

**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.**

**(GU n.50 del 29-2-2012)**

IL DIRETTORE GENERALE

della competitività per lo sviluppo rurale

Vista la direttiva 68/193/CEE del Consiglio relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite e successive modifiche;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 24 dicembre 1969, n. 1164, recante norme sulla produzione e sul commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Visto il decreto ministeriale 4 luglio 1970 recante norme per l'applicazione del decreto del Presidente della Repubblica 24 dicembre 1969, n. 1164, relativo alla disciplina della produzione e del commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 29 luglio 1974, n. 543, recante norme regolamentari per l'applicazione del decreto del Presidente della Repubblica 24 dicembre 1969, n. 1164, recante norme sulla produzione e sul commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 18 maggio 1982, n. 518, relativo all'attuazione delle direttive 71/140/CEE, 74/648/CEE, 74/649/CEE, 77/629/CEE, 78/55/CEE e 78/692/CEE relative alla

produzione ed al commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Vista la legge 19 dicembre 1984, n. 865, relativa all'attuazione della direttiva 82/331/CEE della Commissione del 6 maggio 1982 che modifica la direttiva 68/193/CEE del Consiglio del 9 aprile 1968 relativa alla produzione ed al commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Visto il decreto ministeriale 2 luglio 1991, n. 290, istitutivo del regolamento recante l'indicazione supplementare in etichetta per i materiali di moltiplicazione della vite;

Visto il decreto ministeriale 24 giugno 1997 recante norme di produzione e commercializzazione di materiali di moltiplicazione di categoria standard di varietà di viti portinnesto;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 29 ottobre 1997, n. 432, che emana il regolamento recante modificazioni al decreto del Presidente della Repubblica 24 dicembre 1969, n. 1164, in materia di produzione e di commercio dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Visto il decreto ministeriale 22 dicembre 1997 che stabilisce il protocollo tecnico per la micropropagazione dei materiali di moltiplicazione di varietà di portinnesto della vite;

Visto il decreto ministeriale 30 maggio 2001 che modifica il decreto ministeriale 24 giugno 1997 relativo alle norme di produzione e commercializzazione di materiali di moltiplicazione di categoria standard di varietà di viti portinnesto;

Vista la direttiva 2002/11/CE del Consiglio del 14 febbraio 2002 che modifica la direttiva 68/193/CEE relativa alla

commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite e che abroga la direttiva 74/649/CEE;

Visto il decreto ministeriale 8 febbraio 2005 «Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite» ed in particolare gli articoli 4 e 5;

Vista la direttiva 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005 che modifica gli allegati della direttiva 68/193/CEE del Consiglio;

Visto il decreto ministeriale 7 luglio 2006 recante recepimento della direttiva 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005 che modifica gli allegati della direttiva 68/193/CEE del Consiglio relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Ritenuto di dover indicare linee guida per l'esecuzione dei controlli previsti dalla normativa di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite;

Sentita l'Unita' di coordinamento di cui all'art. 4 del decreto ministeriale 8 febbraio 2005, ed acquisito il suo parere favorevole nel corso della riunione del 3 novembre 2011;

Decreta:

## **Art. 1**

### **Campo di applicazione**

1. Il presente decreto riguarda le procedure di controllo virologico previste dal decreto ministeriale 7 luglio 2006, allegato I, punto 5 e si applica agli impianti di piante madri per marze e portainnesto.

## **Art. 2**

### **Definizioni**

1. Ai fini del presente decreto si intende per:

- a) «Certificazione»: l'autorizzazione al prelievo di talee o marze dagli impianti di piante madri;
- b) «Impianto di piante madri»: l'impianto corrispondente ad un rigo della denuncia di produzione (domanda di controllo e certificazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite);
- 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.

#### **Art. 4**

##### **Sospensione dell'utilizzo degli impianti di piante madri**

1. Gli impianti di piante madri per poter essere certificati devono essere sottoposti a campionamento ed analisi ufficiali nel rispetto dei tempi e delle scadenze previste all'allegato I del decreto ministeriale 7 luglio 2006.

2. Qualora un impianto di cui al comma precedente, giunto alle scadenze previste all'allegato I del decreto ministeriale 7 luglio 2006, non è oggetto di utilizzazione, può usufruire di una proroga dei termini per una sola annualità.

3. Il responsabile del campo di piante madri deve comunque inserire l'impianto nella denuncia annuale e deve altresì segnalare, prima del periodo dei controlli, che non sono state effettuate le analisi previste in quanto non intende utilizzare l'impianto medesimo.

4. Per la campagna in questione l'impianto non viene autorizzato per il prelievo di materiale di moltiplicazione e resta quindi «sospeso».

5. L'impianto di piante madri tenuto «sospeso» secondo le procedure di cui ai commi precedenti, puo' essere riammesso al controllo ed alla certificazione solo a seguito della effettuazione delle analisi fitosanitarie previste e nel rispetto del biennio di controllo indicato dalle norme sugli organismi nocivi di quarantena di cui al decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 214.

## **Titolo II**

### **Materiali di categoria «Iniziale» e «Base»**

#### **Art. 5**

##### **Certificati di analisi e documenti accessori**

1. Entro il 30 giugno di ogni anno, secondo le modalita' indicate all'allegato 2 al presente decreto, il responsabile del campo di piante madri presenta al servizio di controllo, il certificato di analisi, recante la firma del responsabile dell'analisi e la data del rilascio, integrato con le seguenti informazioni, riportate sul certificato medesimo o in un documento allegato:

il riferimento al campo di piante madri sottoposto a test;

la data del prelievo;

il nome di chi ha effettuato il prelievo;

il numero di piante sottoposte a prelievo;

il numero di piante per campione, nel caso di campione pool;

il codice del campione;

informazioni che consentano il collegamento tra campione e pianta o le piante del campione pool da cui e' stato prelevato;

il laboratorio che ha effettuato l'analisi con test ELISA;

il protocollo di analisi seguito con specifica degli antisieri

utilizzati.

2. Le disposizioni di cui al comma 1 si applicano anche alle analisi delle piante madri effettuate precedentemente all'adozione del presente decreto; in tal caso, l'intervallo di cinque o sei anni, rispettivamente per gli impianti di categoria «Iniziale» e «Base», decorrono dalla data di rilascio del certificato di analisi e la comunicazione al servizio di controllo puo' essere priva dei seguenti elementi:

codice del campione;

nome di chi ha effettuato il prelievo;

la data del prelievo, fermo restando l'obbligo di citare almeno l'anno e il mese del campionamento.

## **Art. 6**

### **Criteri operativi**

1. Tutte le piante del campo di piante madri di categoria «Iniziale» e «Base», sia per marze, sia per portinnesto devono essere sottoposte ai test per la verifica dello stato virologico, secondo quanto indicato all'allegato 2 al presente decreto.

2. Il costituente del clone o suo delegato effettua il campionamento secondo le modalita' indicate all'allegato 2 al presente decreto e provvede altresì ad effettuare le analisi o a farle effettuare presso un laboratorio di propria fiducia, in conformita' a quanto stabilito all'art. 3 del presente decreto.

3. Il costituente puo' delegare al responsabile del campo le proprie attribuzioni previste dal presente decreto.

4. Nel caso di campi di piante madri realizzati in Italia con cloni

costituiti in altri Paesi dell'Unione europea, i campioni raccolti possono essere analizzati anche presso un laboratorio operante in un altro Paese membro, purché il protocollo di analisi, in particolare per quanto riguarda gli antisieri utilizzati, sia equivalente a quello riportato all'allegato 1.

## **Art. 7**

### **Autorizzazione al prelievo di materiale di moltiplicazione**

#### **«Iniziale» e «Base» e verifiche del servizio di controllo**

1. Il servizio di controllo, sulla base dei certificati di analisi presentati dal costituente o da suo delegato, autorizza, se del caso, il prelievo di materiale dagli impianti di piante madri, secondo le procedure indicate all'allegato 2 al presente decreto.

2. Il servizio di controllo effettua annualmente test di verifica mediante l'analisi di almeno cento campionamenti dei campi di piante madri già verificati dal costituente l'anno precedente ed autorizzati al prelievo di materiale.

3. Detti test di verifica, costituiti da campioni singoli o multipli (campioni «pool») riguardano i virus previsti all'allegato I del decreto ministeriale 7 luglio 2006.

## **Art. 8**

### **Prima denuncia di impianti di piante madri**

#### **di categoria «Iniziale»**

1. Il responsabile del campo di piante madri di categoria «Iniziale» che inserisce per la prima volta l'impianto nella denuncia di produzione deve accompagnare tale denuncia di produzione con il

certificato delle analisi, effettuate secondo le modalita' descritte dal presente decreto, attestante l'assenza dei virus previsti dall'allegato I del decreto ministeriale 7 luglio 2006, compreso il virus della maculatura infettiva della vite (GFkV Fleck) per i portinnesti.

2. La certificazione d'analisi include le informazioni specificate all'art. 5 del presente decreto.

3. Il certificato di analisi deve riferirsi ad un prelievo effettuato entro il quarto anno solare precedente a quello in cui e' presentata la denuncia di produzione.

## **Art. 9**

### **Prima denuncia di impianti di piante madri di categoria «Iniziale» per la produzione di materiale di categoria «Base»**

1. Per i cloni di nuova iscrizione al Registro nazionale delle varietá di viti e' consentito realizzare un impianto di piante madri per la produzione di materiale di moltiplicazione della categoria «Base» contestualmente alla prima denuncia del primo impianto di piante madri per la produzione di materiale di moltiplicazione di categoria «Iniziale», utilizzando piante della stessa categoria «Iniziale».

2. A detti impianti per la produzione di materiale di categoria «Base» si applicano le medesime condizioni indicate all'art. 8 per i nuovi impianti di piante madri di categoria «Iniziale».

## **Titolo III**

### **Materiali di moltiplicazione di categoria certificato**

## **Art. 10**

### **Materiali di categoria «certificato»**

1. Le piante del campo di piante madri destinate alla produzione di materiali di moltiplicazione della categoria certificato devono essere sottoposte periodicamente ad analisi per la verifica dello stato fitosanitario secondo quanto indicato all'allegato 3 al presente decreto.

2. I servizi di controllo regionali dispongono il campionamento ufficiale che deve essere realizzato sotto loro responsabilita', secondo le modalita' indicate all'allegato 3 al presente decreto. I servizi medesimi provvedono ad effettuare o fare effettuare per loro conto le analisi presso un laboratorio in conformita' a quanto stabilito all'art. 3 del presente decreto.

## **Art. 11**

### **Autorizzazione al prelievo di materiale certificato**

1. Il servizio di controllo, sulla base dei risultati delle analisi effettuate, autorizza, se del caso, il prelievo di materiale dagli impianti di piante madri, secondo le procedure indicate all'allegato 3 al presente decreto.

## **Titolo IV**

### **Rapporti istituzionali**

## **Art. 12**

## **Comunicazioni e coordinamento**

1. I servizi di controllo devono presentare annualmente, entro il 31 dicembre, all'Unità nazionale di coordinamento, di cui all'art. 4 del decreto ministeriale 8 febbraio 2005, presso il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, una relazione sull'attività di controllo di cui all'art. 1 che riporta almeno:

il numero e la superficie degli impianti giunti a scadenza per essere sottoposti a test;

quelli effettivamente sottoposti a test ed eventualmente le ragioni per cui determinati impianti non sono stati controllati;

le contestazioni ed i risultati delle analisi di verifica effettuate dal servizio di controllo ed i provvedimenti presi;

eventuali particolari situazioni o problematiche riscontrate.

2. Qualora, sulla base di tali informazioni o in assenza di esse, emergono gravi ritardi e carenze funzionali del servizio di certificazione, il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, su indicazione dell'unità di coordinamento, può disporre adeguata attività ispettiva ed indicare le opportune misure correttive atte a superare le disfunzioni rilevate.

Il presente decreto sarà inviato all'organo di controllo per la registrazione e sarà pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana al fine di assicurarne una diffusa conoscenza nell'intero territorio nazionale.

Roma, 13 dicembre 2011

Il direttore generale: Blasi

Registrato alla Corte dei conti il 30 gennaio 2012

Ufficio di controllo atti MISE - MIPAAF, registro n. 1, foglio n. 274

## **Allegato 1**

### **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 e' il tessuto floematico ottenuto da materiale legnoso raccolto nel periodo invernale.

Un corretto campionamento e' un presupposto fondamentale per l'attendibilita' del risultato di qualsiasi saggio diagnostico e anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione puo' 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 e' 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;

rintracciabilita' 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 piu' 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 - Modalita' 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 capacita' 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 e' correlata ai test di qualita' 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.

### Parte III

#### Procedura del saggio

#### Preparazione dei tamponi.

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre, il tampone coniugato ed il tampone PBS (che puo' essere preparato alla concentrazione 10× 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.

È importante utilizzare i tamponi entro trenta giorni dalla preparazione. È possibile arrivare fino a sei mesi se i tamponi vengono aggiunti di sodio azide (0,2 g/L).

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 dal 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 (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

quantita' 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.

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, una volta sottratto il valore di fondo (bianco), non superano l'assorbanza di 0,2 OD.

Quantificare la colorazione tramite lettura visiva (+/-) e in un apposito fotometro a 405 nm. 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 supera l'assorbanza di 0,2 OD.

Lo sviluppo del colore puo' 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) =  $A \times 2,5$  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 IV

ELISA diretta o DAS-ELISA (per i virus ArMV, GFLV, GLRaV-1 e GLRaV-3)

#### 1. Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici:

diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta del kit in tampone carbonato 1×;

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  $\mu$ l);

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.

## 2. 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.

## 4. Distribuzione dei campioni:

caricare i campioni (100 o 200  $\mu$ l per pozzetto, secondo quanto riportato dalla ditta produttrice del kit) seguendo lo schema (eliminare gli otto 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 in grigio nello schema (vedi allegato 1);

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.

#### 5. 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 e' molto critica e va fatta con attenzione.

#### 6. 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  $\mu$ l 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.

#### 7. Preparazione del substrato:

preparare il substrato cinque minuti prima dell'uso;

aggiungere al tampone substrato cinque minuti prima dell'uso il

4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1 ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette;

mescolare bene la soluzione ottenuta;

mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

8. 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 e' molto critica e va fatta con attenzione.

9. Caricamento del substrato:

caricare 100 o 200  $\mu$ l 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.

10. Valutazione dei risultati:

seguire le modalita' sopra indicate nelle procedure generali del saggio.

## Parte V

ELISA indiretta o DASI-ELISA (per il virus GVA)

1. Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici:

diluire gli anticorpi, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1 $\times$ ;

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

## 2. 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.

## 4. Distribuzione dei campioni:

caricare i campioni (100 o 200 µl per pozzetto secondo quanto previsto dalla ditta produttrice) seguendo lo schema (eliminare gli otto 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.

#### 5. 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 e' molto critica e va fatta con attenzione.

#### 6. 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  $\mu$ l 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

#### 7. 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.

#### 8. 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  $\mu$ l 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.

#### 9. Preparazione del substrato:

preparare il substrato cinque minuti prima dell'uso;

aggiungere al tampone substrato cinque minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1 ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette;

mescolare bene la soluzione ottenuta;

mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

#### 10. 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 e' molto critica e va fatta con attenzione.

11. Caricamento del substrato:

caricare 100 o 200  $\mu$ l 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.

12. Valutazione dei risultati:

seguire le modalita' sopra indicate nelle procedure generali del saggio.

## Parte VI

ELISA con pre-sensibilizzazione con proteina A per il virus GVA

1. Pre-sensibilizzazione con proteina A:

diluire la proteina A, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1 $\times$ ;

mescolare bene la soluzione ottenuta;

distribuire la soluzione di proteina A per ciascun pozzetto nella quantita' indicata dalla ditta produttrice del kit specifico (200  $\mu$ l);

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 ripetibilita' del saggio e' 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 piu' volte.

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

## 2. 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.

## 3. Sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpi specifici:

diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1×;

mescolare bene la soluzione ottenuta;

distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantita' 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.

## 4. Estrazione del virus dai campioni:

seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

## 5. 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.

#### 6. Distribuzione dei campioni:

caricare 200 µl di ogni campione per pozzetto seguendo lo schema (eliminare gli otto 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.

#### 7. 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 e' molto critica e va fatta con attenzione.

#### 8. 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.

#### 9. Preparazione del substrato:

preparare il substrato cinque minuti prima dell'uso;

aggiungere al tampone substrato cinque minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1 ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette;

mescolare bene la soluzione ottenuta;

mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

#### 10. 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.

#### 11. 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.

12. Valutazione dei risultati:

seguire le modalita' sopra indicate nelle procedure generali del saggio.

Parte VII

Punti critici dell'ELISA

a) Essendo l'ELISA una reazione antigene-anticorpo che avviene su un supporto solido la scelta della piastra e' molto importante perche' 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 capacita' 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 novantasei pozzetti dedicate ad altri scopi).

b) Nello schema del test riportare anche il numero di lotto del kit sierologico (puo' essere determinante per la uniformita' 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, perche' e' determinante per la loro efficienza.

f) Controllare almeno una volta al mese la taratura delle micro pipette utilizzate.

g) L'efficienza del test ELISA e' 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 e' 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 e' il piu' efficiente. Se si utilizzano macchinari per il lavaggio automatico delle piastre ELISA e' 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 capacita' 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.

## **Allegato 2**

### **ANALISI FITOSANITARIE DI IMPIANTI DI PIANTE MADRI PER LA PRODUZIONE**

**DI MATERIALI DI MOLTIPLICAZIONE DELLE CATEGORIE «INIZIALE» E «BASE».**

#### **Parte I**

##### **Anno di primo campionamento**

La tabella seguente indica sinteticamente l'anno di effettuazione del primo campionamento in funzione dell'anno di impianto del campo di piante madri.

In conseguenza della prassi consolidata del controllo annuale degli impianti, relativamente agli impianti di piante madri di categoria «Base», la prima analisi di laboratorio per la ricerca dei virus previsti dalla normativa, può essere effettuata quando

l'impianto ha sei anni di eta' (informazione rilevabile dalla denuncia di produzione).

### **Allegato 3**

## **ANALISI FITOSANITARIE DI IMPIANTI DI PIANTE MADRI PER LA PRODUZIONE**

### **DI MATERIALI DI MOLTIPLICAZIONE DI CATEGORIA «CERTIFICATO».**

#### **Parte I**

#### **Anno di primo campionamento**

In conseguenza della prassi consolidata del controllo annuale degli impianti, anche a seguito delle disposizioni previste dalla normativa fitosanitaria sulle malattie di quarantena, la prima analisi di laboratorio per la ricerca dei virus previsti dalla normativa, puo' essere effettuata quando l'impianto ha dieci anni di eta' (informazione rilevabile dalla denuncia di produzione).

Per semplificare la pianificazione dei prelievi negli impianti di piante madri si riporta, nella sottostante tabella, un quadro delle scadenze in relazione all'anno d'impianto dei vigneti di piante madri: