

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 12

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di Pospiviroidi da foglie
di pomodoro**

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GdL Laboratori	CFN 28/06/2022	29/09/2022	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 2 di 11

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Pospiviroidi su foglia di pomodoro	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 3 di 11

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 per quanto concerne la protezione delle piante.

Secondo quanto definito dal Regolamento (UE) 2017/625, le autorità competenti designano laboratori ufficiali cui far effettuare analisi, prove e diagnosi di laboratorio a partire da campioni prelevati durante i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali nello Stato membro nel cui territorio operano tali autorità competenti.

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 e 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'articolo 8 e dall'articolo 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 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 senza ulteriore validazione purché:

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 4 di 11

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

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

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 5 di 11

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. 19 del 2 febbraio 2021. Norme per la protezione delle piante dagli organismi 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.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 6 di 11

Pospiviroidi su foglia di pomodoro

Metodo diagnostico validato dal CREA-DC e che rientra nello scopo di accreditamento del DIALAB

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo)	Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) Citrus exocortis viroid (CEVd) Columnea latent viroid (CLVd) Iresine viroid 1 (IrVd-1) Mexican papita viroid (MPVd) = tomato planta macho viroid (TPMVd) Pepper chat fruit viroid (PCFVd) Potato spindle tuber viroid (PSTVd) Tomato apical stunt viroid (TASVd) Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)
Tassonomia	Famiglia: Pospiviroidae Genere: <i>Pospiviroid</i>
Avversità causata	nanismo del crisantemo (CSVd) exocortite degli agrumi (CEVd) viroide latente della Columnea (CLVd) viroide 1 dell'Iresina (IrVd-1) viroide messicano del pepino (MPVd) o "planta macho" del pomodoro (TPMVd) ingiallimento e nanismo della bacca di peperone (PCFVd) affusolamento dei tuberi di patata (PSTVd) nanismo apicale del pomodoro (TASVd) nanismo clorotico del pomodoro (TCDVd)

1. Protocollo di diagnosi dei pospiviroidi del pomodoro

Il protocollo diagnostico rileva la presenza di agenti patogeni di tipo viroidale, appartenenti al genere pospiviroidi, tramite reazione di retrotrascrizione ed amplificazione molecolare (RT-PCR) in singolo stadio. Il presente metodo di prova è stato validato a partire da foglie di pomodoro. Il protocollo consente l'identificazione, ma non la caratterizzazione, di tutti le specie appartenenti al genere pospiviroidi, ad eccezione del PCFVd.

Il metodo necessita di materiale vegetale ben conservato, prelevato in piena fase vegetativa delle piante e non interessato da segni di senescenza o dalla presenza di marciumi. Il campione deve essere conservato in buste sigillate a $6^{\circ}\text{C} \pm 3$ per un breve periodo (max 7 gg).

2. Estrazione dell'RNA

La procedura di estrazione dell'RNA prevede l'impiego del kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) previa macerazione del campione in tampone di estrazione fosfato la cui composizione è descritta nella successiva tabella 1.

Tabella 1. Composizione del tampone PO_4

Tampone di estrazione PO_4	portare ad 1 L con acqua distillata
Na_2HPO_4 0,5 M	57 mL
KH_2PO_4 0,5 M	143 mL

Preparare il tampone rispettando le concentrazioni dei reagenti sopra specificate.

Portare/aggiustare a pH 7,2.

Possono essere preparati anche volumi minori di soluzioni rispettando le proporzioni di sali e soluzioni.

Le soluzioni di Na_2HPO_4 0,5 M e di KH_2PO_4 0,5 M possono essere conservate a temperatura ambiente fino a sei mesi dalla preparazione. Il tampone PO_4 può essere conservato dopo la preparazione fino a tre mesi a $4^{\circ}\text{C} \pm 3$.

Procedura di estrazione

- Prelevare una porzione omogenea della matrice da cui si vuole estrarre l'acido nucleico (ad esempio, in presenza di un campione costituito da un pool di foglie, assicurarsi di prendere una porzione di ogni foglia che compone il campione) e riporre 1 g di tessuto nella corrispondente bustina numerata.
- Omogeneizzare il tessuto fogliare insieme a 10 mL di tampone PO_4 (rapporto peso volume da 1:10). Prelevare 100 μL di omogenizzato e proseguire secondo il manuale d'uso del kit aggiungendo 380 μL di tampone RLT e caricando tutto sulla colonnina viola – "QIAshredder spin column"; – centrifugare 2 minuti a massima velocità
- Trasferire tutto il liquido in un nuovo tubo (circa 450 μL) e aggiungere 0,5 volumi di etanolo assoluto (circa 225 μL) e mescolare pipettando bene.
- Trasferire la soluzione (circa 675 μL) nelle colonnine rosa - "RNeasy spin column" - e centrifugare per 15 sec a 11000 rpm, eliminare il lisato.
- Aggiungere alla colonnina 700 μL di buffer RW1 e centrifugare per 15 s a 11000 rpm, eliminare il filtrato.
- Aggiungere 500 μL di buffer RPE (precedentemente eluito con l'opportuna quantità di etanolo. Centrifugare per 15 s a 11000 rpm. Eliminare l'eluato e ripetere il passaggio centrifugando a 11000 rpm per 2 min.

- Centrifugare a velocità massima per 1 minuto a vuoto.
- Posizionare la colonnina rosa su un tubo da 1,5 mL, aggiungere 50 µL di acqua RNase-free, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 9500 rpm per eluire l'RNA.

3. Metodo di prova RT-PCR

Primers

Le sequenze dei primers da utilizzare sono riportate nella seguente tabella.

Tabella 1. Primers utilizzati per l'amplificazione in RT-PCR

POP REV	5'- GGTCAGGWGWHACCACAGGAACC - 3'
POP1 FW	5'- AGAAGTCCTTCAGGGATCC -3'
POP3 FW	5'- AAGAGCGGTCTCAGGAGCC -3'

Miscela di reazione

Preparare la miscela di reazione come descritto nella tabella 2.

Per ogni reazione di amplificazione prevedere i seguenti controlli:

- Controllo positivo – campione vegetale infetto da una specie del genere pospiviroidi della stessa matrice e della stessa specie dei campioni saggiati, proveniente da pianta sicuramente infetta, previo accertamento tramite clonaggio e sequenziamento del patogeno.
- Controllo negativo – campione vegetale esente (sano) da ogni specie di pospiviroidi della stessa matrice e della stessa specie dei campioni saggiati, proveniente da una pianta sicuramente sana, previo accertamento con saggio biologico.
- Controllo bianco – costituito dalla miscela di amplificazione dove non viene posto l'RNA target ma il controllo acqua.

Tabella 2. Miscela di reazione per l'amplificazione in RT-PCR

Miscela di reazione	Volume (µL)	Concentrazione finale
Acqua RNasi-free	29	-
GoTaq DNA polimerasi buffer	10	1X
dNTPs (totale)	2	1,6 mM

Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 9 di 11

DTT	2	0,4 mM
POP-REV	2	0,4 μ M
POP1-FW	1,5	0,3 μ M
POP3-FW	0,5	0,1 μ M
AMV-RT	0,25	2,5 U
Taq DNA polimerasi	0,25	1,25 U
Inibitore delle Rnasi	0,5	20 U
RNA totale estratto (TRNA)	2	
Totale	50	-

Ciclo termico di amplificazione

Il ciclo di termico per la reazione RT-PCR è riportato nella tabella 3.

Tabella 3. Ciclo termico per l'amplificazione in RT-PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione	46°C	30'	1
Denaturazione	94°C	3'	1
Amplificazione	94°C	30''	} 35
	62°C	30''	
	72°C	60''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Hold	4°C	10'	1

Elettroforesi su gel di agarosio

Preparare un gel di agarosio 1,2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 10 μ L di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 2 μ L di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 60 minuti.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.12	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospivoidi su foglia di pomodoro	Pag. 10 di 11

3.1 Valutazione dei risultati

L'esito del saggio si basa sull'espressione qualitativa che rileva l'assenza/presenza del patogeno target.

Se il saggio è positivo (presenza dell'analita) per i pospiviroidi si osserverà una banda di 300 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo ed in corrispondenza della banda o tra le bande a lunghezza nota del marker.

4. Dati di validazione così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione

I materiali biologici di riferimento utilizzati sono campioni provenienti dalla collezione di piante infette da pospiviroidi presente presso il CREA-DC (sede di Roma). La presenza/assenza dei viroidi è stata confermata sia da analisi diagnostiche sia tramite sequenziamento. In particolare, sono stati usati campioni rappresentati da: piante di pomodoro infette da tutti i pospiviroidi diagnosticati dal metodo, piante di pomodoro sane e piante infette da patogeni non target.

Le piante utilizzate come controlli negativi e positivi sono riportate di seguito in tabella 4.

Tabella 4. Materiali di riferimento utilizzati per la validazione

MATERIALI DI RIFERIMENTO UTILIZZATI			
N°	ETICHETTA	STATO FITOSANITARIO	CODICE IDENTIFICATIVO CAMPIONE NELLA VALIDAZIONE
1	<i>S. lycopersicum</i>	Sano	MR5
2	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto da ToBRFV	MR50
3	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto da PePMV	PePMV-4
4	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto da ToMMV	PV-1267
5	<i>Citrus spp.</i>	Infetto da HSVd	CMC-B
6	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto CEVd	MR6
7	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto CLVd	MR44
8	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto CSVd	MR45
9	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto MPVd	MR46
10	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto PSTVd	MR47
11	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto TASVd	MR48
12	<i>S. lycopersicum</i>	Infetto TCDVd	MR49

Tutti i dati sono stati ottenuti mediante le procedure sperimentali descritte ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e i valori ottenuti sono riportati in tabella 5.

Tabella 5. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti per il metodo di prova RT-PCR

Criterio di performance scelto per la validazione	Valori di performance ottenuti	Adeguatezza in base all'analisi dei rischi di validazione per lo scopo e l'utilizzo previsti	Documentazione disponibile presso il DIALAB
Sensibilità analitica (LOD)	10 ⁻³	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Sensibilità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Specificità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Ripetibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Riproducibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)