

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 18

Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Ceratocystis platani*

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. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 2 di 10

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Ceratocystis platani</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 3 di 10

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. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 4 di 10

- 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. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 5 di 10

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. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 6 di 10

Ceratocystis platani

Classificazione dell'agente eziologico

Nome	Teleomorph: <i>Ceratocystis platani</i> (J. M. Walter) Engelbr. & T. C. Harr. Anamorph: <i>Thielaviopsis</i> (Paulin-Mahady <i>et al.</i> , 2002)
Tassonomia	Ordine: <i>Microascales</i> Famiglia: <i>Ceratocystidaceae</i> Genere: <i>Ceratocystis</i>
Avversità causata	Cancro colorato (Canker stain) del platano

1. Protocollo di diagnostico di *Ceratocystis platani*

Il protocollo diagnostico per *Ceratocystis platani* è basato sulla tecnica della Real-time PCR, eseguita sia con chimica EvaGreen/Sybr Green sia con utilizzo di sonda TaqMan, ed è finalizzato all'identificazione molecolare di *C. platani* a partire da matrice infetta.

Di seguito si riporta il diagramma di flusso relativo al processo diagnostico per il rilevamento di *C. platani*.

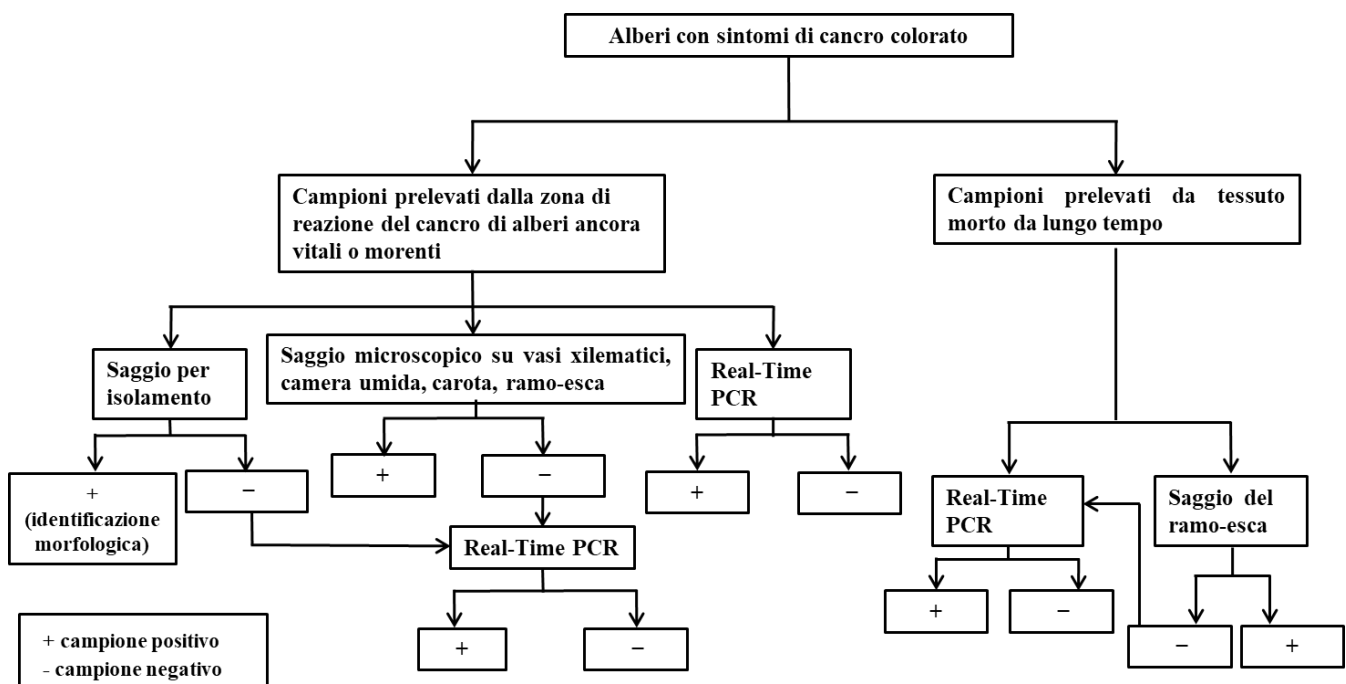


Figura 1. Diagramma di flusso del processo da utilizzare per il rilevamento di *C. platani*

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 7 di 10

2. Estrazione del DNA

Il processo di estrazione del DNA è comune alle due tipologie di Real Time PCR (EvaGreen/Sybr Green e sonda TaqMan)

Per l'estrazione del DNA fungino si segue la procedura descritta nel manuale d'uso del DNeasy® Plant Mini Kit, QIAGEN.

Gli eluati ottenuti possono essere quantificati mediante lettura allo spettrofotometro (o al nanodrop).

3. Metodo di prova Real Time PCR

Entrambe le metodiche di Real Time PCR descritte in questo protocollo diagnostico, prevedono l'utilizzo della stessa coppia di primers, le cui sequenze sono riportate nella successiva tabella 1 e lo stesso ciclo termico di amplificazione.

Tabella 1. Primers utilizzati per l'amplificazione in Real Time PCR (EvaGreen/SybrGreen e TaqMan)

Forward	5'-CGTACCTATCTTGTAGTGAGATGAATGC-3'
Reverse	5'-GAGTTTACAGTGGCGAGACTATACTG-3'

Per ogni evento di amplificazione Real Time PCR è opportuno predisporre i seguenti controlli:

- controllo NTC ("No Template Control") in cui il template è sostituito con H₂O. Si consiglia di inserirne uno ogni 15-20 campioni saggiati;
- controllo negativo: contenente DNA genomico estratto da legno di platano non infetto (legno sano);
- controllo positivo: DNA genomico di un isolato di *C. platani* da usare come riferimento
- controllo positivo: template costituito da DNA estratto da legno infetto da *C. platani* accertato con precedenti analisi.

3.1. Metodo di prova Real Time PCR (fluoroforo EvaGreen/Sybr Green)

In questo metodo di prova, vengono utilizzati fluorofori quali EvaGreen o in alternativa SybrGreen, come agenti intercalanti al DNA a doppio filamento.

- Preparare la miscela di reazione come descritto nella tabella 2.

Tabella 2. Miscela di reazione per l'amplificazione Real Time PCR (EvaGreen/Sybr Green)

Documento tecnico ufficiale n. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 8 di 10

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
Acqua	Variabile	-
SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad) o SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad)	10	1X
Primer forward	1	0,5 µM
Primer reverse	1	0,5 µM
DNA totale estratto (TDNA)	Variabile	1-5 ng
Totale	20	

- Dispensare la miscela di reazione nei pozzetti di una piastra o in tubi da PCR ed aggiungere il quantitativo di DNA stabilito.
- Chiudere la piastra con l'apposita pellicola ottica o il tappo dei tubi da PCR, caricare sul termociclatore ed avviare il programma di amplificazione (tabella 3).

Tabella 3. Ciclo termico per l'amplificazione Real time PCR con EvaGreen/SybrGreen

	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione	96°C	3'	1
Amplificazione	95°C	10''	} 40
	66°C	20''	
Estensione finale	72°C	5'	1
<i>Curva di melting</i>	incrementi di 0,1°C ogni ciclo da 55° a 95°C.		

3.2. Metodo di prova Real Time PCR (sonda TaqMan)

In questo metodo di prova, i primers (tabella 1), vengo impiegati insieme alla sonda TaqMan riportata di seguito:

5'-FAM-CGGTGCCCTTCAGAAGGGCCCTACCACC-BHQ-3'

- Preparare la miscela di reazione come descritto nella tabella 4.

Tabella 4. Miscela di reazione per l'amplificazione Real Time PCR (TaqMan)

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
Acqua	variabile	-
2X SsoFast™ Probes Supermix BIO-RAD	10	1X
Primer forward	1	0,5 µM
Primer reverse	1	0,5 µM
Sonda TaqMan	0,3	0,3 µM
RNA totale estratto (TRNA)	Variabile	1-5 ng
Totale	20	

- Dispensare la miscela di reazione nei pozzetti di una piastra o in tubi da PCR ed aggiungere il quantitativo di DNA stabilito.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 9 di 10

- Chiudere la piastra con l'apposita pellicola ottica o il tappo dei tubi da PCR, caricare sul termociclatore ed avviare il programma di amplificazione (tabella 5).

Tabella 5. Ciclo termico per l'amplificazione Real time PCR (sonda TaqMan)

	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione	96°C	3'	1
Amplificazione	95°C	10''	40
	66°C	20''	
Hold	4°C		1

4. Valutazione dei risultati del metodo di prova Real Time PCR con fluoroforo EvaGreen o Sybr Green

Considerare positivi tutti i campioni con temperatura di Melting (TM) e picco di Melting (PM) coincidenti con quelli del controllo positivo.

Il picco dei controlli positivi con il fluoroforo EvaGreen si ha ad una temperatura di 81,4°C, mentre con l'utilizzo del SYBR green il picco di melting si ha alla temperatura di 83,4°C.

5. Valutazione dei risultati del metodo di prova Real Time PCR con sonda TaqMan

Per stabilire se un campione è positivo occorre conoscere il valore del *Ct* soglia ('cut-off') al di sopra del quale i campioni devono essere considerati negativi. Poiché il 'cut-off' può variare da laboratorio a laboratorio in funzione di diversi fattori (tipo di termociclatore, software utilizzato, manualità dell'operatore, ecc.), è necessario che ciascun laboratorio che adotti un protocollo di real-time PCR con chimica TaqMan effettui delle analisi preliminari in modo da utilizzare analiticamente il sistema, definendo il proprio valore di *Ct* soglia. A tal fine, si suggerisce di analizzare il materiale di riferimento mediante diluizioni seriali (con fattore di diluizione pari a 10) derivate da un campione a concentrazione nota. I controlli positivi dovrebbero dare curve di amplificazione esponenziali e con valori *Ct* inferiori o uguali al valore stabilito come soglia superiore per un rilevamento positivo. Per i controlli negativi non si devono avere segnali di fluorescenza superiori alla *threshold line*, livello di fluorescenza al di sopra del quale il segnale è significativo. Secondo quanto sin qui riportato un campione si considera positivo se produce una curva di amplificazione esponenziale ed un valore di *Ct* inferiore o uguale a 37,9. È invece considerato negativo il campione che non produce segnali di fluorescenza al di sopra della *threshold line*.

6. Valori di validazione

Tutti i dati di validazione sono stati ottenuti mediante le procedure sperimentali descritte, eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e sono riportati nella Tabella 6.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 18	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Ceratocystis platani</i>	Pag. 10 di 10

Tabella 6. Valori di validazione ottenuti per le procedure di prova analizzate

Parametri	Taqman	EvaGreen	SybrGreen
Sensibilità analitica	3 fg	3 fg	3 fg
Specificità analitica (inclusività/esclusività)	100%	100%	n.s.
Ripetibilità LoD ¹	100%	100%	100%
Sensibilità diagnostica *	100%	100%	100%
Specificità diagnostica *	99%	100%	92%
Accuratezza *	100%	100%	97%
Riproducibilità *	99%	100%	93%

LoD¹ = limit of detection

*Brunetti *et al.*, 2022 accettato per la pubblicazione.

n.s.= non saggiato