

Protocollo di DAS-ELISA per la diagnosi di *Xylella fastidiosa* in piante ornamentali

Ciascun campione da sottoporre al saggio ELISA consiste in 5-10 foglie (a seconda delle dimensioni e consistenza) e porzioni di fusto raccolti in corrispondenza di presunti sintomi, qualora presenti, o da diverse parti della pianta, affinché il campione sia rappresentativo dell'intera pianta. Il test prevede l'impiego di un kit ELISA commerciale (Agritest), validato per l'uso su numerose specie vegetali.

Il protocollo di DAS-ELISA consta delle fasi di seguito descritte.

1. Sensibilizzazione

Diluire gli anticorpi (IgG) specifici a *X. fastidiosa* (anti-Xf IgG) in 'coating buffer' seguendo le indicazioni allegate al kit ed aliquotare 200 µl della soluzione in ciascun pozzetto di una micropiastra per ELISA. Coprire la piastra, porla in una camera umida e lasciare in incubazione alla temperatura di 37° C per 4 ore.

1'. Lavaggi

Lavare 4 volte la piastra con 'washing buffer' per 3 min/lavaggio.

2. Preparazione dei campioni vegetali e incubazione con l'antigene

Per ciascun campione preparare almeno 0,5 g di tessuto vegetale ottenuto da piccioli, parti basali delle foglie e piccole porzioni di fusto; trasferirlo in bustina per estrazione e aggiungere 'extraction buffer' in rapporto di 1:10 p/V. Sterilizzare, tra un campione e il successivo, la lama usata per tagliare i tessuti. Triturare mediante un omogeneizzatore semi-automatico o un apparecchio simile e trasferire il succo vegetale in una provetta siglata, in modo da favorire la precipitazione dei residui vegetali fino al momento dell'uso. Preparare anche i controlli positivi e negativi, rappresentati da estratti vegetali di piante, rispettivamente, infette e sane per ciascuna delle specie incluse nel test diagnostico, qualora disponibili o, in alternativa, usare i controlli forniti col kit. Dispensare 200 µl del succo ottenuto da ogni campione in ciascun pozzetto della micropiastra.

Coprire la piastra, porla in una camera umida e lasciare in incubazione a 4 °C per tutta la notte.

2'. Lavaggi

Ripetere la fase 1'.



3. Aggiunta degli anticorpi coniugati ad enzima

Diluire gli anticorpi specifici a *X. fastidiosa* e coniugati alla fosfatasi alcalina (anti-Xf IgG-AP) in 'conjugate buffer' secondo quanto riportato dal kit. Dispensare 200 µl in ciascun pozzetto della piastra. Coprire la piastra, porla in una camera umida e lasciare in incubazione a 37° C per 4 ore.

3': Lavaggi

Ripetere la fase 1'.

4. Aggiunta del substrato

Sciogliere il para-nitrofenilfosfato (1 mg/ml) in 'substrate buffer' e dispensare 200 µl per pozzetto. Lasciare la piastra a temperatura ambiente (18-25° C) per almeno 2-3 ore, fino ad osservare il viraggio di colore (giallo). Misurare la densità ottica (OD) a di 405 nm dopo 60, 120, 180 minuti, mediante un lettore di piastre, per rilevare se ci sono dei campioni positivi a *X. fastidiosa*.

I campioni sono da considerare positivi quando il valore dell'OD è almeno triplo rispetto a quello relativo al controllo negativo.

La reazione enzimatica può essere bloccata mediante aggiunta di 25µl/pozzetto di idrossido di sodio.

Tamponi Elisa

PBS (pH 7,4)		Coating Buffer		Conjugate Buffer	
NaC	8 g	(1 l; pH 9,6)		(1 l; pH 7,4)	
KH ₂ PO ₄ anidro	0,2 g	Na ₂ CO ₃ anidro	1,59 g	PBST	1 l
Na ₂ HPO ₄ anidro	1,15 g	NaHCO ₃	2,93 g	PVP-25	20 g
KCl	0,2 g	Conservare a 4°C		BSA	2 g
				Conservare a 4°C	
Washing Buffer (PBST)		Extraction Buffer		Substrate Buffer	
PBS	1 l	(1 l; pH 7,4)		(1 l; pH 9,8)	
Tween-20	0,5 ml	PBST	1 l	Dietanolamina	97 ml
		Polivinilpirrolidone-25	20 g	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,2 g
		Albumina di Siero Bovino	2 g	Conservare a 4° C	
		Conservare a 4°C			

Riferimenti bibliografici

EPPO, PM. 7/24 (4). *Xylella fastidiosa*. EPPO Bull. 2019, 49, 175–227, Appendix 1.

Loconsole, G., O. Potere, D. Boscia, G. Altamura, K. Djelouah, T. Elbeaino, D. Frasheri, et al. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology* 96, n. 1: 7–14. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.041>.

