

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 69

Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	Tavolo permanente della Rete Nazionale	CFN 25/06/2024	02/07/2024	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 2 di 16

Sommario

PREMESSA.....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	5
Virus della vite soggetti a norme fitosanitarie	7
1. Protocollo diagnostico dei virus della vite soggetti a norme fitosanitarie - Metodo ELISA	7
2. Procedura del test ELISA	8
3. Metodo ELISA diretta (DAS-ELISA) per i virus ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV (con kit Bioreba e Agritest) e GVA (con kit Bioreba).....	9
4. Metodo ELISA diretta (DAS-ELISA) per il virus GVA (con kit AGRITEST).....	11
5. Valori di validazione	12

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	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 alla protezione delle piante.

Secondo quanto definito dal Regolamento (UE) 2017/625, le autorità competenti di ciascun Stato membro designano i laboratori ufficiali cui far effettuare analisi, prove e diagnosi di laboratorio su campioni prelevati durante i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali.

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, 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'art. 8 e all'art. 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 ministeriale 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 Riferenza Nazionali accreditati e riconosciuti dall'Autorità centrale possono essere utilizzati da altri Laboratori

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 4 di 16

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 abbia verificato di saperli eseguire nel proprio Laboratorio ottenendo risultati rientranti nei limiti definiti dal metodo (dati di precisione);
- il Laboratorio abbia verificato che le caratteristiche prestazionali che dipendono dal Laboratorio e non dal metodo (ad es., tipo e condizione dell'apparecchiatura utilizzata, abilità del personale autorizzato ad eseguire la prova, condizioni ambientali del Laboratorio, qualità dei reattivi e materiali utilizzati, procedura di prova definita dal Laboratorio) siano compatibili con quelle ottenute durante la validazione del metodo.

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

Il presente protocollo si affianca a tutti gli altri protocolli di analisi ufficiali o normalizzati previsti o riconosciuti dalla normativa in vigore.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 5 di 16

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 dell'Unione europea designato a norma dell'articolo 93, paragrafo 1.

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. 16 del 2 febbraio 2021. Norme per la produzione e commercializzazione dei materiali di moltiplicazione della vite, 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 legislativo n. 19 del 2 febbraio 2021. Norme per la protezione delle piante dagli organismi

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 6 di 16

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.

Nota tecnica del Ministero delle Politiche Agricole alimentari e Forestali, protocollo N.0005973 del 18/02/2020 concernente la modifica del metodo diagnostico del GVA necessario ai fini delle procedure di controllo virologico a carico delle piante madri per marze e portinnesti.

Nota tecnica del Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, protocollo n. 202217 del 05/05/2022 concernente le modalità operative e i protocolli diagnostici da utilizzare ai fini del controllo virologico dei vigneti di viti madri.

Decreto Ministeriale n.660332 del 29 novembre 2023 relativo alle modalità di controllo ufficiale e vigilanza agli impianti di viti madri e ai vivai di vite, nonché ai materiali di moltiplicazione della vite, in applicazione degli articoli 24, comma 2, 25, comma 2, e 30, comma 7 del decreto legislativo 2 febbraio 2021, n. 16.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 7 di 16

Virus della vite soggetti a norme fitosanitarie

Il protocollo che segue è stato validato nell'ambito del progetto ARNADIA e a seguito del Proficiency test organizzato dal NRL area virologia e sostituisce il protocollo diagnostico normato dal D.M. 13 dicembre 2011 abrogato con il D.lgs. n. 16 del 2 febbraio 2021. Kit o reagenti alternativi a quelli presenti nel protocollo possono essere utilizzati qualora sia stata preventivamente effettuata una verifica di validità.

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo)	Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1); Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3); Grapevine virus A (GVA); Arabis mosaic virus (ArMV); Grapevine fanleaf virus (GFLV); Grapevine fleck virus (GFkV)
Avversità causate	Complesso dell'accartocciamento fogliare (GLRaV-1 e GLRaV-3); scanalatura del Kober del complesso del legno riccio (GVA); degenerazione infettiva della vite (ArMV e GFLV); maculatura infettiva della vite (GFkV).

1. Protocollo diagnostico dei virus della vite soggetti a norme fitosanitarie - Metodo ELISA

Il protocollo diagnostico permette il rilevamento e l'identificazione dei virus sopraindicati e deve essere applicato ai materiali di moltiplicazione della vite per le diverse categorie previste dalla certificazione ("iniziale", "base" e "certificato") ai sensi dell'allegato II del D.lgs. 16 del 2021. Il protocollo è stato validato su matrice costituita da tessuto floematico ottenuto da talee raccolte durante la fase di riposo vegetativo (durante il periodo invernale).

Il campionamento deve seguire quanto riportato nell'allegato I del D.M. 660332 del 29/11/2023.

Il test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) consiste in una reazione specifica antigene (virus)-anticorpo che avviene su un supporto solido (piastra ELISA) e che viene visualizzata mediante una reazione colorimetrica.

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

Occorre seguire, quindi, attentamente le istruzioni della ditta produttrice del kit sierologico utilizzato; in particolare, bisogna attenersi scrupolosamente a tutte le diluizioni dei reagenti riportate ed utilizzare la diluizione del campione nel rapporto peso/volume di 1/10.

Per la validazione del metodo sono stati utilizzati i kit diagnostici specifici delle ditte Bioreba e Agritest, senza modificare la composizione dei tamponi indicati nelle istruzioni del kit.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 8 di 16

2. Procedura del test ELISA

2.1 Preparazione dei tamponi

La composizione dei tamponi da utilizzare nel test ELISA è riportata nell'allegato I Parte VIII Nota tecnica del Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, protocollo n. 202217 del 05/05/2022 concernente le modalità operative e i protocolli diagnostici da utilizzare ai fini del controllo virologico dei vigneti di viti madri.

2.2 Estrazione del virus dal campione da analizzare

La matrice utilizzata per il test ELISA è il tessuto floematico, ottenuta seguendo le fasi di seguito elencate:

- rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) fino a mettere a nudo il tessuto floematico, **prediligendo la parte basale del tralcio**;
- prelievo del floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino;
- triturazione in mortaio del tessuto floematico ottenuto e polverizzazione con azoto liquido a cui viene successivamente aggiunto il tampone di estrazione; in alternativa, triturazione diretta con pestello in presenza di tampone di estrazione nel rapporto peso/volume di 1/10 (0,5 g di tessuto floematico in 5 ml di tampone);
- macerazione del tessuto floematico ottenuto nel tampone di estrazione per 2-3 ore a freddo ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ o in ghiaccio).

In alternativa, è possibile utilizzare una fresa per macinare/polverizzare il campione:

- il campione può essere trattato in due modi: con rimozione o senza rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) **prediligendo la parte basale del tralcio**. Nel secondo caso è necessario avere l'accortezza di aumentare la quantità di campione a contatto con il tampone di estrazione (1 g di tessuto floematico in 10 ml di tampone anziché 0,5 g in 5 ml di tampone).
- Prelievo del floema, congiuntamente agli altri tessuti del tralcio legnoso, mediante macinazione/polverizzazione con l'utilizzo di una fresa (tipo Granex o artigianale) e raccolta del materiale in contenitori di plastica.
- Aggiunta del tampone di estrazione nel rapporto 1/10; macerazione diretta a freddo ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ o in ghiaccio) per 2-3 ore oppure (opzionale) preceduta da omogeneizzazione meccanica.

È necessario identificare in maniera univoca ogni singolo campione.

Durante le operazioni di estrazione e macerazione mantenere i mortai in ghiaccio o in cella fredda a $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Mantenere i campioni via via macerati in ghiaccio o a $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.3 Valutazione dei risultati.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 9 di 16

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo. Quantificare la colorazione tramite lettura visiva (+/-) e in un apposito fotometro a 405 nm. I risultati sono attendibili fino a che i controlli negativi non superano l'assorbanza di 0,2 OD. Fare almeno tre 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 superi l'assorbanza di 0,2 OD.

Lo sviluppo del colore può essere bloccato aggiungendo 50 µl/pozzetto di NaOH 3M.

INTERPRETAZIONE DELLE LETTURE CON FOTOMETRO

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

Threshold o *limite soglia* (**B**) = $A \times 2,5$ (in ogni caso il valore soglia minimo dovrà essere 0,1)

Campione positivo: $\geq B$

Campione negativo: $< B$

Es. $A=0,1$ $B=0,25$ campioni infetti se lettura: $\geq 0,25$

$A=0,03$ $B=0,075$ campioni infetti se lettura: $\geq 0,1$

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, va estratto di nuovo.

3. Metodo ELISA diretta (DAS-ELISA) per i virus ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV (con kit Bioreba e Agritest) e GVA (con kit Bioreba)

3.1 Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici

- Diluire gli anticorpi secondo le indicazioni riportate dal kit utilizzato.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Distribuire la soluzione di anticorpi in ciascun pozzetto in 100 µl o 200 µl.
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo secondo quanto riportato nelle istruzioni del kit.

Se ci sono pozzetti inutilizzati riempirli col tampone di sensibilizzazione.

3.2 Estrazione del virus dal campione da analizzare

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio al punto 2.2.

3.3 Lavaggio della piastra

- Effettuare i lavaggi rispettando tempi e numero secondo le istruzioni del kit.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 10 di 16

- Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

3.4 Distribuzione dei campioni

- Caricare 100 µl o 200 µl del campione in ciascun pozzetto.
- Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (tampone di estrazione), anche questi in duplicato tecnico.
- Se ci sono pozzetti inutilizzati riempirli col tampone di estrazione.
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare alla temperatura e per il tempo indicato nelle istruzioni del kit diagnostico utilizzato.

3.5 Lavaggio della piastra

- Effettuare i lavaggi rispettando tempi e numero secondo le istruzioni del kit utilizzato.
- Lavare la piastra con il tampone di lavaggio fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.
- Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

3.6 Distribuzione anticorpo specifico coniugato

- Diluire l'anticorpo coniugato nel relativo tampone come indicato nelle istruzioni del kit.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Caricare in ciascun pozzetto 100 µl o 200 µl dell'anticorpo coniugato
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti, secondo quanto riportato nelle istruzioni del kit.

Se ci sono pozzetti inutilizzati riempirli col tampone coniugato (senza l'aggiunta dell'anticorpo).

3.7 Preparazione del substrato

- Preparare il substrato poco prima (5 minuti) dell'uso.
- Aggiungere il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate al tampone substrato secondo le indicazioni del kit utilizzato.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Mantenere al buio il substrato così ottenuto fino al momento del caricamento in piastra.

3.8 Lavaggio della piastra

- Eseguire i lavaggi della piastra secondo il numero e la durata riportati nelle istruzioni del kit.
- Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

3.9 Caricamento del substrato

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 11 di 16

- Caricare in ciascun pozzetto 100 µl o 200 µl della soluzione substrato
- Coprire la piastra con un foglio di alluminio o con un coperchio e lasciare a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.10 Valutazione dei risultati

Seguire le modalità sopra indicate nelle procedure generali del saggio al punto 2.3.

4. Metodo ELISA diretta (DAS-ELISA) per il virus GVA (con kit AGRITEST)

4.1 Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici

- Diluire gli anticorpi nel tampone di sensibilizzazione secondo le istruzioni del kit.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta e distribuirne 100 µl in ciascun pozzetto.
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo secondo le istruzioni del kit.

Se ci sono pozzetti inutilizzati riempirli col tampone di sensibilizzazione.

4.2 Estrazione del virus dal campione da analizzare

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio al punto 2.2.

4.3 Lavaggio della piastra

- Effettuare i lavaggi rispettando tempi e numero lavaggi secondo le istruzioni del kit.
- Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

4.4 Distribuzione dei campioni

- Caricare i campioni (100 µl) secondo le quantità indicate dal kit diagnostico, effettuando, per ognuno di essi, un duplicato tecnico.
- Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (tampone di estrazione), anche questi in duplicato tecnico.
- Se ci sono pozzetti inutilizzati riempirli col tampone di estrazione.

4.5 Distribuzione anticorpo specifico coniugato

- Diluire l'anticorpo coniugato nel relativo tampone come indicato nelle istruzioni del kit.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- **Caricare 100 µl della soluzione con l'anticorpo coniugato in ciascun pozzetto già contenente il campione senza effettuare di lavaggio della piastra.**
- Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.
- Incubare alla temperatura e per il tempo riportati nelle istruzioni del kit diagnostico.
- Se ci sono pozzetti inutilizzati, riempirli col tampone di coniugazione (che si va ad aggiungere al tampone di estrazione dello step precedente).

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 12 di 16

4.6 Preparazione del substrato

- Preparare il substrato poco prima dell'uso.
- Aggiungere il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate al tampone substrato secondo le indicazioni del kit utilizzato.
- Mescolare bene la soluzione ottenuta.
- Mantenere al buio il substrato così ottenuto fino al momento del caricamento in piastra.

4.7 Lavaggio della piastra

- Eseguire i lavaggi della piastra secondo il numero e la durata riportati nelle istruzioni del kit.
- Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

4.8 Caricamento del substrato

- Caricare in ciascun pozzetto 100 µl della soluzione di substrato secondo le indicazioni del kit.
- Coprire la piastra con un foglio di alluminio o con un coperchio ed incubare a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

4.9 Valutazione dei risultati

Seguire le modalità sopra indicate nelle procedure generali del saggio al punto 2.3.

5. Valori di validazione

I valori dei parametri di validazione dei kit commerciali ELISA basati su antisieri singoli (Agritest ad eccezione del GVA e Bioreba) e combinati (Bioreba) derivano dalle prove di validazione effettuate nell'ambito del progetto ARNADIA e sono riportati nelle tabelle da 1 a 8. Il test per GVA di Agritest rientra nell'ambito dello scopo di accreditamento del DIALAB ed i valori di validazione sono quelli presenti nella dichiarazione di validazione (Tabella 3 Agritest)

I valori dei parametri di validazione dei kit commerciali ELISA basati su antisieri combinati Agritest (GLRaV-1+ GLRaV-3 e ArMV+GFLV) sono stati determinati a seguito di prove eseguite internamente al LNR area virologia (sensibilità analitica e ripetibilità) e sulla base dei risultati ottenuti nel Proficiency test organizzato nel 2024 dal LNR e sono riportati nelle tabelle 7 e 8 (sensibilità e specificità diagnostica, riproducibilità e accuratezza per Agritest).

Per i kit combinati Agritest la sensibilità è stata valutata per confronto con il kit combinato Bioreba già validato e utilizzato come test di riferimento, analizzando diluizioni da 10^0 a 10^{-2} di tre campioni target. La ripetibilità è stata calcolata analizzando tre repliche tecniche di uno stesso campione, nell'ambito dello stesso esperimento.

Come riportato nei protocolli sopra descritti, la quantità dei reagenti utilizzati (100 µl o 200 µl a parità di condizioni) non determina variazioni nei valori dei parametri di validazione

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 13 di 16

Tabella 1 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GLRaV-1

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	89%	94%
Specificità diagnostica	97%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻²	10 ⁻²
Accuratezza	93%	96%
Riproducibilità	92%	91%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	85%	61%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza	89%	93%
Ripetibilità	100%	100%

Tabella 2 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GLRaV-3

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	81%	90%
Specificità diagnostica	100%	100%
Ripetibilità	100%	94%
Sensibilità analitica	10 ⁻²	10 ⁻²
Accuratezza	84%	92%
Riproducibilità	98%	91%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	66%	97%
Specificità diagnostica	94%	100%
Accuratezza	75%	98%
Ripetibilità	100%	94%

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 14 di 16

Tabella 3 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GVA

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	100%	46%
Specificità diagnostica	100%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Accuratezza	100%	58%
Riproducibilità	100%	73%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	-	30%
Specificità diagnostica	-	75%
Accuratezza	-	43%
Ripetibilità	-	86%

Tabella 4 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di ArMV

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	64%	48%
Specificità diagnostica	85%	95%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻²	10 ⁻²
Accuratezza	74%	71%
Riproducibilità	94%	93%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	64%	42%
Specificità diagnostica	94%	100%
Accuratezza	81%	76%
Ripetibilità	100%	100%

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 15 di 16

Tabella 5 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GFLV

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	75%	82%
Specificità diagnostica	96%	92%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Accuratezza	80%	84%
Riproducibilità	94%	91%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	65%	90%
Specificità diagnostica	100%	93%
Accuratezza	79%	91%
Ripetibilità	100%	86%

Tabella 6 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GFkV

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	85%	90%
Specificità analitica diagnostica	100%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Accuratezza	88%	92%
Riproducibilità	92%	86%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	72%	47%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza	84%	70%
Ripetibilità	100%	100%

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 69	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite, soggetti a norme fitosanitarie, con metodo sierologico ELISA	Pag. 16 di 16

Tabella 7 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di GLRaV 1+GLRaV 3

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	100%	84%
Specificità diagnostica	100%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁻¹	10 ⁻²
Accuratezza	100%	90%
Riproducibilità	100%	92%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	-	81%
Specificità diagnostica	-	94%
Accuratezza	-	85%
Ripetibilità	-	100%

Tabella 8 Valori di validazione per il metodo di prova test ELISA per la diagnosi di ArMV+GFLV

Parametri (campioni singoli)	Agritest	Bioreba
Sensibilità diagnostica	100%	88%
Specificità diagnostica	100%	62%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità analitica	10 ⁰	10 ⁻¹
Accuratezza	100%	82%
Riproducibilità	100%	93%
Parametri (campioni pool)		
Sensibilità diagnostica	-	79%
Specificità diagnostica	-	62%
Accuratezza	-	73%
Ripetibilità	-	86%