

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 17

Protocollo diagnostico per l'identificazione di grapevine pinot gris virus

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GdL Laboratori	CFN 28/06/2022	29/09/2022	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 2 di 16

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Grapevine pinot gris virus.....	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 3 di 16

PREMESSA

Il Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio del 26 ottobre 2016 relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, definisce il quadro normativo europeo di riferimento per la protezione delle piante.

Il presente documento si applica per quanto concerne la protezione delle piante.

Secondo quanto definito dal Regolamento (UE) 2017/625, le autorità competenti designano laboratori ufficiali cui far effettuare analisi, prove e diagnosi di laboratorio a partire da campioni prelevati durante i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali nello Stato membro nel cui territorio operano tali autorità competenti.

I laboratori ufficiali devono possedere competenze, attrezzature, infrastrutture e personale adeguati ad eseguire i compiti a loro assegnati e devono impiegare metodi analitici, di prova e diagnostici conformi ai più avanzati standard scientifici e tali da garantire risultati solidi, affidabili e comparabili in tutta l'Unione. La scelta dei metodi analitici, di prova e diagnostici risulta quindi fondamentale al fine di garantire l'impiego della migliore pratica per l'individuazione dell'organismo target soprattutto quando esistono metodi diversi raccomandati da varie fonti. I laboratori devono, ove possibile, utilizzare metodi definiti da Norme, Regole Tecniche o Metodi ufficiali in vigore. Tali metodi devono essere caratterizzati dai criteri previsti dall'allegato III del Regolamento (UE) 2017/625.

Secondo quanto definito dal Regolamento (UE) 2017/625, i laboratori ufficiali devono pertanto essere accreditati per l'utilizzo di questi metodi secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura".

In tale contesto, i laboratori di riferimento dell'Unione europea dovrebbero garantire che i laboratori nazionali di riferimento e i laboratori ufficiali dispongano di informazioni aggiornate sui metodi disponibili, organizzare o partecipare attivamente alle prove comparative interlaboratorio e offrire corsi di formazione per i laboratori nazionali di riferimento o i laboratori ufficiali.

Secondo quanto definito all'articolo 8 e dall'articolo 13 del Decreto legislativo n. 19 del 2 febbraio 2021, il CREA-DC, Istituto di riferimento nazionale per la protezione delle piante (anche designato con Decreto n. 0677268 del 24 dicembre 2021 quale Laboratorio Nazionale di Riferimento per la Virologia, Batteriologia, Micologia, Nematologia, Entomologia agraria e Acarologia), ha numerosi compiti, tra i quali la messa a punto e la validazione di metodi analitici, di prova e diagnostici per l'identificazione sia di organismi nocivi da quarantena sia di organismi nocivi regolamentati non da quarantena (RNQP). La validazione dei metodi analitici, di prova e diagnostici non normalizzati rappresenta uno dei requisiti fondamentali ai fini dell'accREDITAMENTO secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

In accordo con le "Prescrizioni per l'accREDITAMENTO dei laboratori di prova" (RT-08), i metodi validati da Laboratori/Centri di Riferimento Nazionali o Comunitari accREDITATI o da Centri di

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 4 di 16

Referenza Nazionali accreditati e riconosciuti dall'Autorità centrale, possono essere utilizzati da altri Laboratori senza ulteriore validazione purché:

- tali metodi rientrino nello scopo di accreditamento del Laboratorio che li ha validati;
- contengano almeno i limiti di ripetibilità e riproducibilità;
- siano messi a disposizione dal Laboratorio di riferimento, nella versione in vigore, corredati dalla dichiarazione di validazione;
- la dichiarazione di validazione del Laboratorio di riferimento sia aggiornata (data di emissione non superiore a 3 anni);
- il Laboratorio che li applica abbia verificato di saperli eseguire nel proprio Laboratorio ottenendo risultati rientranti nei limiti definiti dal metodo (dati di precisione);
- il Laboratorio che li applica abbia verificato che le caratteristiche prestazionali che dipendono dal Laboratorio e non dal metodo (come ad es. quelle che dipendono dal tipo e condizione dell'apparecchiatura che il Laboratorio utilizza, abilità del personale autorizzato ad eseguire la prova, condizioni ambientali del Laboratorio, qualità dei reattivi e materiali che il Laboratorio utilizza, procedura di prova definita dal Laboratorio) siano compatibili con quelle ottenute durante la validazione del metodo.

In applicazione dell'articolo 6 del decreto 12 aprile 2022 il presente protocollo costituisce metodo diagnostico ufficiale del Servizio Fitosanitario Nazionale.

RIFERIMENTI NORMATIVI

Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio del 26 ottobre 2016 relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio.

Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali) che prevede che gli Stati Membri designino uno o più laboratori nazionali di riferimento per ogni laboratorio di riferimento dell'Unione europea designato a norma dell'articolo 93, paragrafo 1.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 5 di 16

Regolamento di esecuzione (UE) 2019/530 della Commissione del 27 marzo 2019 che designa laboratori di riferimento dell'Unione europea per le categorie di organismi nocivi per le piante insetti e acari, nematodi, batteri, funghi e oomiceti, e virus, viroidi e fitoplasmi.

Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072 della Commissione del 28 novembre 2019 che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione

Regolamento delegato UE 2021/1353 della Commissione del 17 maggio 2021 che integra il regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i casi e le condizioni in cui le autorità competenti possono designare laboratori ufficiali che non soddisfano le condizioni per tutti i metodi da essi impiegati per i controlli ufficiali o le altre attività ufficiali.

Decreto legislativo n. 19 del 2 febbraio 2021. Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del Regolamento (UE) 2016/2031 e del Regolamento (UE) 2017/625.

Decreto Ministeriale 24 dicembre 2021. Designazione di Laboratori nazionali di riferimento in applicazione dell'articolo 13, comma 1, del Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.

Decreto Ministeriale 12 aprile 2022. Caratteristiche, ambiti di competenza, strutture e modalità di riconoscimento dei laboratori che operano nell'ambito della protezione delle piante.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 6 di 16

Grapevine pinot gris virus

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome (acronimo)	Grapevine pinot gris virus (GPGV)
Tassonomia	Ordine: <i>Tymovirales</i> Famiglia: <i>Betaflexiviridae</i> Genere: <i>Trichovirus</i>
Avversità causata	Malattia del Pinot Gris (complesso dei sintomi di maculatura e deformazioni fogliari della vite)

1. Protocollo diagnostico del GPGV

Il protocollo per la diagnosi e il rilevamento del GPGV è basato sui seguenti metodi di prova.

- RT-PCR: come da protocollo di Glasa., *et.al* 2014. (Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. Arch. Virol. 159:2103).
Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina di movimento.
- RT-PCR: come da protocollo di Saldarelli *et al.* 2015. (Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. Phytopathology, Vol 105, n. 4 2015).
Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina capsidica.
- Real time RT-PCR: come da protocollo di Bianchi, *et al.*, 2015 (Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. EPPO Bulletin, 45(1): p. 22-32).
Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina di movimento.
- Real time RT-PCR: come da protocollo di Ratti *et al.*, 2015 (comunicazione personale).
Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica che comprende parte di quella codificante per la proteina di movimento e parte di quella per la proteina capsidica

2. Estrazione dell'RNA totale

La fase iniziale di preparazione (polverizzazione o macerazione) del campione si può eseguire sia con utilizzo di azoto in mortai e pestelli sterili, sia senza l'utilizzo di azoto tramite triturazione in bustine da estrazione e una testa rotante oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser'). Il campione può essere composto da tralci lignificati tuttavia è

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 7 di 16

possibile anche utilizzare foglie prelevate durante il periodo di massima espressione dei sintomi.

Per la diagnosi di GPGV possono essere seguiti entrambi i protocolli di estrazione di seguito descritti, basati sull'utilizzo di due diversi kit commerciali, associati ad un primo passaggio di incubazione con tampone MacKenzie, descritto in tabella 1.

Tabella 1. Tampone MacKenzie pH 5 (per 1 litro di tampone)

Tampone di estrazione PO₄	portare ad 1 L con acqua distillata
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 pH5 e autoclavare.

I dati di validazione ottenuti con i metodi RT-PCR e real time RT-PCR non hanno mostrato differenze rilevanti tra i due kit utilizzati.

2.1 Estrazione con kit commerciale Qiagen + Tampone MacKenzie

- Pesare 0,25 g di tessuto floematico.
- Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello sterilizzati in autoclave (Conservare a $-20^{\circ}\text{C} \pm 3$ o procedere al punto 4), oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser').
- Aggiungere 1,7 mL di tampone MacKenzie con 0,034 g/campione di sodio metabisolfito (2% finale) e mescolare.
- Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12.000 rpm per 6 minuti.
- Trasferire 1 mL di surnatante in eppendorf da 1,5 mL aiutandosi con un puntale cui è stata tagliata 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 nella prima colonnina del kit (VIOLA) fino al segno limite.
- Centrifugare a 12.000 rpm per 2 minuti.
- Prelevare il percolato senza toccare il pellet, trasferirlo in una nuova provetta eppendorf. Ripetere dal punto 9 al punto 11 per la restante soluzione.
- Aggiungere 500 µL di Et-OH assoluto freddo e mescolare delicatamente con la pipetta.
- Versare 700 µL della soluzione con etanolo nella seconda colonnina del kit (ROSA).
- Centrifugare a 10.000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Aggiungere 700 µL di tampone RW1 a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10.000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Aggiungere 500 µL di tampone RPE (già addizionato di Et-OH) a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10.000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Ripetere il passaggio centrifugando a 10.000 rpm per 2 minuti. Eliminare l'eluato.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 8 di 16

- 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 (volume finale 100 µL).
- Centrifugare a 10.000 rpm per 1 minuto.
- Eliminare la colonnina e mettere 15-20 minuti a -80°C prima di usare.
- Conservare a -20°C ± 3 o -80°C ± 3.

2.2 Estrazione con kit commerciale SIGMA + Tampone MacKenzie

- Pesare 0,25 g di tessuto floematico.
- Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello sterilizzati in autoclave. (Conservare a -20°C ± 3 o procedere al punto 4), oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser').
- Aggiungere 1,7 mL di tampone MacKenzie con 0,034 g/campione di sodio metabisolfito (2% finale) e mescolare.
- Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12.000 rpm per 6 minuti.
- 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% a ogni provetta.
- Incubare a 70°C ± 3 per 10 minuti agitando periodicamente i tubi.
- Centrifugare 5 minuti a 13.000 rpm.
- Trasferire il surnatante, facendo attenzione ai detriti cellulari, nelle Filtration column (anello blu) collocate nei tubi da 2 mL.
- Centrifugare 5 minuti a 13.000 rpm.
- Buttare la colonnina e aggiungere nel lisato 350 µL di etanolo al 70% e miscelare bene pipettando 4-5 volte.
- Trasferire 700 µL di soluzione nelle Binding column (anello rosso) collocate nei tubi da 2 mL e centrifugare per 1 minuto a 13.000 rpm.
- Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, riposizionare la colonna e ripetere finché tutta la soluzione (punto 9) non sia stata caricata sulla colonnina.
- Aggiungere 500 µL di Washing solution 1 e centrifugare 1 minuto a 13.000 rpm.
- Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, aggiungere 500 µL di Washing solution 2 (diluito con etanolo) e centrifugare 30 secondi a 13.000 rpm, ripetere il passaggio centrifugando 1 minuto.
- Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, aggiungere 500 µL di Washing solution 2 e centrifugare 1 minuto a 13.000 rpm.
- Scartare il liquido raccolto.
- Centrifugare 1 minuto a 13.000 rpm.
- Trasferire la colonnina in un nuovo tubo da 2 mL e aggiungere 50 µL di Elution solution e centrifugare 1 minuto a 13.000 rpm. Ripetere con esso il passaggio di eluizione con altri 50 µL di Elution solution.
- Conservare a -20°C ± 3 o -80°C ± 3.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 9 di 16

3. Metodo di prova RT-PCR

I metodi di prova basati su RT-PCR (Glasa *et al.* 2014; Saldarelli *et al.* 2015) prevedono una fase preliminare, comune ad entrambi, di sintesi del cDNA mediante retrotrascrizione dell'RNA estratto.

3.1 Sintesi cDNA

Per la sintesi del cDNA procedere come di seguito descritto.

- Preparare la miscela di reazione Mix RT-1 per ogni campione da saggiare più un controllo positivo, uno negativo e il controllo acqua come descritto nella tabella 2.

Tabella 2. Miscela di reazione Mix RT-1

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dNTP 10 μM (2,5 mM each)	1	0,5 mM
Random primers 50 μM	1	2,5 μM
H ₂ O sterile	5	-
Totale	7	

- Dispensare 7 μL della mix RT-1 nei tubi precedentemente siglati.
- Caricare 5 μL di estratto di RNA totale in ogni tubo (equivalente a circa 1 ng di RNA).
- Incubare in termociclatore a 95°C per 5 minuti, quindi trasferire i campioni in ghiaccio.
- Preparare la miscela di reazione Mix RT-2 per ogni campione da saggiare più un controllo positivo, uno negativo e il controllo acqua come descritto nella tabella 3.

Tabella 3. Miscela di reazione Mix RT-2

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
First strand buffer	4	1X
DTT	2	10 mM
RNase-inhibitor	1	40 U
M-ML	1	10 U
Totale mix RT-2	8	

- Aggiungere 8 μL di Mix RT-2 ai 12 μL alla Mix RT-1.
- Incubare a 42°C \pm 3 per 1 h e 70°C \pm 3 per 15 minuti, quindi trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20°C \pm 3.

3.2 Metodo di prova RT-PCR (Glasa *et al.*, 2014)

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione sono stati disegnati sul gene MP e le relative sequenze sono riportate in tabella 4.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 10 di 16

Tabella 4. Primers utilizzati per la reazione di amplificazione (Glasa *et al.*, 2014)

GPG-5637F	5'-ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG-3'
GPG-5939R	5'-CTGAGAAGCATTGTCCCATC-3'

Esecuzione del metodo

- Preparare la seguente miscela di reazione per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua.

Tabella 5. Miscela di reazione PCR (Glasa *et al.* 2014)

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O sterile	15,65	-
Buffer	2,75	1X
MgCl ₂	1,60	3,2 mM
dNTPs	0,75	0,3 mM
primer F GPGV-5637F	1	0,4 mM
primer R GPGV-5939R	1	0,4 mM
Platinum Taq Polimerasi	0,25	2,5 U
cDNA	2	-
Totale	25	

- Dispensare 23 µL di reazione in tubi di PCR precedentemente siglati e caricare in ogni tubo 2 µL di cDNA.
- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 6.

Tabella 6. Ciclo termico di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5'	1
Denaturazione	94°C	20''	} 35
Annealing	56°C	20''	
Estensione	72°C	30''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Hold	10°C	10'	1

3.3 Metodo di prova RT-PCR (Saldarelli *et al.*, 2015)

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione sono stati disegnati sul gene MP-CP e le relative sequenze sono riportate in tabella 7.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 11 di 16

Tabella 7. Primers utilizzati per la reazione di amplificazione (Saldarelli *et al.*, 2015)

GPGV detforward	5' TGGTCTGCAGCCAGGGGACA 3'
GPGV detreverse	5' TCACGACCGGCAGGGAAGGA 3'

Esecuzione del metodo

- Preparare la miscela di reazione come indicato in tabella 8 per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua.

Tabella 8. Miscela di reazione PCR (Saldarelli *et al.* 2014)

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O sterile	17,05	-
10X Buffer	2,75	1X
MgCl ₂	1,60	3,2 mM
dNTPs	0,75	0,3 mM
primer F GPGV detforward	0,30	0,12 µM
primer R GPGV detreverse	0,30	0,12 µM
Platinum Taq Polimerasi	0,25	2,5 U
cDNA	2	-
Totale	25	

- Dispensare 23 µL di reazione in tubi di PCR precedentemente siglati e caricare in ogni tubo 2 µL di cDNA.
- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 9

Tabella 9. Ciclo termico di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	2'	1
Denaturazione	94°C	30''	} 35
Annealing	60°C	40''	
Estensione	72°C	45''	
Estensione finale	72°C	7'	1
Hold	16°C	16'	1

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 12 di 16

3.4 Elettroforesi su gel di agarosio per la visualizzazione dei prodotti ottenuti con i metodi RT-PCR (Glasa *et al.*, 2014 e Saldarelli *et al.*, 2015)

Preparare un gel di agarosio 1,2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 10 µL di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 2 µL di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 60 minuti.

3.5 Valutazione dei risultati per i metodi di prova RT-PCR (Glasa *et al.*, 2014 e Saldarelli *et al.*, 2015)

Il saggio diagnostico è da considerarsi attendibile se si verificano le seguenti condizioni:

- Il controllo positivo presenta la banda attesa
- Il controllo negativo ed il controllo bianco (acqua) non presentano alcuna banda di amplificazione.

Qualora siano soddisfatte le suddette condizione, il campione si considera:

- positivo, se presenta una sola banda che avrà migrato alla stessa altezza del controllo positivo, ovvero che risulti di circa 302 bp per il metodo di prova RT-PCR (Glasa *et al.*, 2014), e di circa 588 bp per il metodo di prova RT-PCR (Saldarelli *et al.*, 2015), in corrispondenza della banda di riferimento del marker.
- negativo, se non presenta alcuna banda di amplificazione La presenza di altre bande più deboli a varie altezze indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

4. Metodo di prova Real Time RT-PCR

4.1 Metodo di prova Real Time RT-PCR (Bianchi *et al.*, 2015)

Le sequenze dei primers e della sonda Taqman utilizzate nella reazione di amplificazione sono stati disegnati sul gene CP e le relative sequenze sono riportate in tabella 10.

Tabella 10. Primers e sonda Taqman utilizzati per la reazione di amplificazione

GPgV504F 20	5'GAATCGCTTGCTTTTTTCATG 3'
GPgV588R 22	5'CTACATACTAAATGCACTCTCC 3'
GPGV CP542 24	5'[FAM] -AGACTAATGCTATCACGGCTTCGG-[BHQ2] 3'*

* la sonda marcata FAM va utilizzata necessariamente con gli strumenti che richiedono il Rox.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 13 di 16

Esecuzione del metodo

- Preparare la miscela di reazione per ogni campione e aggiungere un controllo positivo, tre controlli negativi ed il bianco (acqua) secondo quanto riportate nella tabella 11.

Tabella 11. Miscela per la reazione Real Time RT-PCR

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNase free	4,75	-
Quanti Fast probe RT PCR Master Mix **	12,5	1X
Quanti Fast RT Mix	0,25	1X
Forward primer	1	0,4 μM
Reverse primer	1	0,4 μM
Taqman probe	0,5	0,1 μM
RNA	5	-
Totale	25	

** La quantità di Rox da inserire nella Master mix va verificata in funzione del termociclatore di real time che si utilizza (vedi tabella manuale Qiagen). Nel caso in cui lo strumento in dotazione richieda un'alta quantità di Rox, è necessario acquistare la Quanti Fast Probe RT-PCR Master Mix (cod. 204454 Qiagen) che contiene già il Rox nel quantitativo necessario a tali strumenti.

- Dispensare 20 μL di reazione in tubi per PCR o nei pozzetti di piastre per real time PCR e caricare 5 μL di RNA per campione.
- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 12.

Tabella 12. Ciclo termico di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione	50°C	30'	1
Denaturazione iniziale	95°C	5'	1
Denaturazione	95°C	5''	} 45
Annealing	60°C	30''	
Hold	60°C	30''	1

4.2 Metodo di prova Real Time RT-PCR (Ratti *et al.*, 2015)

Le sequenze dei primers e della sonda Taqman utilizzate nella reazione di amplificazione sono stati disegnati sui geni MP e CP e le relative sequenze sono riportate in tabella 13.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 14 di 16

Tabella 13. Primers e sonda Taqman utilizzati per la reazione di amplificazione

GPGVTaqF	5'CATTTCTGTGAGGATAGGTGTCATG 3'
GPGVTaqR	5'CAGACATAAGTGAACGGCCAATAT 3'
Sonda GPGV	5'[FAM]-AGGCCTTTCAATTCA-[MGB] 3'

Tabella 14. Miscela per la reazione Real Time RT-PC

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNase free	3,03	
GoTaq [®] Probe qPCR Master Mix***	12,5	1X
Forward primer	2	0,8 μM
Reverse primer	2	0,8 μM
Taqman probe	0,47	0,075 μM
M-MLV (1:50) [#]	4	16 U
RNA target	4	
Totale	28	

*** Aggiungere alla master mix il giusto quantitativo di Reference dye (CXR) in base al modello di termociclatore che utilizzate (vedi manuale Promega).

[#] L'enzima viene fornito alla concentrazione di 200U/ μL e deve essere quindi diluito 50 volte per ottenere la concentrazione iniziale di utilizzo. La diluizione deve essere effettuata per ogni analisi in quanto non è consigliato stoccare l'enzima diluito a -20°C.

Esecuzione del metodo

- Preparare la miscela di reazione per ogni campione e aggiungere un controllo positivo, tre controlli negativi ed il bianco (acqua) secondo quanto riportate nella tabella 14.
- Dispensare 24 μL di reazione in tubi per PCR o nei pozzetti di piastre per real time PCR e caricare 4 μL di RNA per campione.
- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 15.

Tabella 15. Ciclo termico di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione	48°C	30'	1
Denaturazione iniziale	95°C	10'	1
Denaturazione	95°C	15''	} 40
Annealing	60°C	60''	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 15 di 16

4.3 Valutazione dei risultati per i metodi di prova Real Time RT-PCR (Bianchi *et al.*, 2015 e Ratti *et al.*, 2015)

Risulta necessario determinare il valore del *Ct* soglia (*cut-off*) sulla base di una prova preliminare, consistente nell'analisi di diluizioni seriali (almeno 5) di un campione positivo in cui, per ogni diluizione, vengono fatte 5 ripetizioni (Mehle *et al.*, 2013). Ottenuti tutti i risultati, si prendono in considerazione i *Ct* della diluizione in cui almeno una diluizione non ha generato curve. Il *Ct* più alto ottenuto, arrotondato per eccesso allo 0,5 superiore ed aumento di un ulteriore 0,5 sarà considerato il ciclo soglia. Nel caso in cui tutte le ripetizioni della diluizione vengono negative, il *Ct* soglia sarà dato dal *Ct* più alto rilevato dalle 5 ripetizioni ottenute con le diluizioni precedente aumentato di 0,5. Per chiarezza si riporta il seguente esempio (tabella 16):

Tabella 16. Dati per la determinazione del *Ct* soglia

Diluizione	<i>Ct</i> repliche	<i>Ct</i> soglia
10 ⁻²	30-31-30-30-31	Non determinabile
10 ⁻³	33-33-34-33-33	Non determinabile
10 ⁻⁴	37-36-37-36-37	Non determinabile
10 ⁻⁵	nd-38-nd-37-37,5 nd-38-nd-37-37,5	38,5
	oppure nd-nd-nd-nd-nd	37,5
10 ⁻⁶	nd-nd-nd-nd-nd	Non determinabile

Il ciclo soglia (*cut-off*) così determinato verrà utilizzato per l'interpretazione del risultato scaturito dall'esecuzione del metodo di prova, come di seguito specificato:

- considerare positivi tutti i campioni con un valore di *Ct* < del *cut-off*
- considerare negativi i campioni con un valore di *Ct* > del *cut-off*.

N.B.: è buona norma porre un'attenzione particolare a quei campioni il cui *Ct* sia molto vicino al *Ct* soglia ($\pm 0,3$); in questo caso considerare i campioni dubbi e ripetere l'analisi con un altro metodo o rifare il campionamento.

Poiché il *Ct* soglia è influenzato da diversi fattori, fra cui i reagenti e la strumentazione utilizzata per l'esecuzione del test, è opportuno che venga sempre determinato internamente al laboratorio. Inoltre, considerato che il valore di *Ct* dipende anche dalla threshold, ovvero del valore di fluorescenza oltre il quale una reazione real time PCR viene considerata positiva, è opportuno che il laboratorio definisca contemporaneamente anche le modalità per la definizione della threshold. Tale valore viene calcolato automaticamente dal software dello strumento real time PCR, e quindi varia di volta in volta, oppure può essere prefissato dall'operatore e restare costante in ogni esperimento.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 17	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Grapevine pinot gris virus	Pag. 16 di 16

5. Valori di validazione

I valori di validazione riportati nella tabella 17 sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il CREA-DC sede di Roma utilizzando 25 campioni target, 13 campioni sani e 10 non target.

La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da tal quale a 10^{-4} e da diluizione di un plasmide (diluito in estratto di RNA di piante sane) trasformato con inserto del gene target con le diluizioni 1000, 500, 250, 50 e 12,5 copie di plasmide.

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tutti i campioni nelle stesse condizioni.

Tabella 17. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti per i metodi di prova RT-PCR e real time RT-PCR

Parametri	RT-PCR (Glasa <i>et al.</i> 2014)	RT-PCR (Saldarelli <i>et al.</i> 2015)	Real Time RT-PCR (Bianchi <i>et al.</i> , 2015)	Real Time RT-PCR (Ratti <i>et al.</i> , 2015)
Sensibilità analitica	10^{-3} 250 copie	10^{-2} 250 copie	10^{-4} 12,5 copie	10^{-4} 12,5 copie
Specificità analitica (inclusività/esclusività)	Nessuna cross reaction sui 10 non-target valutati	Nessuna cross reaction sui 10 non- target valutati	Nessuna cross reaction sui 10 non-target valutati	Nessuna cross reaction sui 10 non-target valutati
Ripetibilità	97%	92%	97%	100%
Sensibilità diagnostica	77%	75%	85%	85%
Specificità diagnostica	100%	93%	99%	99%
Accuratezza	89%	84%	92%	92%
Riproducibilità	96%	94%	99%	99%