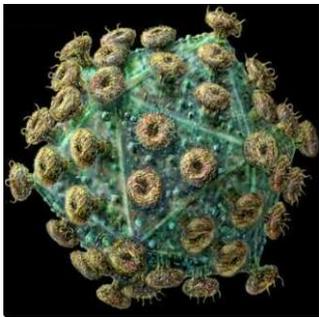


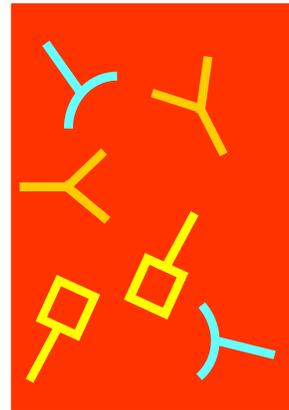
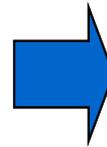
La diagnosi fitopatologica su base sierologica

DIAGNOSI SIEROLOGICA

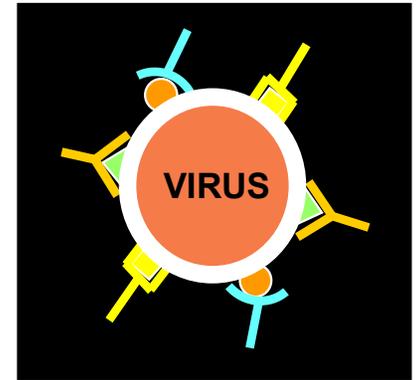
Oggi è la metodica più importante nella diagnosi dei virus



Virus



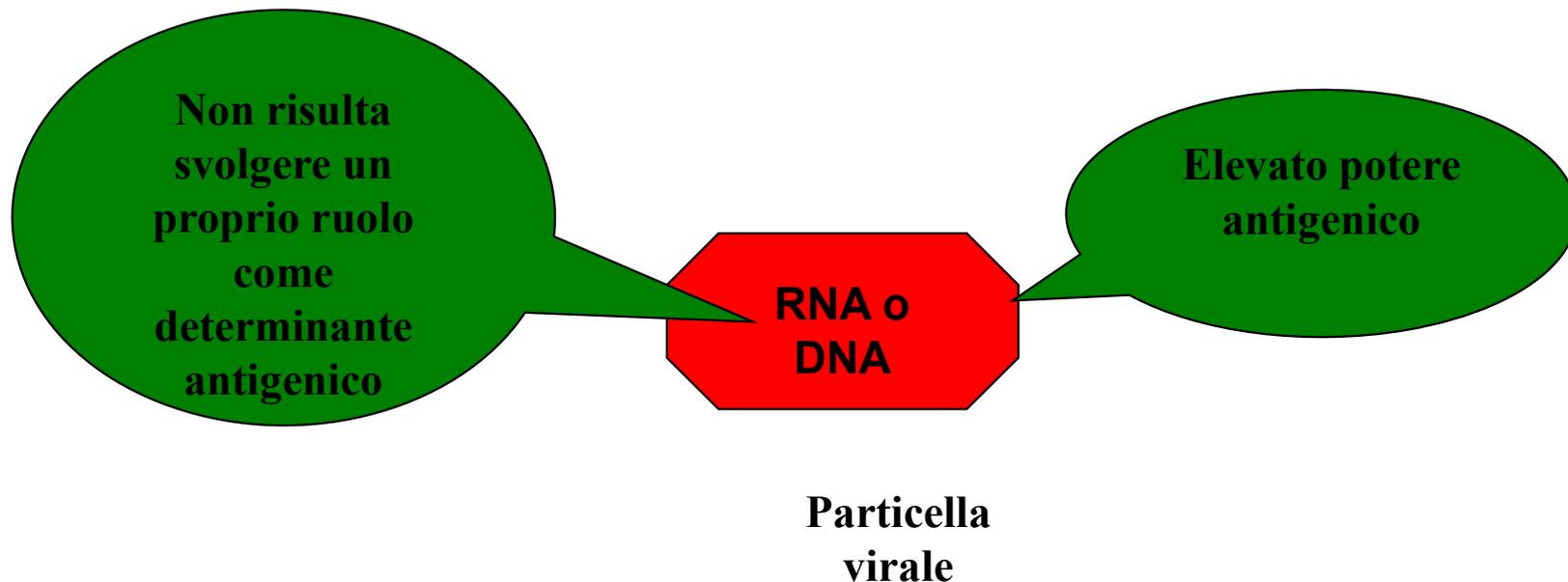
Anticorpi



In vivo

I VIRUS COME ANTIGENI

Entità infettive costituite da una o più molecole di RNA o DNA racchiuse da un involucro protettivo di natura proteica, capaci di organizzare la loro replicazione solamente all'interno di una cellula ospite

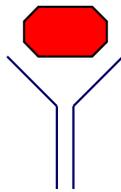


ANTIGENE



macromolecola organica e in particolare una proteina, che è in grado di stimolare una risposta immunologica (produzione di anticorpi) quando introdotta in un organismo animale.

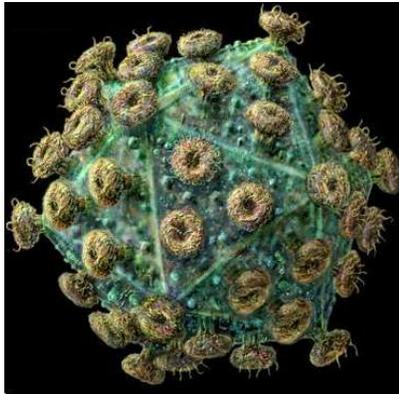
topo o coniglio



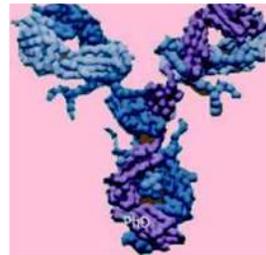
Gli ANTICORPI si combinano attraverso legami chimico fisici con le sostanze dette antigeni che li hanno determinati bloccandone così l'eventuale azione patogena

E' su tali meccanismi biologici (studiati in immunologia) che si basano le reazioni immunitarie attraverso le quali l'uomo e gli animali si difendono da possibili infezioni causate da virus, micoplasmi, batteri o funghi.

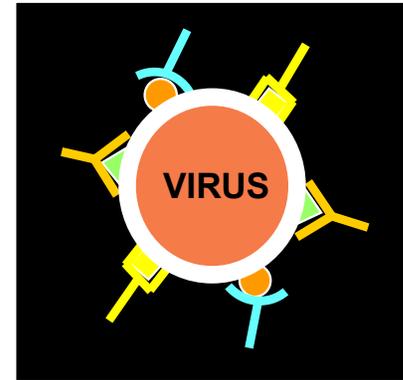
Diagnosi sierologica nata circa 40 anni addietro



Ag



Ab



Ag + Ab

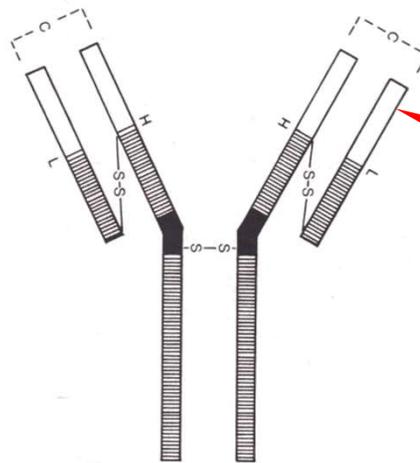
In vitro

ANTICORPI E ANTISIERI

Anticorpi sono delle proteine e precisamente delle immuno – globuline (Ig)

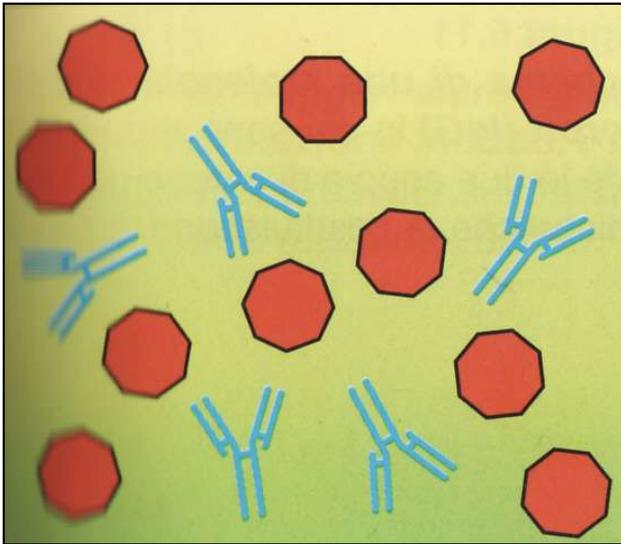
IgA IgD IgM IgG

Gli anticorpi che si formano contro i virus delle piante sono costituiti per la massima parte da IgG

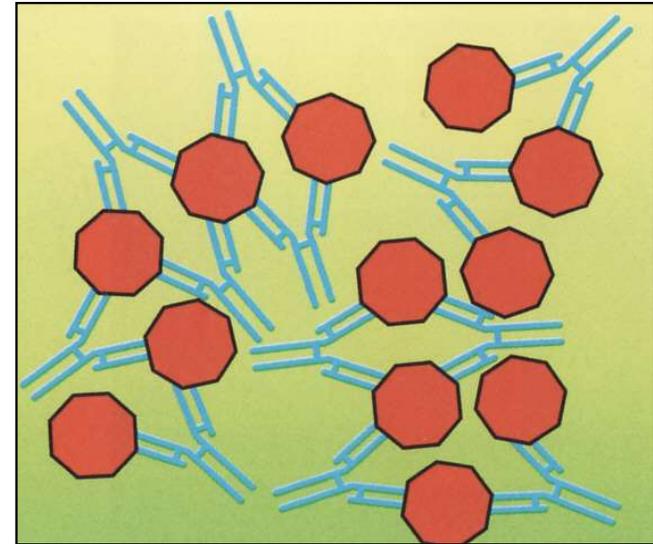


**Siti di
combinazione
mediante i quali
gli anticorpi si
agganciano alle
particelle virali
inattivandole.**

Rappresentazione schematica della specificità delle reazioni sierologiche



Virus e anticorpi
eterologhi non si
combinano

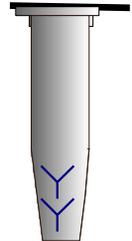


Virus e anticorpi **omologhi** si
combinano e danno origine a un
precipitato

ANTICORPI E ANTISIERI

Siero: liquido che si ottiene lasciando coagulare il sangue e centrifugandolo per allontanarne i precipitati

Antisiero: siero che contiene gli anticorpi



Le piante, non avendo tessuto linfatico né sistema sanguigno, non producono anticorpi. Quindi quando parliamo di anticorpi o antisiero contro un dato virus delle piante, intendiamo quelli prodotti in un animale da esperimento (generalmente topo o coniglio) nel quale il virus è stato appositamente iniettato

METODI SIEROLOGICI

La reazione antigene anticorpo viene rilevata in tre modi

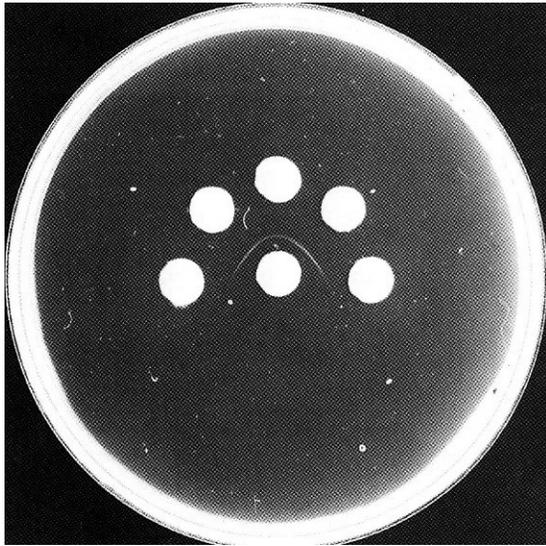
**Osservando la formazione
di un precipitato**

**Osservazione diretta al
microscopio elettronico**

Mediante reazione enzimatica

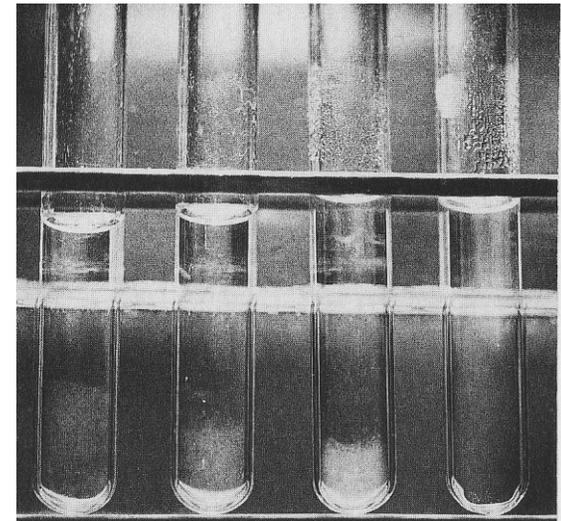
Formazione di un precipitato a 37- 38° C

- Le più antiche prove sierologiche
- Antigene e anticorpi formano un precipitato visibile ad occhio nudo



Doppia diffusione in gel di agar

Il riconoscimento specifico tra antigene ed anticorpo produce la formazione di un baffo di precipitato di colore bianco



In tubo

Il riconoscimento specifico tra antigene ed anticorpo viene rilevato attraverso la formazione di un lieve flocculato

Formazione di un precipitato

- ➔ **Queste reazioni sono di facile applicazione**
- ➔ **Non richiedono attrezzature particolari**
- ➔ **Sono poco sensibili**
- ➔ **occorre una elevata concentrazione di virus per ottenere la certezza della positività o negatività di una reazione**
- ➔ **non sono applicabili a casi di diagnosi precoce e/o massale**

Osservazione diretta al microscopio elettronico

**Immunomicroscopia
elettronica o metodo I.S.E.M.**

**L'avvenuta reazione fra antigene e
anticorpo si osserva al microscopio
elettronico**



Ingrandimenti fino a 200.000 X

Osservazione diretta al microscopio elettronico

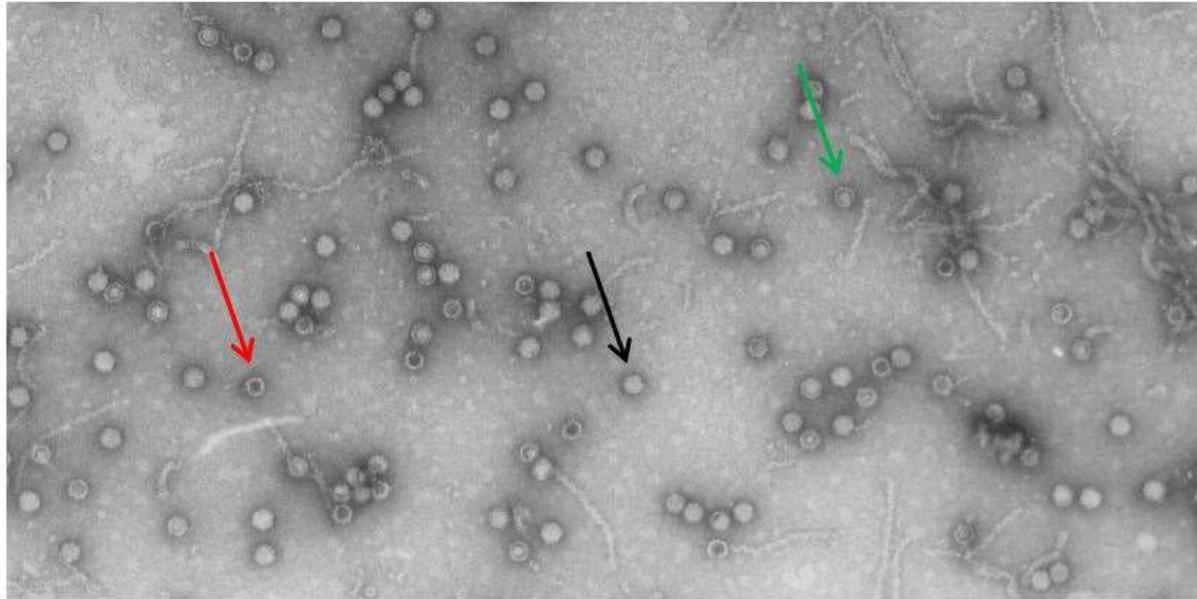
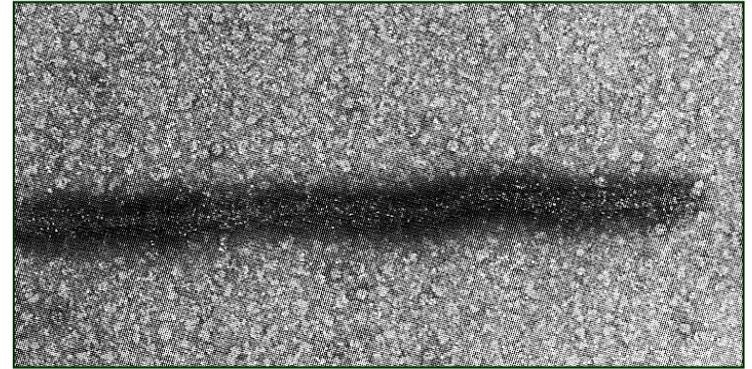


Fig. 22 – Osservazione al ME a trasmissione di un parziale purificato ottenuto da foglie infette di *N. benthamiana* inoculata con tessuto sintomatico di *Aeonium*. Le frecce indicano le tre tipologie di particelle di nepovirus.

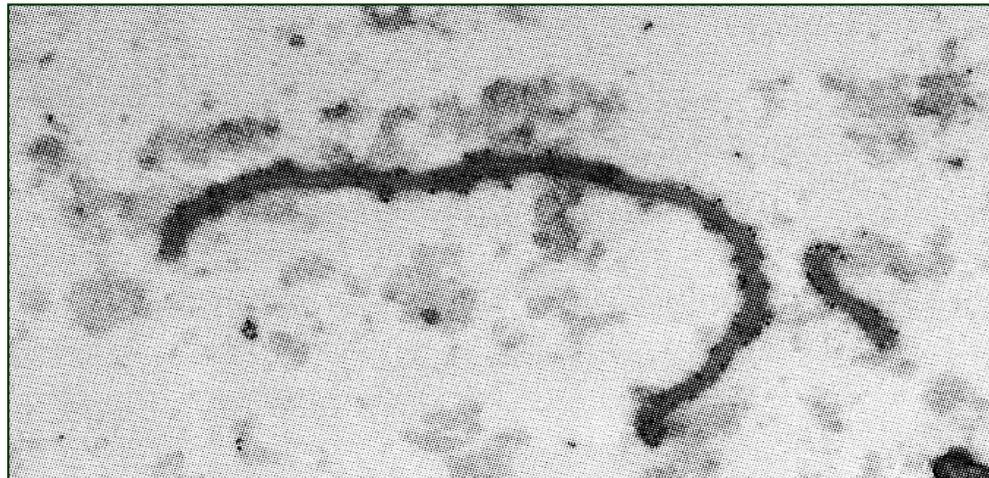
Osservazione diretta al microscopio elettronico



Particella di virus tubuliforme



Particella identica alla precedente dopo “decorazione” con anticorpi specifici in forma “nativa”



Particella identica alla precedente dopo “decorazione” con anticorpi coniugati a particelle di oro colloidale

Osservazione diretta al microscopio elettronico

Vantaggi e Svantaggi

- ➔ **E' molto sensibile**
- ➔ **Non è adatta a diagnosi massale**
- ➔ **E' molto costosa sia come apparecchiature che come gestione**
- ➔ **Necessità di personale altamente specializzato**

**Osservazione indiretta
Mediante reazione enzimatica**

- ❖ **ELISA – saggio immunologico con legame enzimatico**
- ❖ **DTBIA – saggio immunologico per impronta di tessuto**

Rappresentazione schematica ELISA

1



Il pozzetto viene riempito con l'antisiero ed alcuni anticorpi (IgG) aderiscono alle pareti

- Lavaggio -

2



Dopo il lavaggio, nel pozzetto rimangono solo gli anticorpi legati alle pareti

3



Il pozzetto viene riempito con il succo estratto dal campione infetto e le particelle virali vengono riconosciute e intrappolate dagli anticorpi

- Lavaggio -

4



Il pozzetto viene riempito con una preparazione di IgG coniugata con un enzima

- Lavaggio -

5



Il pozzetto viene riempito con una soluzione di substrato specifico per l'enzima

6



L'enzima digerisce il substrato producendo un colore giallo



Il materiale di cui è costituita la piastra è adatto a trattenere gli anticorpi

ELISA

Il metodo si basa sulla combinazione tra virus e anticorpi questa combinazione viene resa particolarmente vistosa da un procedimento di colorazione catalizzato da un enzima (fosfatasi alcalina) previamente legato agli anticorpi.

La reazione è ottenuta in singoli pozzetti di un'apposita piastra

- ✓ **Sospensione di anticorpi purificati**
- ✓ **L'estratto contenente il virus**
- ✓ **Una sospensione di anticorpi coniugati con l'enzima**
- ✓ **Il substrato (PNP), destinato a colorarsi di giallo in presenza dell'enzima**

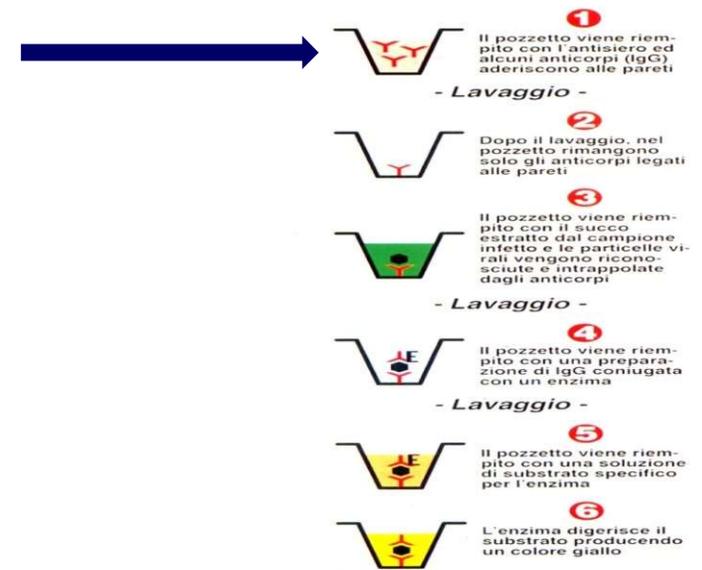
1) SENSIBILIZZAZIONE DELLA PIASTRA



Diluire l'**anticorpo** nel **tampone** (Coating buffer) alla diluizione raccomandata - 1:1000

Disporre 100 microlitri per pozzetto con una multicanale

Incubare a 37 °C per 4 ore oppure a 4 °C overnight

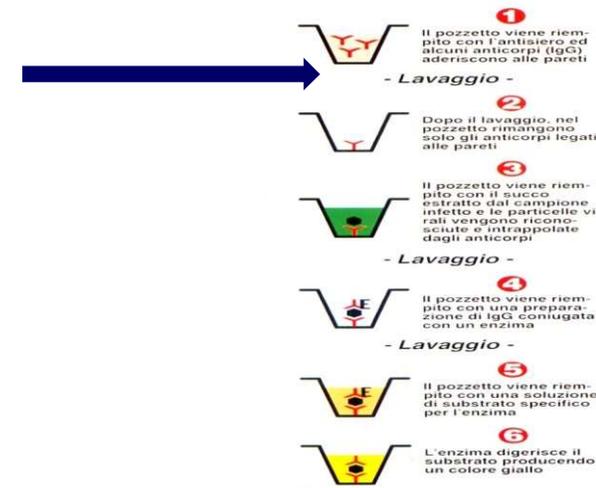


LAVAGGIO per allontanare gli anticorpi non fissati alla piastra

Lavare la piastra con con tampone di lavaggio (PBS-T) 3 volte



Si lascia agire (PBS-T) 3' ca ogni volta



2) PIASTRA SENSIBILIZZATA con anticorpi fissati al fondo

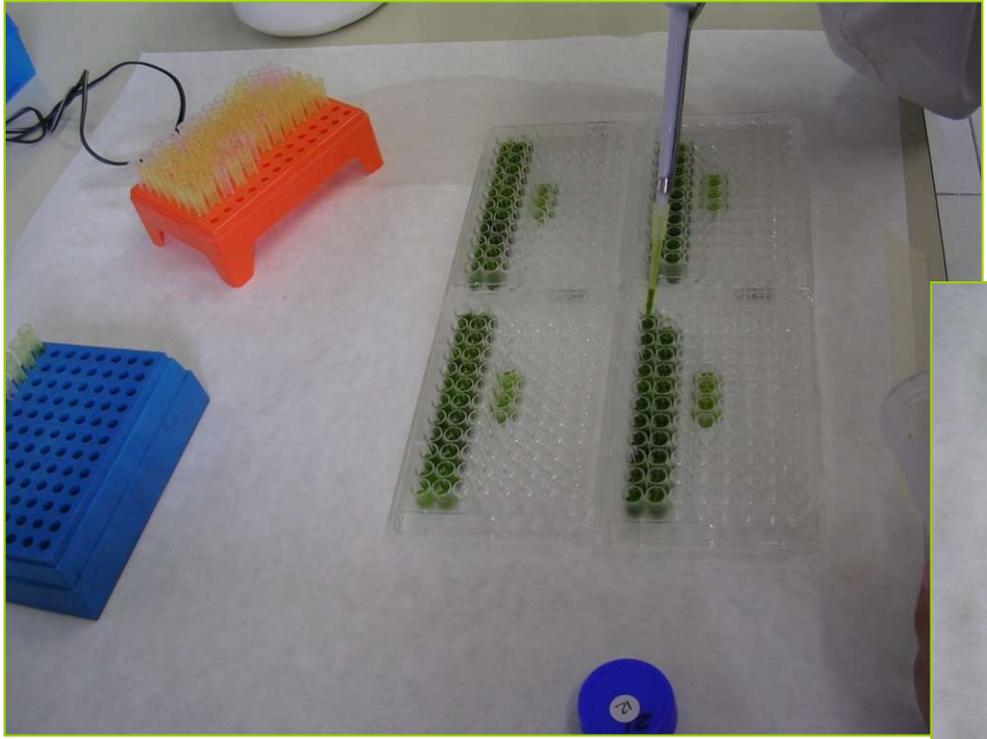
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

È preferibile scegliere la parte centrale della foglia con la nervatura mediana.

Pesare il campione e omogeneizzarlo in Tampone di Estrazione.

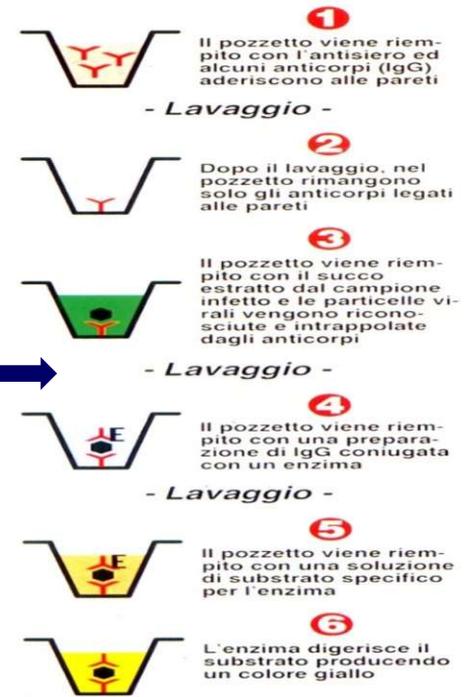


3) AGGIUNTA ESTRATTO VEGETALE



LAVAGGIO per rimuovere l'estratto

Lavare la piastra con tampone di lavaggio
(PBS-T) 3 volte lasciando agire PBS-T 3'



4) AGGIUNTA CONIUGATO

Aggiungere una diluizione 1:1000 di anticorpo coniugato diluito in tampone contenente fosfatasi alcalina (Conjugate Buffer), in misura di di 100 microlitri per pozzetto, con la pipetta multicanale.

Incubare per 2 ore e 30' a +37°C.



LAVAGGIO per allontanare gli anticorpi coniugati in eccesso non fissati

Lavare la piastra con con tampone di lavaggio (PBS-T) 3 volte



Si lascia agire (PBS-T) 3' ca ogni volta

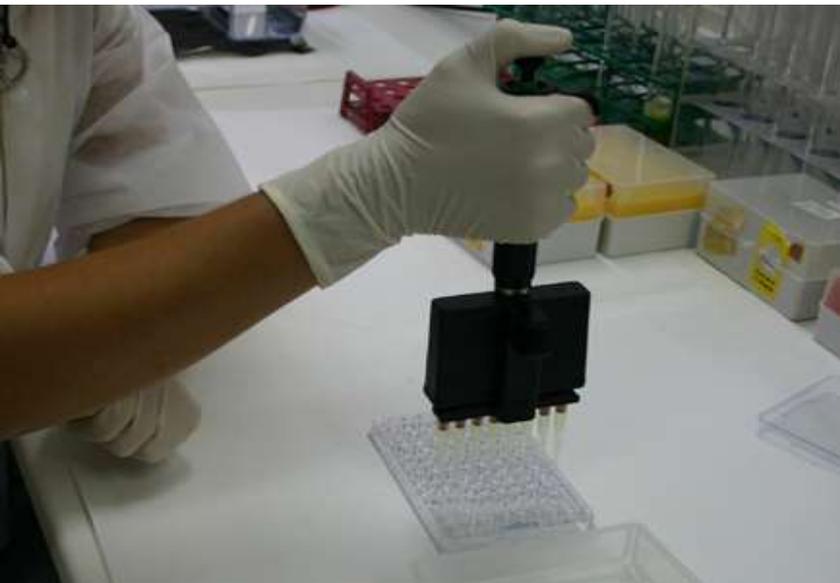


5) AGGIUNTA SUBSTRATO ENZIMATICO PNP

Sciogliere il PNP (para-nitro-fenilfosfato) nel tampone (substrate buffer) alla diluizione di 1:10

Incubare a temperatura ambiente per 30-60 minuti

I pozzetti corrispondenti al campione infetto assumono progressivamente una colorazione gialla.



6) LETTURA DEI RISULTATI

**Osservazione indiretta
Mediante reazione enzimatica**

Vantaggi

Economicità
Rapidità di esecuzione
Facilità di esecuzione
Assenza di sostanze tossiche
Adatti a saggi massali

Svantaggi

**Difficoltà in certi casi di disporre di
antisieri di buona qualità**
**Sensibilità inferiore rispetto ai
metodi molecolari**

**Osservazione indiretta
Mediante reazione enzimatica**

ELISA – saggio immunologico con legame enzimatico

❖ **DTBIA – saggio immunologico per impronta di tessuto**

DTBA : Dot Blot Immunosorbent Assay

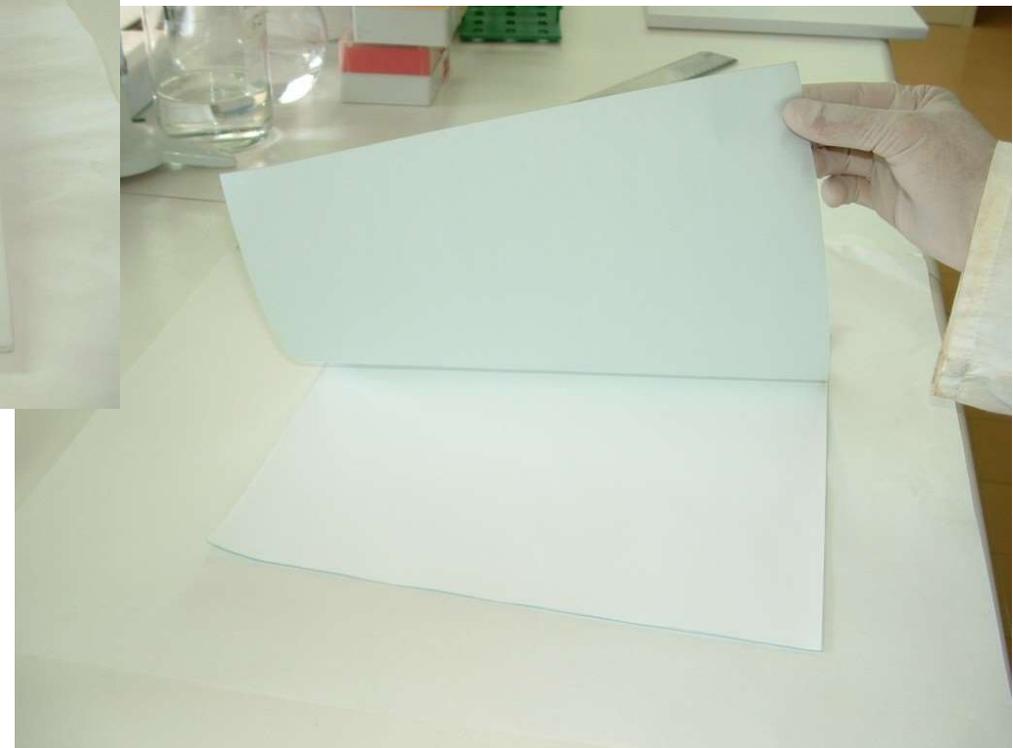
saggio immunologico per impronta di tessuto

L'antigene viene immobilizzato su un supporto solido costituito da un foglio di nitrocellulosa ed utilizzando anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina. Il segnale si sviluppa per reazione con BCIP-(5-bromo-4-Chloro-3-Indoly-Phosphate-p-toluidine) NBT(NitroBlue Tetrazolium chloride).

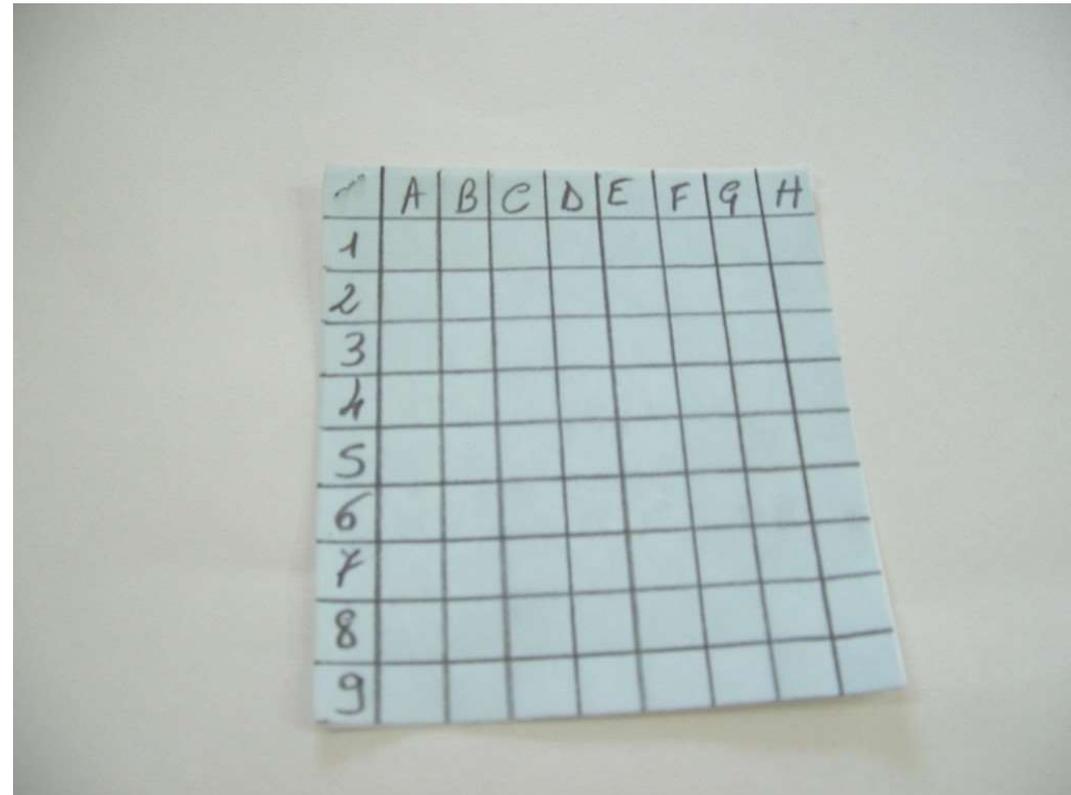
- **Preparazione delle membrane**
- **Impronta del campione**
- **Sviluppo della membrana**
- **Lettura dei risultati**

Necessarie circa 6 ore di lavoro

PREPARAZIONE DELLE MEMBRANE



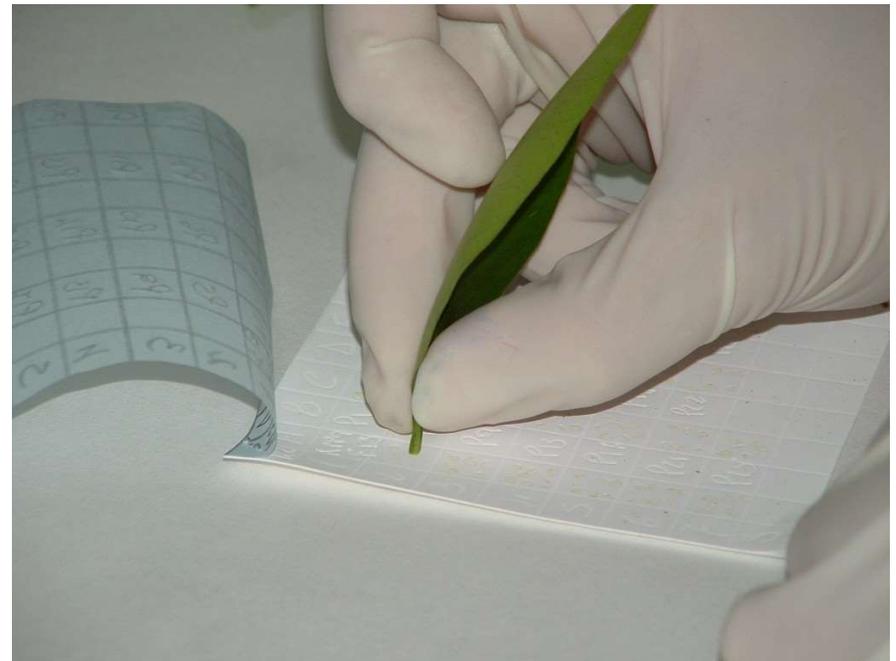
Si disegna una griglia per rendere facile la posizione e l'identificazione dei campioni.



Per ogni foglio (30 x 30 cm) vengono prodotte 9 membrane 10 x 10 cm, ognuna ha 72 riquadri.

DTBIA – saggio immunologico per impronta di tessuto

Le impronte sulla membrana possono essere effettuate con piccioli di foglia, frutti, radici e germogli



Dopo aver effettuato un taglio netto del campione si procede ad adagiare la sezione sulla membrana esercitando una leggera pressione

Per la realizzazione dell' impronta, in caso si sia acquisita una buona manualità si può operare in campo utilizzando supporti rigidi per appoggio della membrana, altrimenti portare i campioni in laboratorio e realizzare le impronte in condizioni ottimali.

Per ottenere una buona impronta rinnovare il taglio con un bisturi o altra lama affilata.

Attenzione: inserire in ogni membrana un campione positivo ed uno negativo

SVILUPPO DELLA MEMBRANA



Immergere la membrana in tampone di bloccaggio (BSA 1%) per 2 ore a temperatura ambiente, oppure overnight a +4°C

Lavare per tre volte con il tampone di lavaggio



Incubare con anticorpo specifico coniugato per 3 ore



Lavare tre volte con tampone di lavaggio

SVILUPPO DELLA MEMBRANA



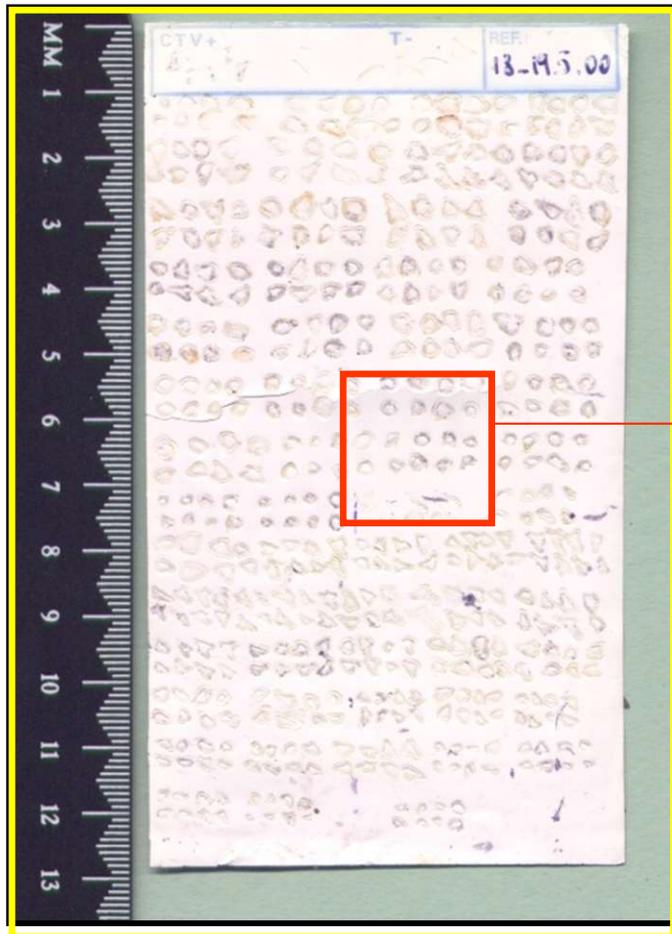
Immergere la membrana nella soluzione con substrato BCIP/NBT e osservare lo sviluppo del colore (10 minuti circa).

Fermare la reazione lavando la membrana con acqua distillata e lasciare asciugare su carta assorbente.

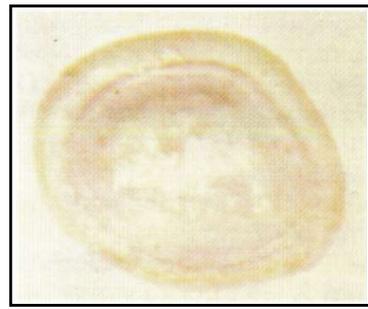
Lettura dei risultati



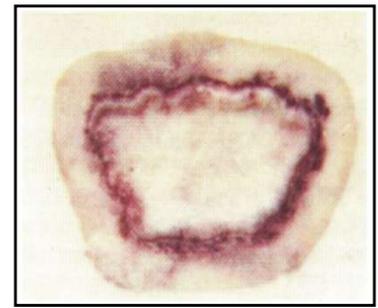
**Esame dei risultati con binoculare
(ingrandimento 10x o 20x)**



10 X



Campione sano



Campione infetto

La presenza di un precipitato violetto – porpora nell’area vascolare delle impronte rileva la presenza delle particelle virali.

CONFRONTO

ELISA

DTBIA

Attendibilità

72/150

70/150

Ingombro campioni

>

<

Tempo analisi in laboratorio

28 h

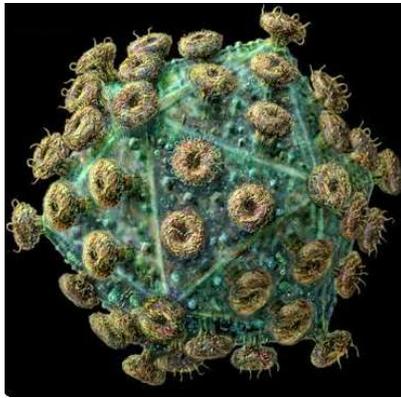
5 h

Conservazione dei campioni

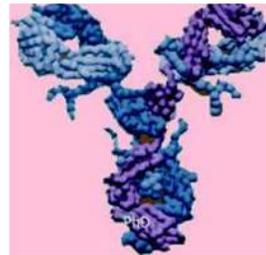
2 giorni

1 mese

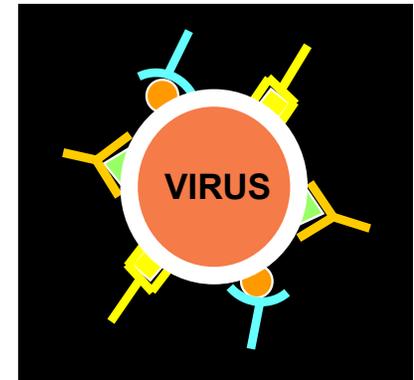
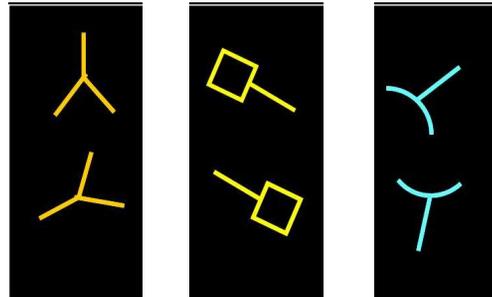
Determinanti genici o Epitopi = Zone specifiche dell'Ag



Ag



Ab diversi

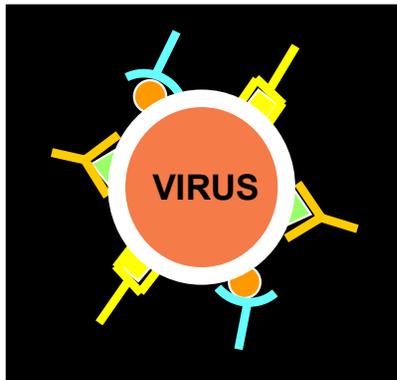


Ag + Ab

Anticorpi policlonali



miscela di anticorpi
specifici per i vari
determinanti antigenici



**Scarsa abilità a discriminare ceppi virali
della stessa specie**

Particelle virali altamente
purificate iniettate in



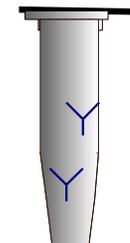
Coniglio



Prelievo del sangue e
coagulazione

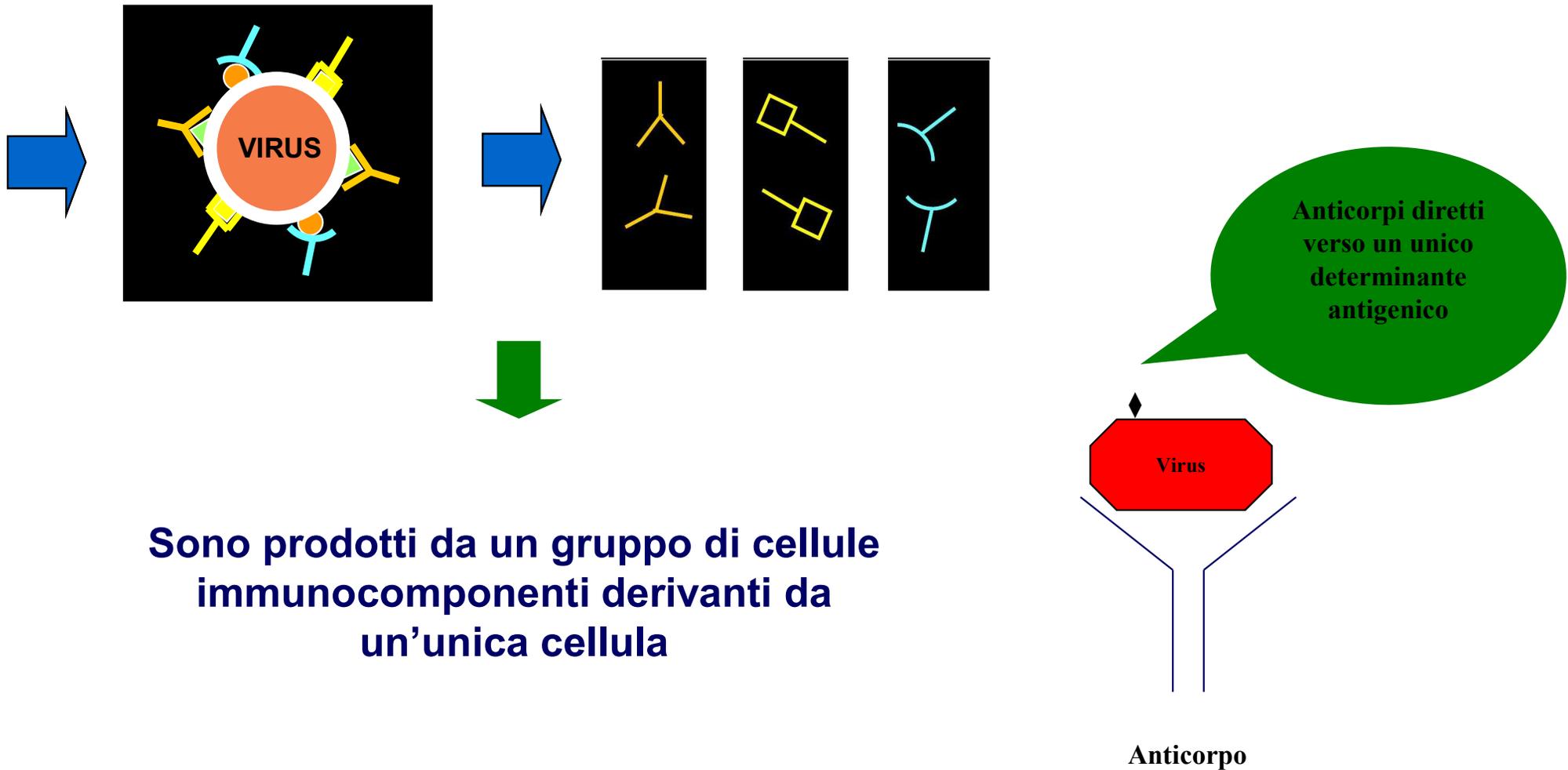


La parte liquida (siero) si
chiarifica mediante una
centrifugazione



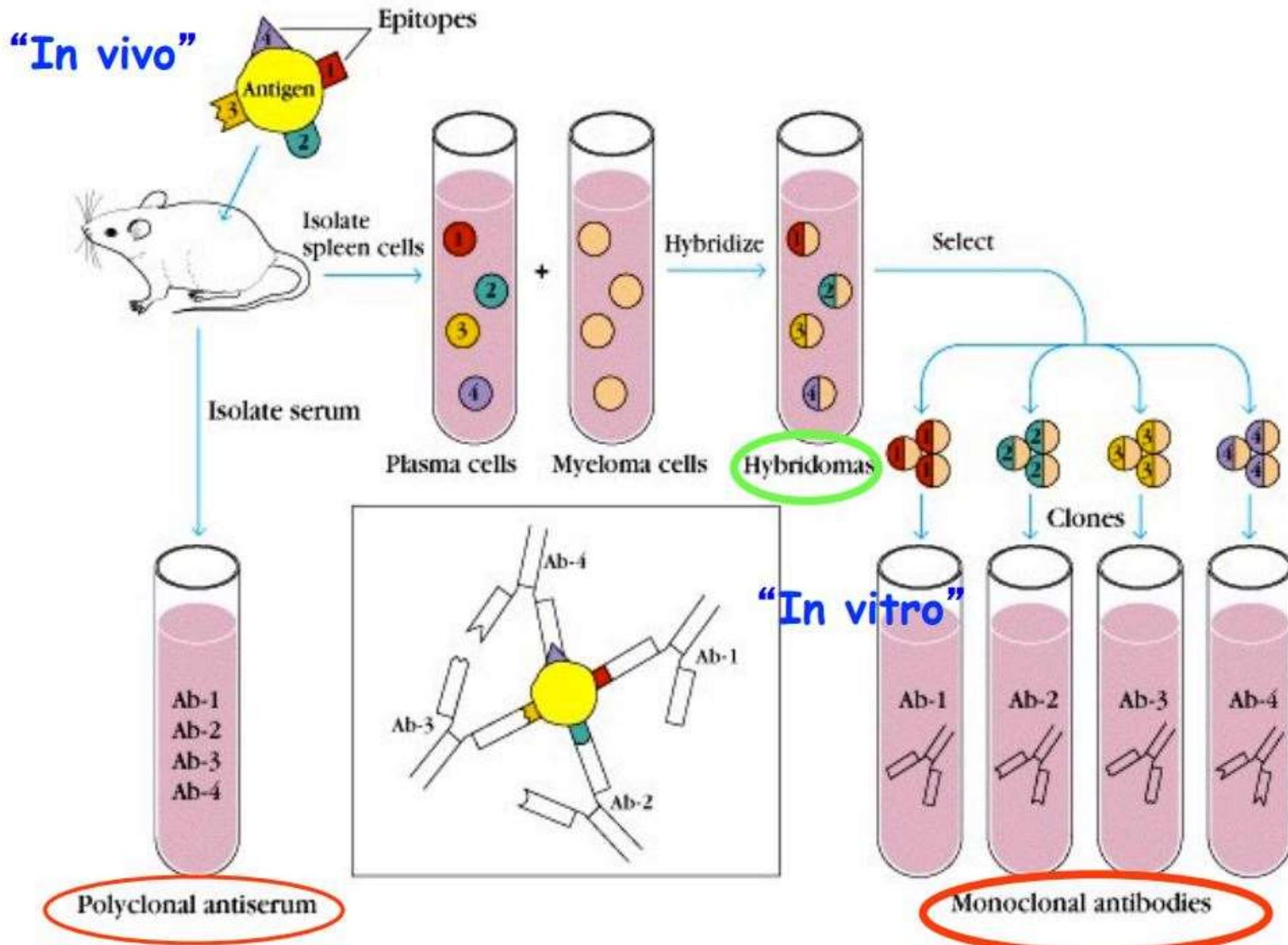
**Antisiero
pronto
per l'uso**

Anticorpi monoclonali



Anticorpi policlonali

Anticorpi monoclonali



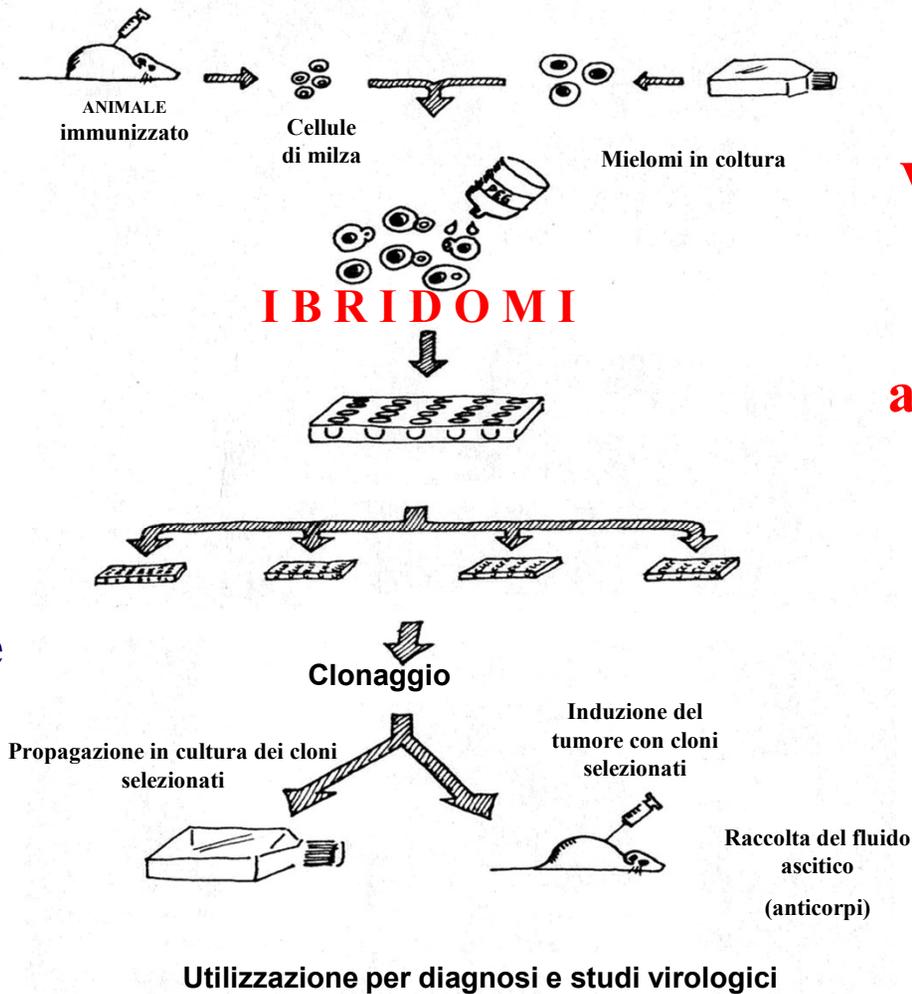
Produzione di anticorpi monoclonali

Gli **ibridomi** hanno:

la capacità dei linfociti di secernere anticorpi diretti verso un unico determinante antigenico

e

la capacità delle cellule tumorali di crescere indefinitamente in coltura



Vengono selezionati solo quelli che producono linee di anticorpi in grado di riconoscere determinanti antigenici diversi fra loro

Detection and serotyping of Mediterranean plum pox virus isolates by means of strain-specific monoclonal antibodies.

(PMID:10073231)

Abstract

Citations

Related Articles

Data

BioEntities

External Links

[Myrta A](#), [Di Terlizzi B](#), [Boscia D](#), [Caglayan K](#), [Gavriel I](#), [Ghanem G](#), [Varveri C](#), [Savino V](#)

[Acta Virologica](#) [01 Sep 1998, 42(4):251-253]

Type: Research Support, Non-U.S. Gov't, Journal Article

Abstract

Plum pox virus (PPV) is a major threat to the expanding Mediterranean stone fruit industry. In order to control the plum pox disease it is of utmost importance to detect early PPV foci and to identify the PPV isolates involved. A survey was therefore carried out in Albania, Cyprus, Egypt, Greece, Italy and Turkey by a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) with the following monoclonal antibodies (MAbs): 5B (universal), 4DG5 (PPV-D-specific), AL (PPV-M-specific), TUV and AC (PPV-C-specific), and EA24 (PPV-EI Amar-specific). A hundred and seventy Mediterranean PPV isolates were tested for strain type. PPV-M was detected in Albania, Cyprus, Greece, Italy, and Turkey; PPV-D was detected in Albania and Italy, whereas samples with natural mixtures of both strains were found in a couple of orchards in Albania. Seven PPV isolates from apricots in two Egyptian localities were recognized only by MAb EA24. In conclusion, DAS-ELISA with a combination of the universal MAb5B and the MAbs specific to the four PPV serotypes currently known (M, D, C and EI Amar) is an efficient tool for a simple, sensitive and routine detection of PPV and discrimination of its serotypes.

Plum Pox Virus (PPV)

Sharka dele drupaceae

Sintomi da PPV

Plum fruit



Apricot fruit



Apricot stone, PPV



Peach fruit



Plum leaves



Apricot leaves



Prune leaves



Peach leaves



**PPV -M : comune in europa est, centro e sud; ad elevata trasmissibilità
da afidi.**

Diffusa su pesco, ma colpisce anche susino ed albicocco

**PPV- D : comune in europa occidentale, scarsamente epidemico, via
afidi,**

Colpisce albicocco, pesco e susino

**PPV- C: su ciliegio (C: Cherry) in europa centro orientale ed in Italia, via
afidi**

PPV-EA (El Amar): da albicocco in egitto

Isolati di PPV

PPV-D

Dideron, Francia

PPV-M

Marcus, Grecia

PPV-C

Cherry

PPV-EA

El Amar

Nei casi in cui

-non si disponesse di anticorpi monoclonali

- o fosse necessaria una elevata sensibilità diagnostica

-o per l'individuazione dell'origine filogenetica dei diversi isolati

I metodi sierologici (DTBIA ed ELISA) devono essere associati ai

SAGGI BIOLOGICI E MOLECOLARI

IL SAGGIO

BIOLOGICO

Diagnosi per i virus

CRITERI GENERALI

1. VERIFICA INIZIALE CHE SI TRATTI DI MALATTIA VIRALE

- OSSERVAZIONE DEI SINTOMI
- TIPOLOGIA
- DISTRIBUZIONE
 - nel campo
 - sulla pianta

2. IDENTICAZIONE DEL VIRUS



- DIAGNOSI BIOLOGICA : RISPOSTA SINTOMATICA SU PIANTE TEST e PROTEZIONE INCROCIATA
- DIAGNOSI SIEROLOGICA
- OSSERVAZIONE AL M.E. DI ESTRATTI GREZZI, DI SEZIONI ULTRASOTTILI
- PURIFICAZIONE DEL VIRUS E SUA OSSERVAZIONE AL M.E.
- DIAGNOSI MOLECOLARE : RT-PCR

Diagnosi per i virus

SAGGIO BIOLOGICO
su piante indicatrici (test)



PIANTE INDICATRICI O PIANTE TEST

Una specie o cultivar che risponde con sintomi tipici

VIRUS

MICROORGANISMO

SOSTANZA FITOTOSSICA

PIANTE INDICATRICI

ARBOREE



ERBACEE



IMPORTANZA

Saggio Biologico

1. quando non si dispone di laboratori
2. ottenimento del patogeno in grandi quantità
3. unico saggio per gli agenti di malattia non ancora individuati
4. caratterizzazione biologica del patogeno
 - longevità *in vitro*
 - punto di diluizione limite
 - punto di inattivazione termica

4. caratterizzazione biologica del patogeno

- a) longevità *in vitro*
- b) punto di diluizione limite
- c) punto di inattivazione termica

- a) durata dell'infettività del virus nel succo cellulare a 20 °C (1h/1 anno)
- b) diluizione massima per il mantenimento dell'infettività ($10^{-1}/10^{-7}$)
- c) temperatura minima di inattivazione per 10 min. (55°C/70°C)

VIRULENZA degli isolati

IMPORTANZA Saggio Biologico

caratterizzazione biologica di CTV

Innesto su limetta messicana (*Citrus aurantifolia*)



ceppo blando



ceppo virulento

Saggio biologico di CTV su a. amaro

DISTINGUE I CEPPI BLANDI



Perché caratterizzare i ceppi per la virulenza ???

PROTEZIONE INCROCIATA CON CEPPI BLANDI



premunizzazione dai ceppi virulenti mediante
inoculazione artificiale con ceppi blandi dello
stesso virus

CTV Citrus tristeza virus
PSTV potato spindle tuber viroid (PSTV)
CEV citrus exocortis viroid
CSV chrysanthemum stunt viroids in tomato or chrysanthemum

SOLA DIFESA DAI CEPPI ESOTICI DI CTV !!!