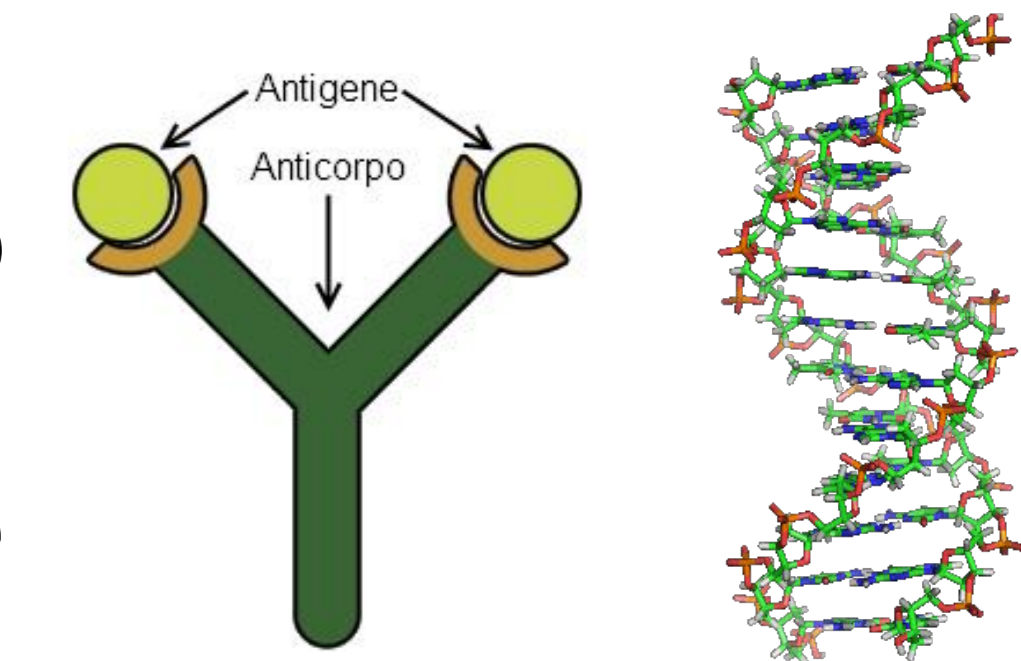
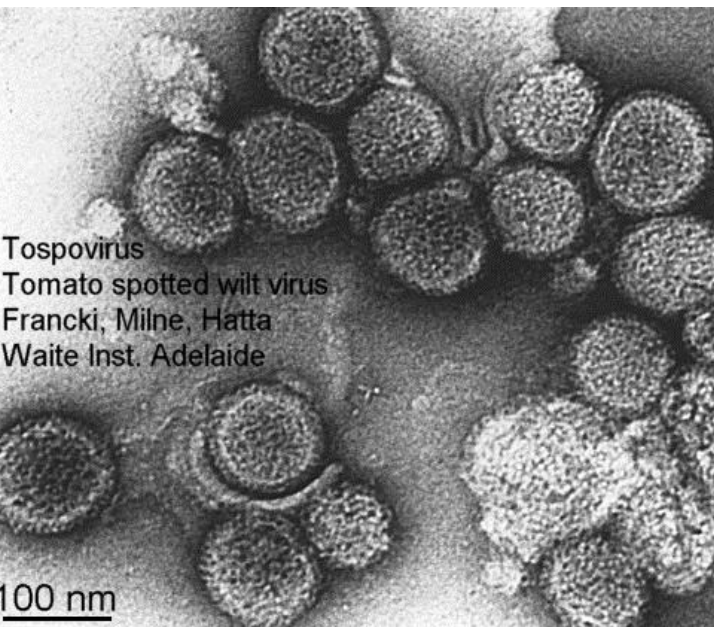


Messa a punto della diagnosi per *Iris yellow spot virus*: verso la definizione di un protocollo

Tiberini A., M. Ciuffo, A. Mangli, M. Turina, L. Tomassoli



Il genere *Tospovirus* (famiglia *Bunyaviridae*) include alcune tra le specie virali di maggiore importanza per l'economia agricola mondiale. Per alcune di esse esiste, e per altre si teme, un rischio fitosanitario per il nostro paese. Per molto tempo, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) fu considerato unica specie del genere distinguendo sierologicamente due diversi ceppi: TSWV – L (ceppo *Lettuce*) e TSWV – I (ceppo *Impatiens*).



Lo sviluppo di tecniche diagnostiche, sierologiche e molecolari sempre più sofisticate hanno permesso poi l'identificazione di specie distinte, a partire da *Impatiens necrotic spot virus* – INSV (ex TSWV-I) nel 1992, *Iris yellow spot virus* – IYSV nel 1993 e a seguire almeno altre 10 specie, principalmente di origine tropicale e sub-tropicale.

Le numerose segnalazioni di IYSV che si susseguono negli anni 90, infervorano l'attività nella messa a punto di metodiche diagnostiche specifiche per il nuovo virus. In particolare, la produzione di antisieri efficaci per una facile e immediata applicazione del metodo DAS-ELISA, come per TSWV e INSV. L'identificazione di IYSV nelle piante di cipolla è risultata però piuttosto problematica a causa di:

- 1- distribuzione non uniforme del virus nelle foglie
- 2 - bassa concentrazione → scarsa sensibilità
- 3 - falsi negativi e falsi positivi

Gent et al., 2006. Plant Disease, 90 (12): 1468-1480

A conferma:

in Italia alle prime indagini eseguite (Cosmi et al., 2003) e alle prime osservazioni di sintomatologie sospette in campo (Vicchi et al., 2008) non vi è stata una sicura identificazione di IYSV.



Nasce quindi la necessità di fornire agli operatori fitosanitari ed ai laboratori fitodiagnostici delle metodologie più accurate, veloci e sensibili nella identificazione del virus durante le operazioni di monitoraggio (STRA.TE.CO.).

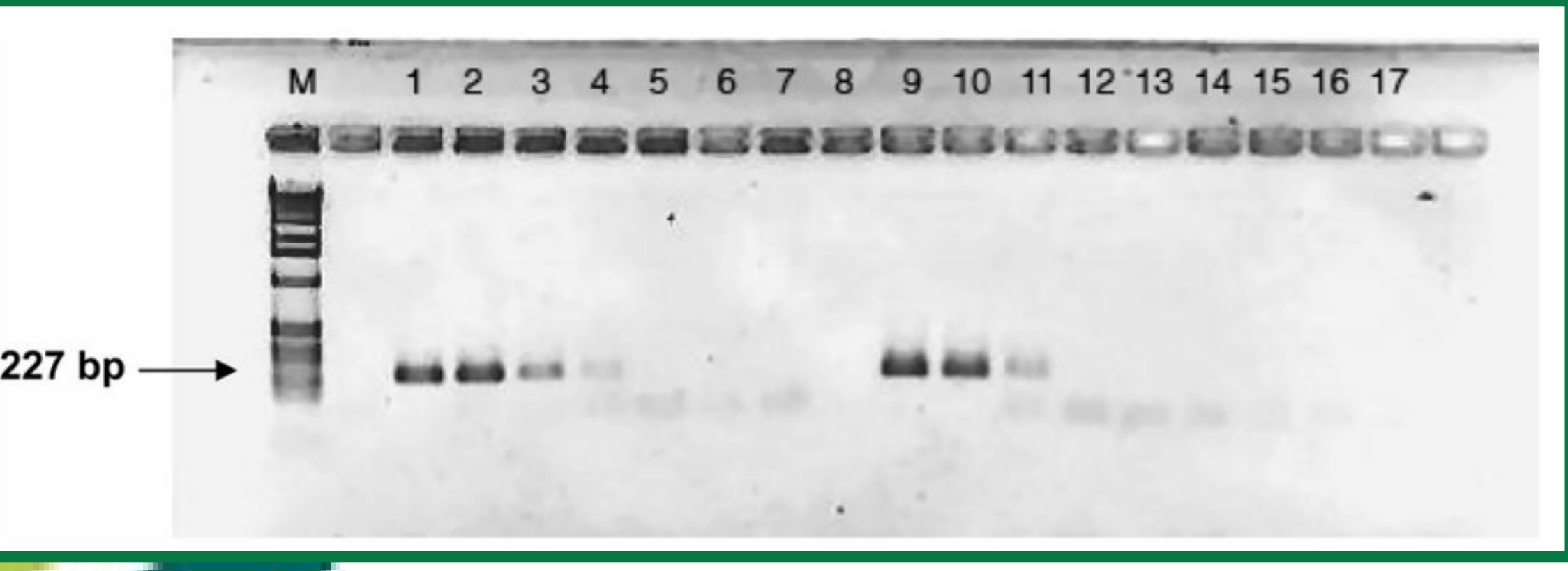
CONFRONTO KITS ELISA (1)

	Adgen	Agdia	DSMZ	Loewe	Prime Diagnostics	Sediag
N. Campioni infetti * §	10	25	1	5	13	0

* Dopo 3 ore di reazione § Positivo infetto fornito dalle Ditte tutti positivi verso il proprio Kit

(2) Sensibilità: 68,57 %
 Specificità: 83,33 %
 Accuratezza: 70,73 %

CONFRONTO ELISA – RT-PCR (1)



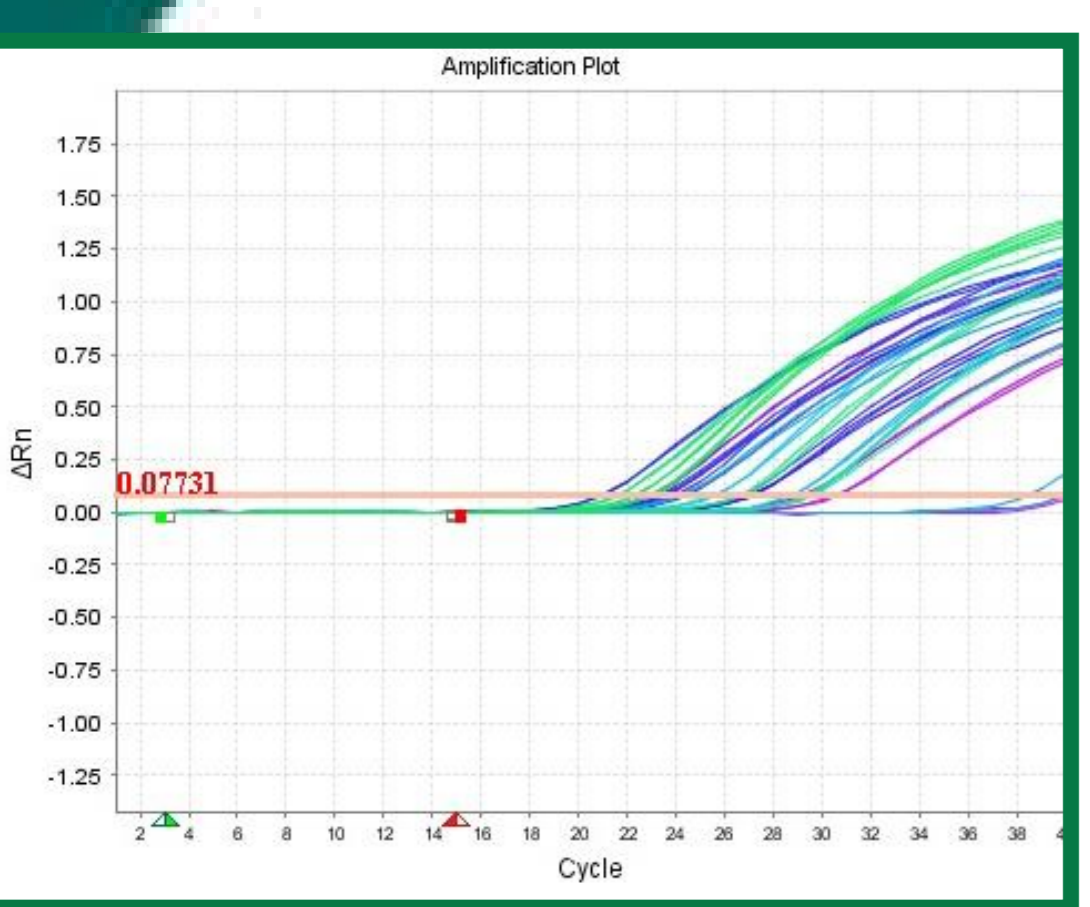
Alcuni campioni, negativi in DAS-ELISA, sono risultati positivi all'IYSV in RT-PCR ma allo stesso tempo il saggio molecolare non ha identificato il virus in due campioni risultati debolmente positivi al saggio ELISA.

	Agdia	RT-PCR
N. Campioni infetti	25	30

(2) Sensibilità: 85,71%
 Specificità: 100%
 Accuratezza: 87,8 %

Per risolvere questi risultati dubbi, è stato messo a punto, su cipolla, un nuovo saggio duplex di RealTime RT-qPCR

Duplex RT-qPCR (1)



Utilizzando i primer e sonda Taqman disegnati nella regione del gene codificante la proteina nucleocapsidica (N) di un isolato di riferimento (IYSV - GenBank Access. n. AY377428.1) ed includendo, come controllo interno, primer e sonda Taqman per il gene della citocromo c ossidasi (COX):

- IYSV-432: 5'-TTGATGCAACTACAGCCAGGAT-3'
- IYSV-503: 5'-AGCTGTCAAGACTCGGCAGTAAG-3'
- IYSV-455: 5'-ATGCTGACACTGGGCGGTCCTCTC-3'- 6FAM/BHQ1)

	RT-qPCR
N. Campioni infetti	35

Il metodo così messo a punto si è dimostrato molto efficiente nell'identificare IYSV, confermando tutti i campioni risultati infetti in RT-PCR, e fornendo un buon segnale di amplificazione per i due campioni risultati debolmente infetti solo in ELISA.

CONCLUSIONI: l'attività svolta ha evidenziato chiaramente le difficoltà nella diagnosi di IYSV. Obiettivo finale del presente lavoro sarà quello di offrire un protocollo e uno schema decisionale per una procedura diagnostica da applicare sul territorio nel proseguo del monitoraggio

- (1) I test sono stati eseguiti con gli stessi preparati fogliari grezzi (41 campioni), il cui RNA totale è stato estratto entro 24 ore dal loro utilizzo in ELISA
- (2) I parametri per ELISA (Kit Agdia) e RT-PCR sono calcolati prendendo come riferimento il test RT-qPCR

Si ringraziano i SFR che, fornendo il materiale campionato, hanno consentito lo svolgimento di queste prove di comparazione diagnostica nell'ambito del Progetto STRATECO