico Triolo, Università di Pisa
- Nicola Trisciuzzi – CRSA "B. Caramia"

La definizione del parametro di riproducibilità per i saggi ELISA è scaturita dall'effettuazione di un ringtest nazionale eseguito presso i laboratori dei seguenti enti di ricerca, Università, enti regionali e strutture private:

- CAV - Tebano
- CNR – IVV Bari
- CRA-PAV
- CRA-VIT
- CRSA "B. Caramia"
- CSAF LAIMBURG
- ERSA – Friuli Venezia Giulia
- IASMA
- IPAD LAB Lodi
- SFR Emilia Romagna
- SFR Lombardia
- SFR Valle d'Aosta
- Università di Bologna
- Università di Milano
- Università di Pisa
- Vivai Cooperativi Rauscedo

Per il saggio molecolare il ring test è stato effettuato dai seguenti laboratori:

- CAV
- CNR – IVV Bari
- CNR – IVV Grugliasco
- CRA-PAV
- CRA-VIT
- ERSA - FVG
- IASMA

- IPAD LAB Lodi
- Università di Bologna
- Universtità di Milano

Le metodologie scelte per la validazione dei protocolli diagnostici sono le seguenti:

Metodo diagnostico	Componente virale riconosciuta
Sierologico: ELISA diretta o indiretta	proteina capsidica
Molecolare: multiplex RT-PCR	acido nucleico virale (RNA)

3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

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

Saggio diagnostico	Caratteristiche
Saggio diagnostico ELISA	**Tempi di esecuzione**: 36 ore per l'analisi di circa 80 campioni contro 8 virus. **Aspetti positivi:** economicità, elevata affidabilità e specificità, semplicità di esecuzione, disponibilità di antisieri di differenti ditte **Aspetti negativi:** minore sensibilità per alcuni virus (in particolare GVA, GVB, GLRaV-2) **Consigliato per analisi massali e previsto per legge nello screening iniziale del protocollo di selezione clonale**
Saggio molecolare multiplex RT-PCR	**Tempi di esecuzione**: 10 ore per l'analisi di circa 20 campioni contro 8 virus. **Aspetti positivi:** elevata affidabilità, specificità e sensibilità; possibilità di diagnosi multipla con un unico saggio **Aspetti negativi:** tecnica laboriosa e legata all'utilizzo di specifici reagenti; minore sensibilità per alcuni virus con genoma variabile (in particolare ArMV e GLRaV-2) **Consigliato per analisi su piccoli numeri, specialmente per materiale di esportazione e per i campioni risultati sani all'analisi ELISA nel protocollo di selezione clonale (dove è previsto per legge)**

3.2 Metodo diagnostico ELISA

Consiste in una reazione specifica antigene (virus)-anticorpo che avviene su un supporto solido, i pozzetti di una piastra ELISA, e che viene visualizzata mediante una reazione colorimetrica. Verranno descritte differenti varianti del saggio in funzione del numero e dell'ordine in cui i reagenti verranno utilizzati.
Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.
Vengono utilizzati kit sierologici commerciali e l'efficienza del saggio riportata dalla Ditta produttrice è correlata ai test di qualità effettuati nelle condizioni di lavoro espressamente riportate nel relativo foglietto di istruzioni.
Seguire, quindi, attentamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice. In particolare effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate.
Utilizzare la diluizione del campione consigliata. Non modificare il tampone di estrazione.
Si riportano le procedure del saggio valido per tutte le varianti.

3.2.1 Preparazione dei tamponi

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre, il tampone coniugato ed il tampone PBS (che può essere preparato alla concentrazione 10X da utilizzare come stock di partenza) possono essere preparati precedentemente e mantenuti in laboratorio, a temperatura ambiente. Controllare accuratamente il pH del tampone carbonato perché è determinante per l'adesione degli anticorpi alla plastica dei pozzetti.
Il tampone per il substrato può essere preparato prima e mantenuto a 4 °C al riparo dalla luce.
Il tampone di estrazione deve essere sempre preparato poco prima dell'utilizzo e mantenuto a 4°C o in ghiaccio.
E' importante utilizzare i tamponi entro 30 gg. dalla preparazione. E' possibile arrivare fino a 6 mesi se i tamponi vengono aggiunti di sodio azide (0,2g/L).

3.2.2 Preparazione del saggio ELISA

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.
Per ogni piastra è possibile caricare 41 campioni più un controllo sano, uno infetto ed un bianco. Come controllo positivo e negativo possono essere utilizzati quelli forniti dai kit commerciali oppure possono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una vite sicuramente infetta dai virus oggetto di studio e da una vite sicuramente esente da virus, rispettivamente. In questo caso i controlli devono essere macerati congiuntamente ai campioni da saggiare. Il controllo bianco è costituito da tampone di estrazione da caricare al posto del campione vegetale.
Ciascun campione deve essere replicato su due pozzetti, compresi il controllo sano, quello infetto ed il tampone.

Otto pozzetti di bordo saranno riempiti con tampone, i valori però non saranno considerati nel calcolo del rumore di fondo (vedi il capitolo 'Valutazione dei risultati'). Pulire accuratamente e disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta, da sostituire ad ogni fase.

3.2.3 Estrazione del virus dal campione da analizzare

La matrice utilizzata per il saggio di tutti i virus è il tessuto floematico, ottenuta seguendo le fasi di seguito elencate:
Fase 1 Rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) fino a mettere a nudo il tessuto floematico.
Fase 2 Prelievo del floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino.
Fase 3 Il tessuto floematico ottenuto DEVE essere posto in MORTAIO e polverizzato con azoto liquido e successivamente aggiunto del tampone di estrazione o, in alternativa, direttamente macerato con pestello in presenza di tampone di estrazione nel rapporto peso/volume 1/10.
Fase 4 Lasciare macerare il floema ottenuto dalla fase 3 a contatto con il tampone di estrazione per 2-3 ore a freddo (4 °C o in ghiaccio).
In alternativa è possibile l'utilizzo di una fresa per macinare/polverizzare il campione
Fase 1 Il campione può essere trattato in due modi: con rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) oppure trattato integralmente. In questo caso l'unica accortezza è di aumentare la quantità di campione a contatto con il tampone di estrazione.
Fase 2 Prelievo del floema, congiuntamente agli altri tessuti del tralcio legnoso, mediante macinazione/polverizzazione tramite una fresa (tipo GRANEX o artigianale), con raccolta del materiale campionato in contenitori di plastica.
Fase 3 Aggiungere il tampone di estrazione ai tessuti campionati in rapporto 1/10; macerare direttamente a freddo (4 °C o in ghiaccio) per 2-3 ore oppure (opzionale) omogeneizzare meccanicamente prima di lasciare a freddo (4 °C o in ghiaccio) per 2-3 ore.
E' necessario siglare sempre ogni singolo campione.

- Durante le operazioni di preparazione mantenere i mortai in ghiaccio o in cella fredda a 4 °C.
- Mantenere i campioni via via macerati in ghiaccio o a 4 °C.

3.2.4 Valutazione dei risultati

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo.
I risultati sono attendibili fino a che i controlli negativi non superano l'assorbanza di 0,2 OD.
Quantificare la colorazione tramite lettura in un apposito fotometro a 405nm. Fare almeno 3 letture a partire dall'inizio della colorazione del controllo positivo (o del

primo campione risultato infetto) e proseguire fino a che il controllo negativo non supera l'assorbanza di 0,2 OD.
Lo sviluppo del colore può essere bloccato aggiungendo 50 µl/pozzetto di sodio idrossido 3M.

Background o *rumore di fondo* (**A**) = media dei controlli negativi (eccetto gli 8 pozzetti della prima colonna).
Threshold o *limite soglia* (**B**). **B** = A x 2,5 se questo valore risulta superiore o uguale a 0,1 OD, in caso contrario il valore soglia sarà pari a 0,1 OD.
Campione positivo: **≥ B**
Campione negativo: **< B**

3.2.5 Procedura del saggio di ELISA diretta o DAS-ELISA (utilizzata per i virus ArMV, GFLV, GLRaV 1, 2 e 3 di Agritest, tutti gli antisieri di Bioreba e ArMV, GFLV, GLRaV 1, 3 e ArMV+GFLV di Sediag)

Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici.
Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta del kit in tampone carbonato 1X.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del Kit specifico (generalmente 100 o 200 µl).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Estrazione del virus dai campioni
Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Lavaggio della piastra
Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni
Caricare i campioni (100 o 200 µl per pozzetto, secondo quanto riportato dalla Ditta produttrice del kit) seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione). Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.
Riempire con tampone anche i pozzetti di bordo.
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Distribuzione anticorpo specifico coniugato

Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.
Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salthexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di
tampone.

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

Caricamento del substrato

Caricare 100 o 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.6 Procedura del saggio di ELISA indiretta o DASI-ELISA (utilizzata per i virus GVA e GFkV di Agritest e GVA, GLRaV 2 e GFkV di Sediag)

Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici
Diluire gli anticorpi, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (generalmente 100 o 200 µl).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Estrazione del virus dai campioni
Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio

3- Lavaggio della piastra
Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni
Caricare i campioni (100 o 200 µl per pozzetto secondo quanto previsto dalla Ditta produttrice) seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Lavaggio della piastra
Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Distribuzione del secondo anticorpo specifico
Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Lavaggio della piastra
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dell'anticorpo coniugato
Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Preparazione del substrato
Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.
Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salthexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Mantenere il substrato al buio prima dell'uso..

Lavaggio della piastra
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Caricamento del substrato
Caricare 100 o 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.7 Procedura ELISA con pre - sensibilizzazione con proteina A per il virus GVA di Agritest

Pre - sensibilizzazione con Proteina A
Diluire la Proteina A, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di Proteina A per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Per la migliore ripetibilità del saggio è consigliabile lo stoccaggio della Proteina A suddivisa in aliquote minime (es. per una piastra) o in alternativa utilizzare in un'unica soluzione tutto il contenuto della proteina A e sensibilizzare le piastre relative che potranno essere conservate a -20°C. E' questo un passaggio fondamentale dal momento che la Proteina A va incontro ad un degradamento se congelata e scongelata più volte
- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato

Lavaggio della piastra
Dopo l'incubazione della piastra iniziare il lavaggio.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpi specifici.
Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

Estrazione del virus dai campioni
Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Lavaggio della piastra
Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni
Caricare 200 µl di ogni campione per pozzetto seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Lavaggio della piastra
Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Distribuzione degli anticorpi specifici coniugati
Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Caricare 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Preparazione del substrato
Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.
Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salthexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del substrato
Caricare 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.7 Procedura ELISA con sensibilizzazione diretta dell'antigene per il virus GVB di Agritest

Estrazione del virus dai campioni
Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Sensibilizzazione della piastra ELISA direttamente con i campioni – Distribuzione dei campioni.
Caricare 200 µl di ogni campione per pozzetto seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo

positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Lavaggio della piastra
Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

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

Sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpi specifici.
Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl)
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

Lavaggio della piastra
Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.
Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione degli anticorpi specifici coniugati
Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Caricare 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto.
Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

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

Preparazione del substrato
Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.
Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salthexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.
Mescolare bene la soluzione ottenuta.
Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra
Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato. Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del substrato
Caricare 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

Punti critici dell'ELISA

a. Essendo l'ELISA una reazione antigene-anticorpo che avviene su un supporto solido la scelta della piastra è molto importante perché influisce sul legame degli anticorpi e sull'eventuale background della reazione. Esistono diversi tipi di piastre ELISA in commercio: a fondo piatto o a fondo conico, ad alta, media e bassa capacità di legame con gli anticorpi, dovuta a pre-trattamenti del materiale plastico. Si consiglia di cambiare il tipo di piastra o il lotto utilizzato nel caso si osservino fenomeni ripetuti di background (giallo diffuso sui controlli negativi) o reazioni molto deboli. Accertarsi, comunque, che la piastra sia specifica per il saggio ELISA (esistono in commercio molti tipi di piastre a 96 pozzetti dedicate ad altri scopi).
b. Nello schema del test riportare anche il numero di lotto del kit sierologico (può essere determinante per la uniformità di alcuni risultati).
c. Utilizzare il kit sierologico entro la data di scadenza.
d. Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.
e. Controllare con accuratezza il pH dei tamponi utilizzati, perché è determinante per la loro efficienza.
f. Controllare almeno una volta al mese la taratura delle micro pipette utilizzate.
g. L'efficienza del test ELISA è strettamente dipendente da una buona macerazione del campione vegetale, effettuare con molta cura le operazioni di preparazione del campione.
h. La reazione di legame antigene-anticorpo che avviene all'interno dei pozzetti della piastra ELISA è efficiente e specifica solo se ad ogni passaggio vengono eliminati i reagenti che non si sono legati. Le fasi di lavaggio sono, quindi, molto importanti per la buona riuscita del test. Il lavaggio manuale mediante uso di una bottiglia a spruzzo è il più efficiente. Se si utilizzano macchinari per il lavaggio automatico delle piastre ELISA è NECESSARIO controllare ogni settimana la perfetta pulizia ed efficienza di ogni canale di lavaggio. In particolare, dopo il caricamento dei campioni fare molta attenzione ad eliminare qualunque residuo di materiale vegetale (le piastre devono risultare assolutamente trasparenti).
i. Controllare sempre le etichette dei reagenti del kit ed i fogli di istruzione della Ditta produttrice prima di effettuare le opportune diluizioni (possono variare in funzione del lotto utilizzato).
j. Le soluzioni di anticorpo o coniugato devono essere effettuate secondo le istruzioni, in contenitori di vetro o di polietilene (o opportuna plastica a bassa

capacità di legame delle proteine) poco prima dell'uso.

k. Tenere le piastre ELISA sempre coperte con pellicola trasparente o l'apposito coperchio durante le incubazioni.
l. Controllare sempre la pulizia e le condizioni asettiche dei contenitori in cui vengono preparati e mantenuti i tamponi.
m. Utilizzare guanti per la manipolazione delle piastre ELISA o fare molta attenzione a non toccare il fondo delle piastre.
n. I pozzetti delle righe e colonne esterne della piastra possono essere soggetti al cosiddetto "effetto bordo", dovuto al contatto con l'aria, che si evidenzia con la colorazione gialla dei pozzetti indipendentemente dall'avvenuta reazione antigene-anticorpo. Caricare i campioni sempre su doppio pozzetto in modo da evitare che entrambi risultino collocati solo su tali righe e colonne. Se l'effetto bordo si ripete costantemente, usare per il saggio solo i pozzetti centrali ed eliminare i pozzetti di bordo, riempiendoli con tampone.

Tamponi necessari per l'effettuazione del test ELISA

Tampone carbonato (sensibilizzazione delle piastre)		
Na_2CO_3	1,59	g
$NaHCO_3$	2,93	g
NaN_3	0,20	g
H_2O distillata fino ad 1 litro		
pH 9,6		

Tampone di lavaggio PBS - T	
NaCl	8,00 g
KH_2PO_4	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KCl	0,20 g
Tween 20 *	0,50 ml
H_20 distillata fino ad 1 litro di soluzione	
pH 7,4	

*Si consiglia di preparare una soluzione di Tween 20 al 10% e di aggiungere 5 ml.

Tampone coniugato 1		
In PBS pH 7,4		
PVP MW 24000	20,00	g
BSA (bovine serum albumin)	2,00	g
Tween 20	0,50	ml

Tampone coniugato 2		
TRIS	2,40	g
NaCl	8,00	g
PVP K25 (MW 24000)	20,00	g
Tween 20	0,50	ml
BSA (bovine serum albumin)	2,00	g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,20	g
KCl	0,20	g
NaN_3	0,20	g
H_20 distillata fino ad 1 litro di soluzione		
pH 7,4 (con aggiunta di HCl)		

Tampone di estrazione		
TRIS - HCl	37,2	g
TRIS – base	32,00	g
NaCl	8,00	g
PEG (MW 6000)	10,00	g
PVP MW 24000	20,00	g
NaN3	0,20	g
Tween 20	0,50	ml
H_20 distillata fino ad 1 litro di soluzione		
pH 8,2		

Tampone substrato		
dietanolammina	97	ml
H_2O distillata fino ad 800 ml di soluzione		
Portare il pH a 9,8 mediante aggiunta di HCl		
Portare ad 1 litro con acqua distillata		
Aggiungere 0,20 g di NaN_3		

La miscela deve essere agitata per 3-4 ore prima dell'uso

3.3 Metodo diagnostico di Multiplex RT-PCR

Preparazione del saggio Multiplex RT-PCR (Gambino and Gribaudo, 2006)

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.
Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.
Per ogni evento di estrazione ed amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo per ogni specie saggiata e un controllo acqua. Si consiglia di non superare il numero di 30 campioni per evento di estrazione/amplificazione (compresi i controlli).
Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta dai virus e da una pianta sicuramente esente dai virus, rispettivamente.
Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto del RNA totale del campione da saggiare.
Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco. Usare solo provette e puntali con filtro sterili da usare SEMPRE indossando guanti monouso.

Estrazione con kit commerciale Qiagen + Tampone MacKenzie (MacKenzie *et al.,* 1997)
Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.
Rimuovere lo strato corticale esterno (ritidoma) dai tralci legnosi fino a mettere a nudo il tessuto floematico. Prelevare il floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino sterili. E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale.
Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall'infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale ed alla stessa matrice saggiata.

- Pesare 0,25 g di tessuto floematico
- Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello autoclavati.
- Aggiungere 1,7 ml di tampone MacKenzie e 17 µl di β-mercaptoetanolo e mescolare.

- Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12000 rpm per 6 min.
- Trasferire 1 ml di surnatante in eppendorf da 1,5 ml aiutandosi con un puntale cui è stata tolta la punta.
- Aggiungere 100 µl di Sarkosyl 20% ad ogni provetta.
- Incubare a 70 °C per 10 minuti agitando periodicamente i tubi.
- Versare il contenuto caldo nelle prime colonnine del kit.
- Centrifugare a 12.000 rpm per 2'.
- Prelevare il percolato senza toccare il pellet, trasferirlo in una nuova provetta eppendorf e aggiungere 500 µl di Et-OH assoluto freddo e mescolare delicatamente con la pipetta.
- Versare 700 µl della soluzione nelle seconde colonnine del kit.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato e ripetere per la restante soluzione.
- Aggiungere 700 µl di tampone RW1 a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Aggiungere 500 µl di tampone RPE (già addizionato di Et-OH) a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Ripetere il passaggio centrifugando a 10000 rpm per 2 minuti. Eliminare l'eluato.
- Centrifugare a vuoto a 12.000 rpm per 1 minuto
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 50 µl di acqua RNase free. Ripetere il passaggio 2 volte
- Centrifugare a 10000 rpm per 1'.
- Eliminare la colonnina e mettere 15-20' a -80 °C prima di usare.

Per 1 l di tampone.

Tampone MacKenzie pH 5		
Guanidina Isotiocianato	4 M	472 g
Sodio Acetato	0,2 M	16,4 g
EDTA	25 mM	9,2 g
PVP 40%	2,5 %	25 g

Portare a pH 5 e autoclavare

Trattamento con Dnasi

E' una fase importante per il controllo interno della vite per eliminare tracce di DNA. Seguire i seguenti passaggi:

1. Diluire 1 µg di RNA in 8 µl di H_2O DEPC
2. aggiungere 1 µl di 10X tampone di reazione
3. aggiungere 1 µl di enzima Dnasi
4. lasciare a temperatura ambiente per 15'
5. aggiungere 1 µl di stop solution (EDTA 50mM)
6. incubare a 65°C per 10'
7. trasferire in ghiaccio e proseguire o congelare a -80 °C

Trascrittasi inversa (sintesi cDNA)
Utilizzare RNA trattato con Dnasi
1. aggiungere 1 µl di dNTP (10 mM)
2. aggiungere 1 µl di random nonamers (50 µM)
3. incubare a 65 °C per 5 minuti e trasferire i campioni in ghiaccio
4. aggiungere 4 µl di 5X First. Strand buffer
5. aggiungere 2 µl di 0.1 M DTT
6. aggiungere 1 µl di RNase-Inibhitor
7. aggiungere 1 µl di M-MLV – reverse transcriptase
8. incubare a 25 °C per 10 minuti, 37 °C per 1 ora e 70 °C per 15 minuti su termociclatore
9. trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20 °C

Multiplex RT-PCR

Primer
Per la diagnosi dei virus della vite mediante il protocollo Multiplex RT-PCR vanno utilizzati i primer riportati nella sottostante tabella:

Nome	Sequenza 5'-3'	Gene	bp amplificato
18S-M1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	controllo interno RNA vite	**844 bp**
18S-M2	TTCAGCCTTGCGACCATACT		
GLRaV2-CP1	GGTGATAACCGACGCCTCTA	prot capsidica	**543 bp**
GLRaV2-CP2	CCTAGCTGACGCAGATTGCT		
GVB-M1	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	putat RNA binding protein	**460 bp**
GVB-M2	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG		
ArMV-AN1	ATGCTGATGTTGGAGTTGCTCT	prot capsidica	**416 bp**
ArMV-AN3	AGTGGCACTAAACCACAAAGC		
GLRaV3-M3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	prot capsidica	**336 bp**
GLRaV3-N2	TGCGGCATTAATCTTCATTG		
GVA-6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	prot capsidica	**272 bp**
GVA-6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC		
GLRaV1-M3	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	prot capsidica	**232 bp**
GLRaV1-M4	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG		
GFKV-M1	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	prot capsidica	**179 bp**
GFKV-M2	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG		
GFLV-M3	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	RNA polim RNA dip	**118 bp**
GFLV-M4	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG		

I primer possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primer ad una concentrazione di 10 o 100µM in dH_2O sterile (secondo quanto riportato nella tabella della pagina seguente e seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 ml totali alla concentrazione di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Preparazione del saggio

1. Indossare guanti puliti
2. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli
3. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio
4. Scongelare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio
5. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

Miscela di reazione per ogni campione

Miscela di reazione	*Ordine di inserimento*
2,75 µl di buffer 10X	1- acqua
1,6 µl di $MgCl_2$ (50 mM)	2- buffer
0,75 µl di dNTP (10mM)	3 - $MgCl_2$
3,25 µl di primer mix multiplex	4- dNTPs
0,25 µl di Platinum Taq polimerasi	5- primer
2 µl di cDNA	6- enzimi
14,4 µl H_2O sterile	
Volume totale: 25 µl con acqua sterile RNasi-free	

Miscela primer multiplex

Primer	Quantità per 1 campione
18S-M1	0,1µl (10 µM)
18S-M2	0,1 µl (10 µM)
GLRaV2-CP1	0,1 µl (100 µM)
GLRaV2-CP2	0,1 µl (100 µM)
GVB-M1	0,2 µl (10µM)
GVB-M2	0,2 µl (10 µM)
ARMV-9	0,1 µl (100 µM)
ARMV-10	0,1 µl (100 µM)
GLRaV3-M3	0,1 µl (100 µM)
GLRaV3-N2	0,1 µl (100 µM)
GVA-6591F	0,075 µl (100 µM)
GVA-6862R	0,075 µl (100 µM)
GLRaV1-M3	0,375 µl (10 µM)
GLRaV1-M4	0,375 µl (10 µM)
GFKV-M1	0,5 µl (10µM)
GFKV-M2	0,5 µl (10µM)
GFLV-M3	0,075 µl (100 µM)
GFLV-M4	0,075 µl (100 µM)
TOTALE x 1 campione	3,25 µl

1. Mescolare bene la soluzione.
2. Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
3. Aggiungere il cDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
4. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
5. Inserire le provette nel Termociclatore.
6. Avviare la RT-PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

Ciclo

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	2’	1
Amplificazione	94 °C	30”	35
	55 °C	60”	
	72 °C	90”	
Estensione finale	72 °C	10’	1
Step di blocco	10 °C	10’	1

Conservare le provette in frigorifero.

Elettroforesi su gel di agarosio

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

1. Preparare il gel di agarosio 2,5% in TBE 0,5X.
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.
2. Caricare 5-10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 1 µl di loading buffer 10X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
3. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 100-1000 bp).
4. Correre il gel per circa 60-90’ minuti a 120 V, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 10’ circa in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro o con Gel Red
6. Lavare il gel per circa 5 minuti in H_2O.
7. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V.

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserveranno bande specifiche alle altezze predefinite (Foto 1 e 2), come da tabella dei primer riportata in precedenza.

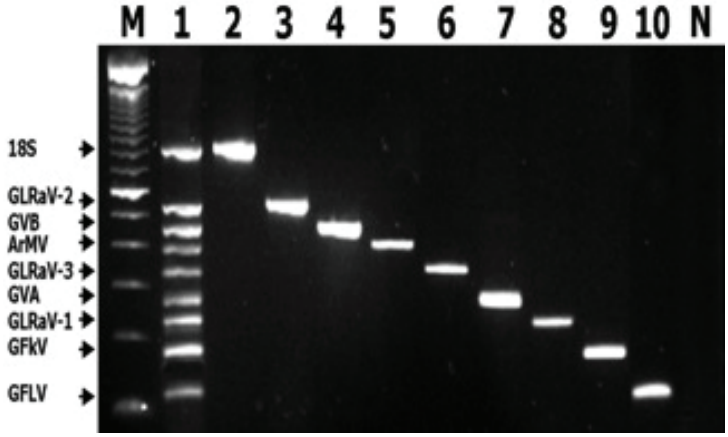

Foto 1 - Gel ottenuto utilizzando target "predefiniti". 2 = controllo sano; 3 = controllo positivo GLRaV 2, 4 = controllo positivo GVB; 5 = controllo positivo ArMV; 6 = controllo positivo GLRaV 3; 7 = controllo positivo GVA; 8 = controllo positivo GLRaV 1; 9 = controllo positivo GFkV; 10 = controllo positivo GFLV. N = controllo bianco; 1 = tutti i controlli insieme (sano e positivi). M = marker 100 bp

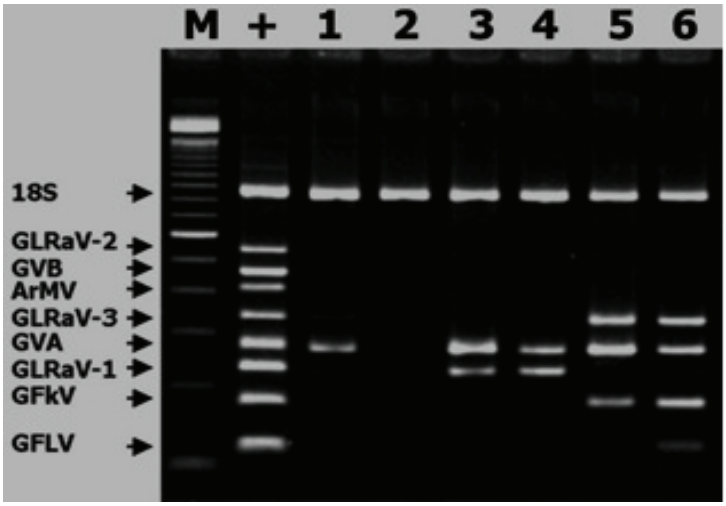

Foto 2 - Gel ottenuto analizzando sei campioni ignoti. 1 = campione infetto da GVA; 2 = campione sano; 3 e 4 = campioni infetti da GVA e GLRaV 1; 5 = campione infetto da GLRaV 3, GLRaV 1 e GVA; 6 = campione infetto da GLRaV 3, GLRaV 1, GVA e GFLV; + = insieme dei controlli (sano e positivi); M = marker 100 bp

Foto: G. Gambino – CNR –IVV Grugliasco

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è la sua estrema sensibilità, 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, micro pipette 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 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 micro pipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati;
  - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
  - usare solo acqua sterile RNasi-free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
  - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TRNA);
  - aprire tutte le provette con gli appositi "apri - provette" e non farlo con le mani;
  - usare solo puntali sterili con filtro;
  - al momento di caricamento del blocco del Termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.
- controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della RT-PCR.
- fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti. In particolare mantenere sempre in ghiaccio gli enzimi quando vengono utilizzati nella preparazione della miscela di reazione.
- E' importante utilizzare un marker idoneo per la valutazione dell'altezza delle bande

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98) utilizzando campioni di riferimento.

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

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

Campioni di riferimento 'target': isolati che rappresentano la diversità genetica, la distribuzione geografica e le diverse varietà e/o specie ospiti del patogeno.
Campioni di riferimento 'non target': isolati infetti da altri virus che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali stesso genere), campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

Le prove di validazione sono state effettuate a fine inverno a partire da campioni legnosi. La matrice utilizzata è stato il floema ottenuto dalla zona sottocorticale di tralci lignificati.

4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi

Per la validazione del protocollo sierologico sono stati utilizzati 122 campioni target e non target di riferimento sia di *Vitis vinifera* L. che di *Vitis* spp. (portainnesti) distribuiti secondo quanto riportato nella tabella sottostante e comprensivi di 20 campioni pool costituiti da 4 parti di tessuto sano ed una parte di tessuto infetto:

Virus	Infezione singola	Infezione mista
GLRaV 1	11	12
GLRaV 2	3	13
GLRaV 3	9	20
GVA	5	22
GVB	3	5
ArMV	6	5
GFLV	8	12
GFkV	7	10
Non target	7	

Per la validazione del protocollo molecolare di multiplex RT-PCR sono stati utilizzati 30 campioni target e non target di riferimento sia di *Vitis vinifera* L. che di *Vitis* spp. (portainnesti) distribuiti secondo quanto riportato nella tabella sottostante comprensivi di

Virus	Infezione singola	Infezione mista
GLRaV 1	2	4
GLRaV 2	2	5
GLRaV 3	4	4
GVA	1	8
GVB	1	3
ArMV	3	2
GFLV	1	2
GFkV	1	5
Non target	3	

Tutti gli isolati, pervenuti dal CNR-IVV di Bari, CNR-IVV- Grugliasco, CRSA di Locorotondo, ERSA-FVG, Università di Pisa, Università di Milano, Fondazione E. Mach – IASMA S. Michele a/A, CAV di Faenza, Vivai Cooperativi di Rauscedo, CRA-VIT di Conegliano e CRA-PAV di Roma, sono stati preventivamente controllati per mezzo di saggio sierologico e molecolare in singola RT-PCR.

4.2 Metodo diagnostico ELISA

Valori di validazione
I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando 3 diversi tipi di antisieri, ed i seguenti materiali, reagenti e strumenti.
Di seguito sono riportati gli antisieri (Kit sierologici) le piastre ELISA , ed i dettagli di reagenti e delle strumentazioni utilizzate per le prove di validazione:

Virus	Kit sierologico
GLRaV-1	Agritest, Bioreba, Sediag
GLRaV-2	Agritest, Bioreba, Sediag
GLRaV-3	Agritest, Bioreba, Sediag
GVA	Agritest, Bioreba, Sediag
GVB	Agritest
ArMV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFLV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFkV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFLV + ArMV	Bioreba, Sediag
GLRaV 1 + GLRaV 3	Bioreba

Piastra ELISA: Nunc maxisorp F96 735-0199
Substrato: Sigma S=942 TAB;
Mortai, bisturi, coltelli
Azoto liquido
Fresa GRANEX o modello artigianale simile: apparecchiatura meccanica alimentata da motore elettrico, dotata di una ruota dentata (tipo fresa) per la macinazione/polverizzazione integrale (midollo, xilema/floema e corteccia) o parziale (midollo, xilema/floema) del campione legnoso di tralcio, dotati di un dispositivo convogliatore del macinato nella provetta di estrazione.
Lettore per piastre ELISA: Labsystems Multiskan EX e Plus, Dynatech MR5000, BIO-TEK instruments,inc EL800
Micropipette: Gilson, Eppendorf, Labsystems
Lavaggio manuale delle piastre

Di seguito vengono riportati i valori dei parametri di validazione ottenuti per singolo virus:

GLRaV-1

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	89%	94%	96%
Specificità	97%	100%	100%
Accuratezza	93%	96%	98%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
Ripetibilità[(2)]	100%	100%	100%
Riproducibilità	92%	91%	92%
Valori campioni pool			
Sensibilità	85%	61%	77%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	89%	93%	84%
Ripetibilità	100%	100%	100%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GLRaV-2

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	86%	67%	87%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	90%	77%	91%
Sensibilità analitica[(1)]	2^{-2}	2^{-2}	2^{-2}
Ripetibilità[(2)]	94%	92%	92%
Riproducibilità	88%	82%	82%
Valori campioni pool			
Sensibilità	85%	61%	21%
Specificità	100%	100%	95%
Accuratezza	89%	93%	53%
Ripetibilità	100%	100%	92%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 2^0 a 2^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GLRaV-3

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	81%	90%	97%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	84%	92%	97%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
Ripetibilità[(2)]	100%	100%	100%
Riproducibilità	98%	91%	92%
Valori campioni pool			
Sensibilità	66%	97%	100%
Specificità	94%	100%	93%
Accuratezza	75%	98%	98%
Ripetibilità	100%	94%	100%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GVA

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	74%	46%	87%
Specificità	100%	100%	96%
Accuratezza	80%	58%	89%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
Ripetibilità[(2)]	95%	100%	100%
Riproducibilità	92%	73%	88%
Valori campioni pool			
Sensibilità	73%	30%	82%
Specificità	100%	75%	100%
Accuratezza	81%	43%	87%
Ripetibilità	95%	86%	100%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GVB

Valori campioni singoli	Agritest
Sensibilità	86%
Specificità	100%
Accuratezza	92%
Sensibilità analitica[(1)]	2^{-2}
Ripetibilità[(2)]	100%
Riproducibilità	100%
Valori campioni pool	
Sensibilità	n.t.
Specificità	n.t.
Accuratezza	n.t.
Ripetibilità	n.t.

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 2^0 a 2^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

ArMV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	64%	48%	50%
Specificità	85%	95%	96%
Accuratezza	74%	71%	72%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
Ripetibilità[(2)]	100%	100%	100%
Riproducibilità	94%	93%	96%
Valori campioni pool			
Sensibilità	64%	42%	43%
Specificità	94%	100%	97%
Accuratezza	81%	76%	74%
Ripetibilità	100%	100%	100%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GFLV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	75%	82%	77%
Specificità	96%	92%	92%
Accuratezza	80%	84%	81%
Sensibilità analitica(1)	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
Ripetibilità(2)	100%	100%	100%
Riproducibilità	94%	91%	91%
Valori campioni pool			
Sensibilità	65%	90%	79%
Specificità	100%	93%	94%
Accuratezza	79%	91%	85%
Ripetibilità	100%	86%	100%

(1) La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
(2): La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GFkV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	85%	90%	30%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	88%	92%	46%
Sensibilità analitica(1)	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
Ripetibilità(2)	100%	100%	95%
Riproducibilità	92%	86%	88%
Valori campioni pool			
Sensibilità	72%	47%	42%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	84%	70%	67%
Ripetibilità	100%	100%	95%

(1) La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
(2): La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

GLRaV 1+ 3

Valori campioni singoli	Bioreba
Sensibilità	84%
Specificità	100%
Accuratezza	90%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-2}
Ripetibilità[(2)]	100%
Riproducibilità	92%
Valori campioni pool	
Sensibilità	81%
Specificità	94%
Accuratezza	85%
Ripetibilità	100%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

ArMV + GFLV

Valori campioni singoli	Bioreba	Sediag
Sensibilità	88%	67%
Specificità	62%	67%
Accuratezza	82%	67%
Sensibilità analitica[(1)]	10^{-1}	10^{-1}
Ripetibilità[(2)]	100%	96%
Riproducibilità	93%	74%
Valori campioni pool		
Sensibilità	79%	47%
Specificità	62%	67%
Accuratezza	73%	53%
Ripetibilità	86%	83%

[(1)] La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
[(2)]: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

4.3 Metodo diagnostico Multiplex RT-PCR

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:
Mortai, bisturi, coltelli
Azoto liquido
kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 **Qiagen**
Trattamento con DNAsi: Dnasi-**Invitrogen** (cod. 18068-015).
Prodotti pr la trascrittasi inversa: dNTP (**Sigma** cod. D7295); random nonamers (**Sigma** Cod R7647); First Strand buffer (**Invitrogen** cod. 28025-013); DTT (**Invitrogen** cod. 28025-013); RNase-OUT (**Invitrogen** cod. 10777-019); M-MLV – reverse transcriptase (**Invitrogen** cod. 28025-013); enzima Dnasi (**Invitrogen** cod. AM2224)
primers specifici: sintetizzati da **Invitrogen** Ltd
Termociclatore: MJ PTC200, **BioRad iCycler**, **Biometra T-Professional**
Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000
marker per DNA: Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes **Promega Corporation** cod. G 7541
Amplificazione multipla: Platinum Taq polimerasi (**Invitrogen** cod. 10966-018)

Virus/Valori	Sensibilità	Specificità	Accuratezza	Sensibilità analitica	Ripetibilità	Riproducibilità
GLRaV-1	74%	100%	94%	10^{-2}	100%	70%
GLRaV-2	84%	98%	85%	10^{-2}	95%	83%
GLRaV-3	100%	93%	95%	10^{-3}	100%	100%
GVA	96%	99%	98%	10^{-2}	100%	94%
GVB	100%	100%	100%	10^{-2}	100%	90%
ArMV	92%	99%	98%	10^{-2}	100%	100%
GFLV	68%	100%	90%	10^{-3}	100%	76%
GFkV	95%	95%	95%	10^{-2}	100%	95%
Totale 8 virus	**89%**	**98%**	**95%**	**10^{-2}**	**99%**	**90%**

(1) La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10^0 a 10^{-4}
(2): La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2^0 a 2^{-2}

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Gambino G. I. Gribaudo, 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA as *internal control. Phytopathology* **96**(11): 1223-1229.

MacKenzie D.J., M.A. McLean., S. Mukerji, M. Green, 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81**, 222-226.

ALLEGATO I -Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Strumentazione, materiali e reagenti necessari per metodo ELISA diretta e indiretta

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Distillatore
4. Frigorifero e congelatore
5. Incubatore termostatico (37°C)
6. Lavatore di piastre automatico (opzionale)
7. Lettore piastre ELISA (Fotometro)
8. Micro pipette dedicate e calibrate (P10, P20, P50, P200, P1000, P5000)
9. Pipetta multicanale (opzionale)
10. Fresa per polverizzazione del legno o omogeneizzatore (opzionale)
11. pH metro
12. Bisturi o coltelli

Reagenti

1. Kit sierologico ELISA
2. Reagenti chimici per i tamponi (PBS, PBS-T, tampone carbonato, tampone di estrazione, tampone coniugato, tampone per substrato)
3. Substrato (para-nitro-fenilfosfato - PNP)
4. Controllo positivo, sicuramente infetto dai virus target ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione dai virus target ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.

Materiali

1. Acqua distillata
2. Fogli di carta per ricoprire i banchi da lavoro
3. Carta da laboratorio
4. Rotoli di carta di alluminio
5. Guanti monouso
6. Pellicola trasparente
7. Mortai e pestelli
8. Piastre polistirene a 96 pozzetti per ELISA ad alta capacità di legame con gli anticorpi
9. Puntali per micro pipette di tutti i volumi adeguati alle pipette sopra indicate
10. Vetreria varia o materiale plastico monouso
11. Lame da bisturi
12. Azoto liquido (opzionale)

Seguire, quindi, attentamente **TUTTE le istruzioni della Ditta produttrice del kit sierologico utilizzato**. In particolare effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate. Utilizzare la diluizione del campione nel rapporto 1/10 peso/volume. Non modificare i tamponi indicati.

Strumentazione, materiali e reagenti necessari per il saggio di Multiplex RT-PCR

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostatato o termo blocco
4. Bilancia analitica ed Agitatore magnetico
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (opzionale)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore -20°C e -80°C, Frigorifero
9. Spettrofotometro
10. Micro pipette dedicate all'amplificazione e calibrate (da P10, a P1000)
11. Micro pipette dedicate all'estrazione RNA e calibrate (da P10, a P1000)
12. pH metro
13. Termociclatore
14. Transilluminatore
15. Vortex

Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua DEPC o Acqua RNAse free
3. Acido acetico
4. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, bromuro d'etidio o Gel Red
5. Controlli negativi e positivi
6. dNTP's e Random nonameri (Sigma)
7. Enzima M-MLV Reverse Transcriptase e relativo tampone comprensivo di DTT (Ditiodithiothreitol) Invitrogen
8. Enzima DNase Invitrogen
9. Enzima RNase inhibitor Invitrogen
10. Etanolo assoluto (ET-OH)
11. Kit commerciale per estrazione RNA - RNeasy Plant mini Kit Qiagen
12. Loading buffer per elettroforesi
13. Marker di DNA (100bp)

14. Primer specifici per i diversi virus della vite
15. Platinum Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$ Invitrogen
16. Azoto liquido
17. Guanidina isotiocianato
18. Sarkosyil - Sodio lauril sarcosina
19. Sodio acetato
20. EDTA
21. PVP-40

Materiali

1. Puntali sterili per micro pipette, assolutamente con filtro per la PCR
2. Guanti, Vetreria, Carta da laboratorio, Acqua distillata sterile
3. Mortai e pestelli autoclavati e sterilizzati
4. Bisturi
5. Azoto liquido
6. Porta provette
7. Provette sterili da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette sterili da 1,5 e 2 ml

Indice per autori/*Authors Index*

Anaclerio F. 567
Angelini E. 567
Antonelli M. G. 567
Barba M. 567
Bertaccini A. 461- 491
Bertazzon N. 567
Bianchedi P. 567
Bianchi G. 567
Bianco P. A. 461-491-567
Botti S. 567
Bragagna P. 567
Cardoni M. 567
Casati P. 461-491-567
Ciuffo M. 545
Costantini E. 461-491
Credi R. 567
Davino S.W. 545
De Luca E. 567
Durante G. 567
Faggioli F. 567
Ferretti L. 461-491
Gallitelli D. 545
Gambino G. 567
Gianinazzi C. 567
Gualandri V. 567
Luison D. 567
Luvisi A. 567
Malossini U. 567
Manglli A. 545
Mannini F. 567
Martini M. 461-491
Marzachì C. 461-491
Mascia T. 545
Palmano S. 461-491
Paltrinieri S. 461-491
Pasquini G. 461- 491
Riccioni L. 517
Saldarelli P. 567
Terlizzi F. 567
Tomassoli L. 545
Triolo E. 567
Trisciuzzi N. 567
Turina M. 545
Valente M.T. 517