

# ARMONIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI PER IL RILEVAMENTO DEI PRINCIPALI VIRUS DELLA VITE COPERTI DA NORME FITOSANITARIE

F. Faggioli,

F. Anaclerio, E. Angelini, M.G. Antonelli, N. Bertazzon, G. Bianchi, P. Bianchedi, P. A. Bianco, S. Botti, P. Bragagna, M. Cardoni, P. Casati, R. Credi, E. De Luca, G. Durante, C. Gianinazzi, G. Gambino, V. Gualandri, D. Luison, A. Luvisi, U. Malossini, F. Mannini, P. Saldarelli, F. Terlizzi, E. Triolo, N. Trisciuzzi, M. Barba

# MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

## DECRETO 24 giugno 2008

### Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite



GLRaV 1

GLRaV 3

GFLV

ArMV

GFkV\*

EU

GLRaV 2

GVA

GVB

Saggi biologici:

Kober 5BB

*V. vinifera* sensibile LR

L'assenza degli agenti virali sopra menzionati (..... ) deve essere verificata mediante:

**saggi sierologici (test ELISA) e test biomolecolari (PCR).**

La verifica e la veridicità dello stato sanitario dichiarato e'  
**responsabilità del costituente** e deve essere sottoscritta da  
**Istituzioni pubbliche o private** riconosciute idonee dal MiPAAF

## Gruppo di Lavoro - ARNADIA

<b>CAV - Faenza/Ampelos</b>	<b>IASMA - San Michele all'Adige</b>
<b>CNR-IVV Bari</b>	<b>IPAD - Lodi</b>
<b>CNR-IVV Grugliasco</b>	<b>UNIBO - University of Bologna</b>
<b>CRA-PAV Roma</b>	<b>UNIMI - University of Milano</b>
<b>CRA-VIT Conegliano</b>	<b>UNIFI - University of Pisa</b>
<b>CRSA - Locorotondo</b>	<b>VCR - Vivai Cooperativi Rauscedo</b>
<b>ERSA - FVG</b>	

### SS.FF.RR. Che hanno preso parte al Ring Test

**SFR Trentino (Laimburg)**  
**SFR Emilia Romagna**  
**SFR Lombardia**  
**SFR Valle d'Aosta**  
**SFR Friuli Venezia Giulia (ERSA)**

## OBIETTIVO



L'obiettivo del GdL è stato quello di produrre protocolli armonizzati e validati che potessero essere di riferimento per tutti quei laboratori che effettuano analisi diagnostici per i virus della vite. La scelta dei protocolli è stata fatta in funzione della loro affidabilità, efficienza, velocità di esecuzione, economicità e utilizzo per campioni massali

## VIRUS SELEZIONATI

GLRaV 1	}	EU	+	GLRaV 2	}	IT
GLRaV 3				GVA		
GFLV				GVB		
ArMV						
GFkV*						

## PROTOCOLLI INDIVIDUATI DA VALIDARE

**ELISA:** antisieri di tre Ditte

**RT-PCR:** multiplex per tutti e 8 i virus

## CAMPIONAMENTO

**Al fine di individuare una matrice vegetale unica per la diagnosi di tutti e 8 i virus, è stata scelto il tessuto floematico sottocorticale**

**Periodo: tutto il periodo della dormienza vegetativa**

**Origine del materiale: tralci lignificati di un anno**

**Tipologia del campione: 2 porzioni legnose raccolte nella parte basale dei tralci. I campioni legnosi devono essere integri e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o biotici**

**Conservazione del campione: Il materiale vegetale deve essere raccolto asciutto, posto in sacchetti di plastica per essere conservati a basse temperature o in un luogo fresco in modo da evitare possibili disidratazioni**

**Rintracciabilità: Ogni campione deve essere debitamente contrassegnato sulla busta e sulla pianta**

**Invio dei campioni: I campioni devono pervenire al laboratorio entro 72 ore dalla raccolta, preferibilmente in borse termiche**

## ELISA

**Antisieri di: Agritest (8), Bioreba (10), Sediag (9)**

**Viruses: GLRaV 1, 2, 3, GVA, GVB, GFLV, ArMV, GFkV, GLRaV 1+3, ArMV+ GFLV**

**I test sono stati condotti seguendo tutte le istruzioni fornite dalle Ditte per ogni singolo antisiero**

**Inoltre, sono stati eseguiti test comparativi di estrazione utilizzando i seguenti metodi:**

- 1. Uso di buste di p'lastica e omogenizzatore**
- 2. Uso di mortaio e pestello con o senza uso di azoto liquido**
- 3. Uso di macchine "fresatrici" su legno**

## SCHEMA PIASTRA ELISA

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

## MULTIPLEX RT-PCR

Ref. Gambino G. and Gribaudo I. 2006. Phytopathology 96 (11): 1223-1229

Primers: GLRaV 1, 2, 3, GVA, GVB, GFLV, ArMV, GFkV, 18S ic

**I test sono stati condotti seguendo il protocollo sopra riportata con alcune modifiche (es. ARMV primers)**

**Inoltre, anche in questo caso, sono state effettuate le seguenti prove comparative di estrazione:**

- 1. Silica extraction**
- 2. CTAB extraction**
- 3. McKenzie (1997) +KIT Commerciale (RNeasy mini plant Kit – Qiagen)**

## CAMPIONI UTILIZZATI

### Tessuto floema sottocorticale

102 campioni di riferimento

67 infetti  
(target)

35 sani  
(non target)

55 varietà

12 portainnesti

17 varietà

18 portainnesti

Inoltre sono stati testati 20 campioni "pool"  
composti da 5 piante (1 infetta + 4 sane)

# Lista dei campioni (122) e loro stato sanitario

1	GLRaV 1 + GLRaV 2 + GLRaV 3 + GVA+ GFkV	46	SANO	91	GFLV, GLRaV 3
2	GVA	47	SANO	92	GLRaV 1-3 e GVA
3	GVB	48	POOL DA 18 (ArMV)	93	GFLV
4	SANO	49	SANO	94	SANO
5	SANO	50	GLRaV 3, GFkV, GFLV	95	ArMV
6	SANO	51	SANO	96	GVA
7	GLRaV3 + GVA	52	sano	97	SANO
8	GFLV	53	POOL DA 44 (GLRaV1)	98	sano
9	GFkV	54	SANO	99	sano
10	POOL DA 42 (GLRaV1, GVA,GFLV)	55	GVA + GFkV +GLRaV-3+GLRaV2	100	SANO
11	GLRaV 3 , GFLV	56	GFLV	101	SANO
12	GVA, GLRAV1, GLRaV3	57	GLRaV3	102	GFLV – GFkV – GLRaV-3
13	ArMV, GFLV, GLRaV1	58	SANO	103	GLRaV 2 (isolato BD)
14	GLRaV-1	59	GVA+GLRaV1+GFLV	104	GFkV, GLRaV3
15	POOL DA 107 (GLRaV1)	60	sano	105	GFkV
16	sano	61	sano	106	GFkV
17	POOL DA 106 (GFKV)	62	Sano	107	GLRaV1
18	ArMV	63	GLRaV 2 + GLRaV 3 + GVA	108	GVA
19	ArMV (GRSPaV)	64	POOL DA 12 (GVA,GLRaV1-3)	109	sano
20	GVA, GRLaV2, GLRaV3	65	SANO	110	SANO
21	GLRaV-3+GVA	66	GLRaV 2, GLRaV 3 GVA	111	GLRaV 3 + GVA
22	GLRaV-1 , GFkV, GFLV	67	SANO	112	GLRaV 3, GVA, GFLV
23	SANO	68	GLRaV 2 (isolato BD)	113	GFkV
24	SANO	69	GFLV – GFkV – GLRaV-3	114	GLRaV 2 (isolato RG)
25	GVA + GFLV	70	GFLV	115	POOL DA 70 (GFLV)
26	GLRaV-1 GLRaV-3 GVA	71	GVA – GFkV – GLRaV-3	116	POOL DA 112 (GLRaV3, GVA, GFLV)
27	POOL DA 93 (GFLV)	72	GFkV+ GLRaV 2 + GLRaV 3 + GVA	117	POOL GFLV
28	GFkV	73	GFkV	118	POOL DA 72 (GFkV, GLRaV2-3,GVA)
29	sano	74	POOL DA 1 (GLRaV1-2-3,GVA,GFkV)	119	POOL DA 95 (ArMV)
30	GLRaV 3	75	ArMV, GFkV	120	POOL DA 25 (GVA,GFLV)
31	GVA	76	GLRaV2 GLRaV3	121	POOL DA 71 (GVA, GFkV,GLRaV3)
32	SANO	77	GFkV + GLRaV2	122	POOL DA 113 (GFkV)
33	sano	78	GFLV, GFkV		
34	SANO	79	GLRaV3		
35	ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV1, GVA	80	GLRaV1		
36	POOL DA 63 (GLRaV2-3, GVA)	81	SANO		
37	GLRaV 2 + GFkV	82	Sano		
38	POOL DA 66 (GLRaV2, GLRaV3,GVA)	83	SANO POOL		
39	GLRaV-1	84	SANO		
40	ArMV	85	sano		
41	GVA – GFkV – GLRaV-3	86	Sano		
42	GFLV + GLRaV1 + GVA	87	GVA, GRLaV2, GLRaV1		
43	POOL SANO	88	GLRaV2 (isolato BD)		
44	GLRaV1	89	SANO		
45	GLRaV3	90	GLRaV-1 e GVA		

Tutti i campioni sono stati analizzati in modo "anonimo"

## PARAMETRI UTILIZZATI PER LA VALIDAZIONE

UNI/CEI/EN ISO/EC 17025 and 16140 –  
EPPO – Diagnostics PM7/76 and PM7/98:

- **Sensibilità diagnostica:** capacità del metodo utilizzato di rilevare la presenza del patogeno nei campioni sicuramente infetti dal patogeno in esame;
  - **Specificità diagnostica:** capacità del metodo utilizzato di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti dal patogeno in esame;
  - **Accuratezza relativa:** il valore risultante dal calcolo della sensibilità diagnostica e della specificità diagnostica;
  - **Sensibilità analitica:** la più piccola quantità di entità infettiva che può essere identificata dal metodo diagnostico (nel caso di patogeni virali vegetali, che non possono essere quantificati *in vitro*, corrisponde alla diluizione limite dell'estratto iniziale nella quale il metodo utilizzato riesce ad individuare il patogeno);
  - **Ripetibilità o accordanza:** grado di conformità dei risultati ottenuti in repliche, effettuate a intervalli brevi di tempo, del metodo utilizzando lo stesso campione di riferimento e nelle stesse condizioni di lavoro (strumentazioni, operatore, laboratorio);
  - **Riproducibilità o concordanza:** grado di conformità dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso metodo con gli stessi campioni di riferimento in diversi laboratori.
- Tutte le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento:
- **Campioni di riferimento 'target':** campioni infetti da isolati che coprono la diversità genetica, la distribuzione geografica e le eventuali diverse specie ospiti del patogeno.
  - **Campioni di riferimento 'non target':** campioni infetti da patogeni simili che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali stesso genere), campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

# VALUTAZIONE RISULTATI ELISA

## Interpretazione delle letture dello spettrofotometro

**Background o rumore di fondo (A)** = media dei valori dell'assorbanza dei controlli negativi

**Threshold o limite soglia (B)** =  $A \times 2,5$  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:**  $\geq B$

**Campione negativo:**  $< B$

Nel caso in cui le due repliche non siano entrambe al di sopra o al di sotto della soglia B, il campione deve essere considerato dubbio e va analizzato di nuovo, utilizzando lo stesso omogenato, se conservato in frigo, entro 48 ore dalla sua preparazione, in caso contrario estratto di nuovo.

## ELISA - RISULTATI OTTENUTI

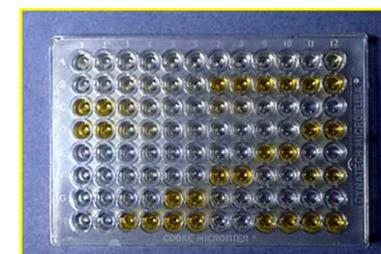
Parameter	AGRITEST							
	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GFKV	ArMV	GFLV	GVA	GVB
Sensitivity	89	86	81	85	64	75	74	86
Specificity	97	100	100	100	85	96	100	100
Accuracy	93	90	84	88	74	80	80	92
Repeatability	100	94	100	100	100	100	95	100
Reproducibility	92	88	98	92	94	87	92	100
Sensitivity pool	85	32	66	72	64	65	73	nt
Specificity pool	100	95	94	100	94	100	100	nt
Accuracy pool	89	59	75	84	81	79	81	nt
Repeatability pool	100	94	100	100	100	100	95	nt



Parameter	BIOREBA								
	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GFKV	ArMV	GFLV	GVA	GLRaV 1+3	ArMV+GFLV
Sensitivity	94	67	90	90	48	82	45	84	88
Specificity	100	100	100	100	95	92	100	100	62
Accuracy	96	77	92	92	71	84	58	90	82
Repeatability	100	92	100	100	100	100	100	100	100
Reproducibility	91	82	91	86	93	91	73	92	93
Sensitivity pool	61	38	97	47	42	90	30	81	79
Specificity pool	100	100	100	100	100	93	75	94	62
Accuracy pool	73	64	98	70	76	91	43	85	73
Repeatability pool	100	86	94	100	100	86	86	100	86



Parameter	SEDIAG							
	GLRaV1	GLRaV2	GLRaV3	GFKV	ArMV	GFLV	GVA	ArMV+GFLV
Sensitivity	96	87	97	30	50	77	87	67
Specificity	100	100	100	100	96	92	96	67
Accuracy	98	91	97	46	72	81	89	67
Repeatability	100	92	100	95	100	100	100	96
Reproducibility*	92	82	92	88	96	91	88	74
Sensitivity pool	77	21	100	42	43	79	82	47
Specificity pool	100	95	93	100	97	94	100	67
Accuracy pool	84	53	98	67	74	85	87	53
Repeatability pool	100	92	100	95	100	100	100	83



## ELISA – Analisi risultati in funzione di:

### Estrazione

**Estrazione 1:** Mortaio con o senza azoto liquido

**Estrazione 2:** Fresa

**Estrazione 3:** Bustine e pressa

Estrazione 3, principalmente per i virus GFLV e ArMV ha dato sempre valori di accuratezza di 5-8 punti percentuali più bassi rispetto alle estrazioni 1 e 2 che si sono rivelate equivalenti.

### Tempi di lettura dei risultati

Non è stato possibile stabilire un tempo di lettura ottimale né in funzione del virus né in funzione dell'antisiero. Questo parametro sembra essere esclusivamente dipendente dalle condizioni del laboratorio.

## Portainnesti

Nessuna differenza evidenziata per i virus GLRaV 1, 2, 3 e GFkV. Piccole e non sempre statisticamente rilevanti differenze (in negativo) per i virus ArMV, GVA e GFLV. Nessuna influenza degli antisieri

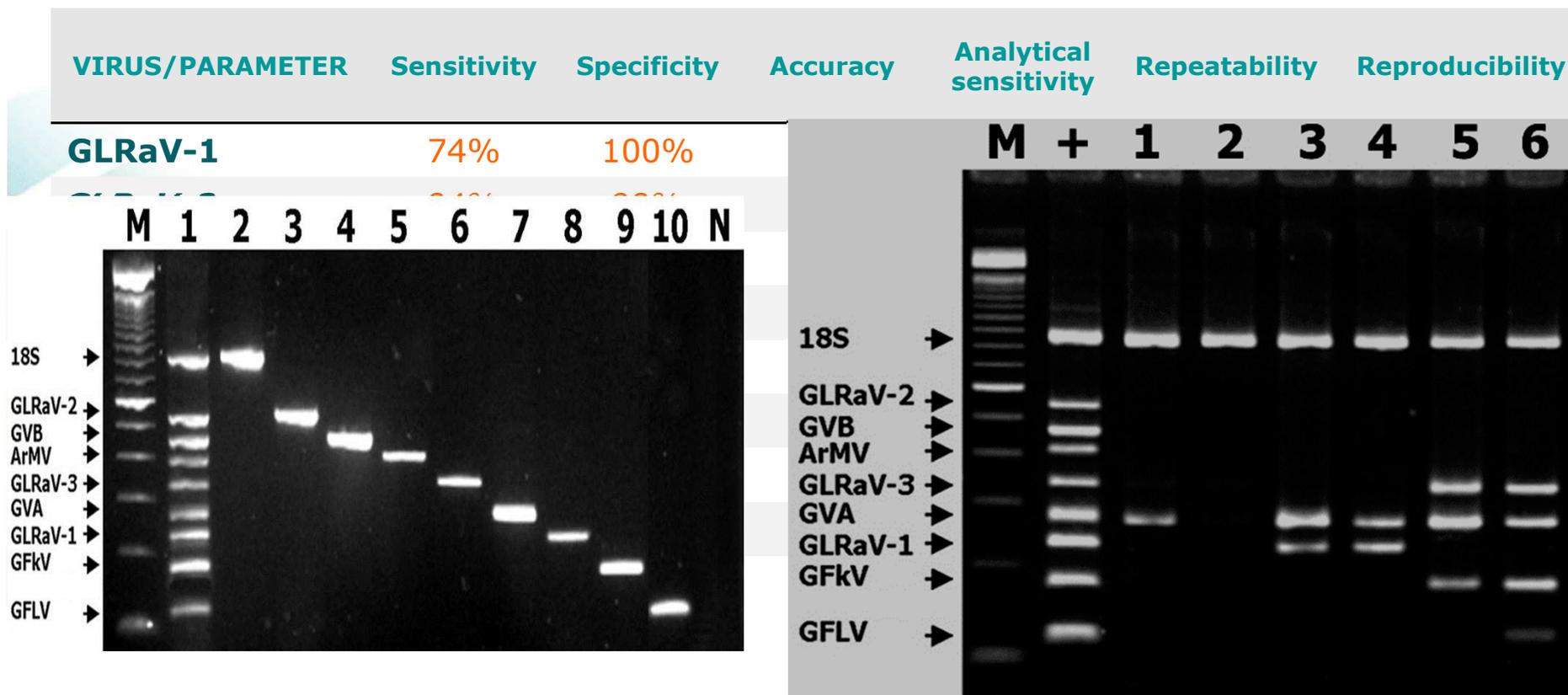
## Campioni pool

In linea di massima buoni risultati dai campioni pool. Sicuramente l'accuratezza è risultata essere inferiore (di 10-15 punti percentuali) per i virus GLRaV 1 e GLRaV 2 e GFkV rispetto ai campioni singoli. Nessuna differenza statisticamente significativa per gli altri.

## Confronto antisieri

Gli antisieri delle tre ditte si sono comportati in modo pressoché equivalente nella diagnosi dei virus GLRaV 1, 2, 3, GFLV, ArMV. E' risultato meno valido l'antisiero GFkV della Sediag e quello anti GVA della Bioreba. Buono, comparabile con i singoli, l'antisiero misto GLRaV 1+3 della Bioreba. Per gli antisieri misti ArMV e GFLV quello Bioreba accuratezza 82% quello Sediag 67%

## MULTIPLEX RT-PCR - RISULTATI OTTENUTI



# MULTIPLEX RT-PCR

## Analisi risultati in funzione di:

### Metodi di estrazione

**Method 1:** Silica extraction

**Method 2:** CTAB extraction

**Method 3:** McKenzie (1997) + KIT Commerciale (RNeasy mini plant Kit – Qiagen)

I tre metodi hanno dato risultati equivalenti tra di loro, si consiglia l'utilizzo del metodo 3 in quanto prevede l'utilizzo di un kit commerciale, che fornisce maggiori garanzie circa la standardizzazione della metodologia

## Uso o meno del controllo interno e del passaggio con DNasi

Sono state eseguite prove comparative con e senza l'utilizzo del controllo interno. Dati statisticamente rilevanti sono stati ottenuti quanto riguarda la diagnosi di GLRaV 1, che sembra essere molto penalizzata dall'uso del C.I. Stessi risultati (maggiore sensibilità in generale e per GLRaV 1 in particolare) quando è stato omesso il passaggio con DNasi.

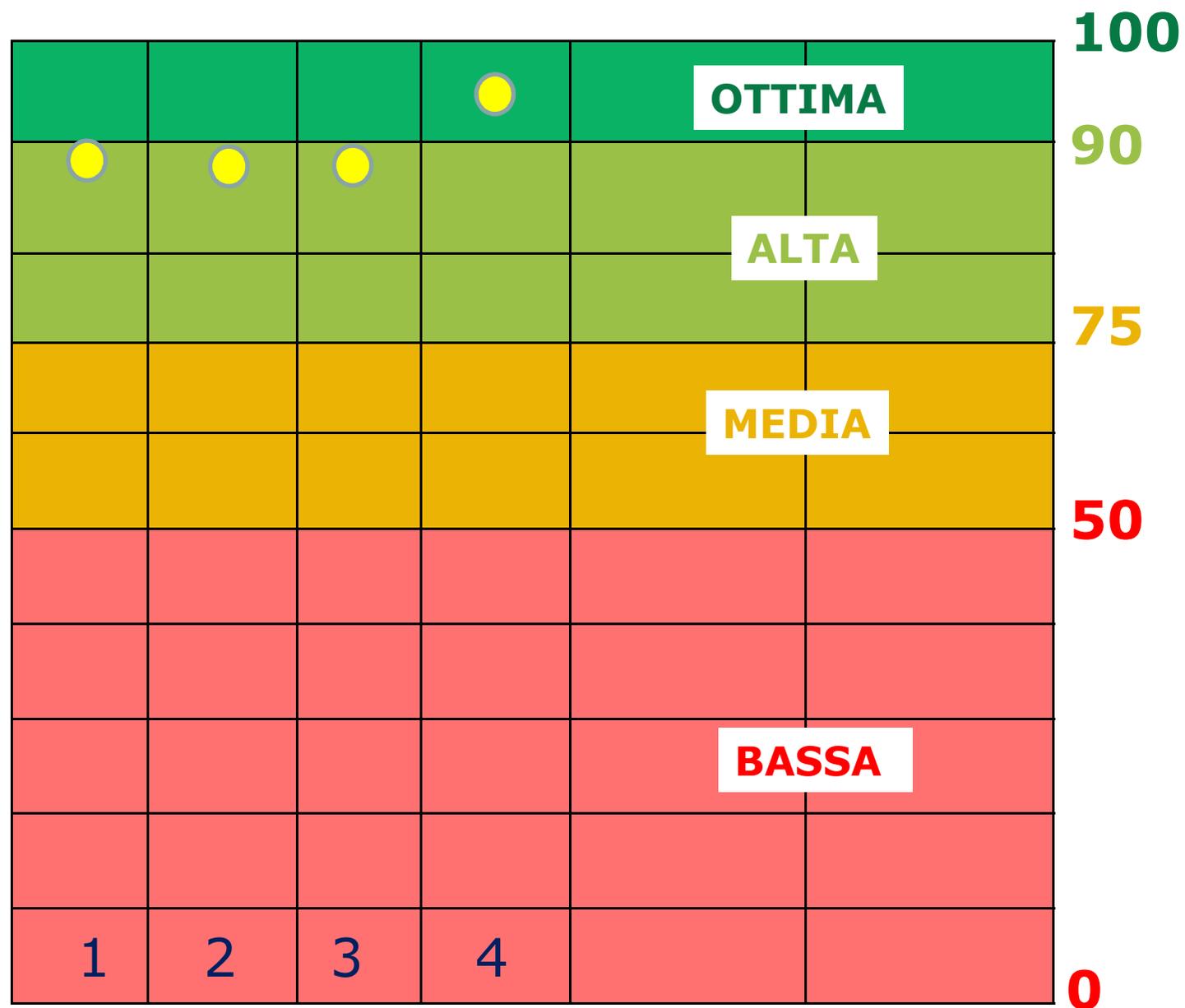
## Utilizzo di uniplex RT-PCR vs multiplex

Sono state eseguite prove comparative per mezzo di uso di analisi in singolo, degli stessi campioni analizzati in multiplex. I risultati hanno messo in evidenza una maggiore sensibilità della uniplex per GLRaV 1 (statisticamente rilevante) e GLRaV 2 (differenze basse, difficili da valutare). Nessuna differenza per gli altri virus (con qualsiasi coppia di primers utilizzata).

# MOLECOLARE vs ELISA

Virus	Diagnostic protocol	Sensitivity	Specificity	Accuracy	Analytical sensitivity	Repeatability	Reproducibility
ArMV	Multiplex RT-PCR	92 %	99 %	98 %	10 <sup>-2</sup>	100%	100 %
	ELISA - A/B/S	64/48/50%	85/95/96%	74/72/72%	10 <sup>-2</sup>	100%	95%
GFLV	Multiplex RT-PCR/	68 %	100%	90 %	10 <sup>-3</sup>	100%	76%
	ELISA - A/B/S	75/82/77%	96/92/92%	80/84/81%	10 <sup>-2</sup>	100%	90%
GFkV	Multiplex RT-PCR	95%	95%	95%	10 <sup>-2</sup>	100%	95%
	ELISA - A/B/S	90/90/30%	100%	92/92/46%	10 <sup>-1</sup>	98%	88%
GVA	Multiplex RT-PCR	96 %	99 %	98 %	10 <sup>-2</sup>	100%	94 %
	ELISA - A/B/S	77/45/87%	100/100/96%	83/58/89%	10 <sup>-1</sup>	98%	82%
GVB	Multiplex RT-PCR	100%	100%	100%	10 <sup>-2</sup>	100%	100%
	ELISA - A/B/S	86%	100%	92%	10 <sup>0</sup> (2 <sup>-2</sup> )	100%	85%
GLRaV 1	Multiplex RT-PCR	74 %	100 %	94 %	10 <sup>-2</sup>	100%	70 %
	ELISA - A/B/S	89/94/96%	100%	93/96/98%	10 <sup>-2</sup>	100%	92%
GLRaV 2	Multiplex RT-PCR	84%	98%	85%	10 <sup>-2</sup>	95%	83%
	ELISA - A/B/S	86/67/87%	100%	93/96/98%	10 <sup>0</sup> (2 <sup>-2</sup> )	93%	84%
GLRaV 3	Multiplex RT-PCR	100 %	93 %	95 %	10 <sup>-3</sup>	100%	100 %
	ELISA - A/B/S	81/90/97%	100%	84/92/97%	10 <sup>-3</sup>	100%	94%
ELISA		81/75/77%	98/99/97%	87/86/86	10 <sup>-1</sup>	99%	89%
MULTIPLEX RT-PCR		89%	98%	95%	10 <sup>-2</sup>	100%	90%

# ARNADIA: Grapevine-RING TEST- ACCURATEZZA



1:ELISA-A; 2:ELISA-B; 3:ELISA-S; 4:multiplex RT-PCR

## MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE ALIMENTARI E FORESTALI

DECRETO 13 dicembre 2011.

**Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite, ai sensi del decreto 7 luglio 2006, allegato I.**

c) «Servizio di controllo»: il Centro di ricerca per la viticoltura - CRA-VIT di Conegliano per i materiali di moltiplicazione delle categorie «Iniziale» e di «Base», i competenti uffici regionali per i materiali della categoria «Certificato» e «Standard»;

d) «Campione pool»: campione multiplo costituito da materiali prelevati da non più di cinque piante, se non diversamente specificato;

e) «Responsabile del campo»: il titolare o il rappresentante della ditta vivaistica che presenta la denuncia di produzione;

f) «Costitutore» o «Proponente»: si intendono, ai fini del presente decreto, i responsabili dell'identità varietale e clonale nonché dello stato sanitario dei materiali di moltiplicazione delle categorie «Iniziale» e «Base» delle varietà e cloni da loro costituiti.

Art. 3.

### *Metodi di campionamento e di analisi*

1. Le attività di campionamento e di analisi svolte ai fini dei controlli ufficiali oggetto del presente decreto sono conformi a quanto di seguito specificato.

2. Le analisi di laboratorio finalizzate ai controlli ufficiali per la ricerca dei virus indicati all'allegato I del decreto ministeriale 7 luglio 2006, devono seguire il protocollo di analisi riportato all'allegato 1 del presente decreto.

3. Eventuali modifiche o integrazioni agli allegati tecnici al presente decreto sono adottate mediante nota tecnica del responsabile del Servizio fitosanitario centrale, sentita l'Unità nazionale di coordinamento.

### METODICA DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI

#### PARTE I Campionamento

Per la diagnosi dei cinque virus della vite previsti dalla certificazione 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 almeno una porzione legnosa lunga circa 60 cm 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.

#### PARTE II Saggio sierologico ELISA - Modalità generali

L'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.

*Strumentazione, materiali e reagenti necessari.*

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 novantasei 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).

L'efficienza del saggio riportata dalla ditta produttrice è correlata ai test di qualità effettuati nelle condizioni di lavoro espressamente riportate nel foglietto di istruzioni.

Seguire, quindi, attentamente 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.

*Preparazione del saggio ELISA.*

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra (allegato 1), in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni piastra è possibile caricare quarantuno campioni più un controllo sano, uno infetto ed un bianco secondo lo schema allegato.

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 tamponi 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 (evidenziati in grigio nell'allegato 1) 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.

*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.

È 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.

**INTERPRETAZIONE DELLE LETTURE CON FOTOMETRO**

*Background o rumore di fondo (A)* = media dei valori dell'assorbanza dei controlli negativi

*Threshold o limite soglia (B)* =  $A \times 2,5$  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:*  $\geq B$

*Campione negativo:*  $< B$

Nel caso in cui le due repliche non siano entrambe al di sopra o al di sotto della soglia B, il campione deve essere considerato dubbio e va analizzato di nuovo, utilizzando lo stesso omogenato, se conservato in frigo, entro 48 ore dalla sua preparazione, in caso contrario estratto di nuovo.

**Parte IX Schema ELISA diretta o indiretta**

DATA: \_\_\_\_\_

VIRUS: \_\_\_\_\_ CAMPIONE: \_\_\_\_\_

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

## REFERENCE SAMPLES COLLECTION

Ref.	Variety/origin	Sanitary status	Ref.	Variety/origin	Sanitary status
1	Sagrantino	GLRaV 1	24	Piedirosso 4-19-019	sano
2	Sagrantino	GLRaV 3	25	Piedirosso 4-19-034	sano
3	P4/K-S	sano	26	Scimiscià	GLRaV 1
4	P6/K-S	sano	27	Pecorello	GLRaV 2
5	Pinot nero	GLRaV 1	28	Berla Grossa	ArMV
6	Gold Traminer	GLRaV 3	29	Nebbiolo 185	GfKv
7	Gold Traminer	GFLV	30	Moscato 30	GVA
8	Traminer 921 vm	GFLV	31	Albarossa	GVB
9	Pinot nero 189	ArMV	32	varietà europea	GLRav 1, GFLV, ArMV
10	Muller Th. 8013	ArMV	33	Riesling	ArMV, GfKv
11	Traminer 920 vm	GFLV	34	Sangiovese Ceppo G2	GfKv
12	1103 Paulsen P.38	sano	35	Neg 8	sano
13	Pizzutella 2	GVA, GfKv, GLRaV 3	36	Neg 13	sano
14	161/049	GfKv	37	2/9/4 riparia Scribner	GLRaV 2, GLRaV3, GVA
15	157/11	GfKv	38	142/19/4 Terra Promessa	GLRav 1, GFLV, GVA
16	camp. 31637	GVB	39	145/20/3 Red Globe	GLRaV 2
17	camp. 31635	GVB	40	151/14/5 Cereza	GLRaV 3, GVA
20	85 ALB 027	GLRaV 2	41	1/7/2 Riparia Baron	GFLV
21	66 MLI 63 P8	GLRaV 2	42	152/11/2 Corazon de Angel	GVA
22	ELISA 17/2007	GLRaV 3, GVA, GVB	43	4/9/2 Vitis Coignetiae	GLRaV 2, GfKv
23	ELISA 28/2007	GLRaV 3, GVA, GVB	44	147/19/1 Madelaine Vialette	GLRaV 3

## CONCLUSIONI

- Per la prima volta sono disponibili protocolli diagnostici armonizzati e validati per i principali virus della vite
- L'efficienza e l'affidabilità dei protocolli è stata dimostrata utilizzando un gran numero di campioni in un elevato numero di laboratori
- Per la prima volta è stata costituita una collezione di campioni di riferimento (target e non target)
- L'uso di questi protocolli diagnostici consentirà il miglioramento e l'omogeneità della qualità sanitaria del germoplasma viticolo



Francesco Faggioli

e-mail: [francesco.faggioli@entecra.it](mailto:francesco.faggioli@entecra.it)

***CRA - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale***