

*Servizio fitosanitario nazionale*

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 19

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di '*Candidatus*  
*Phytoplasma mali*'**

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

## **Sommario**

PREMESSA .....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI .....	4
' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ' .....	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 3 di 16

## **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. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 4 di 16

- 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. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 5 di 16

**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. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 6 di 16

## '*Candidatus Phytoplasma mali*'

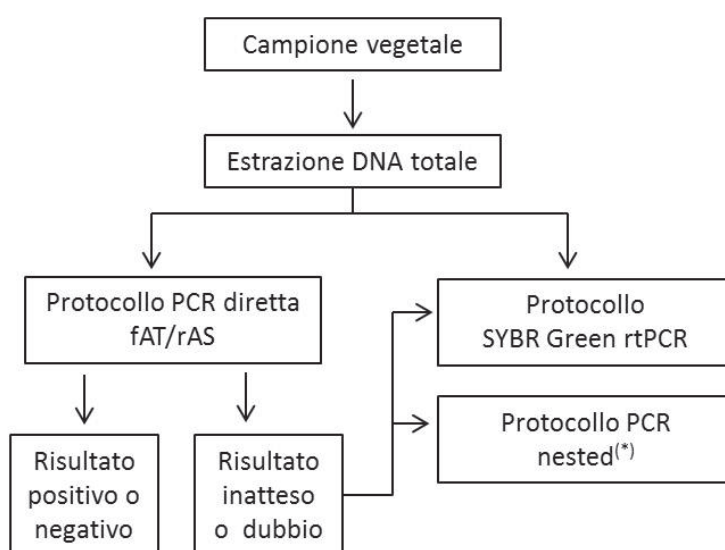
<b>Classificazione dell'agente eziologico</b>	
<b>Nome</b>	' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '
<b>Tassonomia</b>	Classe: Mollicutes Gruppo ribosomico: 16SrX (AP – Apple proliferation) Sottogruppo: 16SrX-A
<b>Avversità causata</b>	Scopazzi del melo

### 1. Protocollo diagnostico del '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Il protocollo permette la diagnosi e l'identificazione di '*Ca. P. mali*' mediante metodi molecolari in grado di rilevare ed amplificare il DNA del fitoplasma, dopo estrazione dal materiale vegetale. Il protocollo diagnostico è stato validato per la matrice costituita da nervature fogliari. I metodi di prova validati sono i seguenti:

- metodo di prova 1: PCR
- metodo di prova 2: PCR nested
- metodo di prova 3: SYBR Green real-time PCR (RT-PCR)

Di seguito si riporta il diagramma di flusso relativo al processo diagnostico per il rilevamento del '*Ca. P. mali*'.



(\*) Nel caso in cui non si disponesse di termociclatore per real time PCR

**Figura 1.** di flusso del processo da utilizzare per il rilevamento di '*Ca. P. mali*'.

Diagramma

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 7 di 16

## 2. Estrazione del DNA da matrice vegetale

Il materiale vegetale da utilizzare è rappresentato da foglie di melo con nervature integre, prelevate da porzioni sintomatiche della chioma. Il campionamento deve essere fatto alla fine della stagione vegetativa, preferibilmente nel periodo compreso dalla metà di ottobre all'inizio di novembre.

L'estrazione del DNA viene effettuata mediante utilizzazione di kit commerciale. I kit commerciali prevedono generalmente l'uso di azoto liquido per la macerazione iniziale del tessuto vegetale. Nel caso non si disponga di azoto liquido in laboratorio, si può procedere con un protocollo alternativo, di seguito descritto.

### a) Estrazione mediante utilizzo di azoto liquido

- Prelevare con un bisturi la nervatura principale da circa 15-20 foglie sintomatiche includendo, eventualmente, anche una parte di picciolo (è consigliabile prelevare una quantità di nervature in eccesso e, successivamente, pesare la quantità di tessuto polverizzato richiesta dal kit di estrazione; ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del patogeno anche in caso di una sua distribuzione erratica nei tessuti della pianta).
- Polverizzare accuratamente le nervature fogliari (o tessuto sottocorticale) in azoto liquido.
- Prelevare 0,1 g di tessuto polverizzato e metterlo in una provetta da 2 ml quindi procedere con l'estrazione seguendo scrupolosamente le istruzioni del kit fornite dalla Ditta produttrice.

### b) Estrazione senza utilizzo di azoto liquido

- Pesare 0,5 g di nervature fogliari e collocarli in una bustina 'Bioreba'.
- Aggiungere nella bustina 3 mL di tampone di estrazione (2,5% CTAB, 100 mM Tris pH 8, 1,4 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% PVP-40, 0,5% acido ascorbico aggiunto poco prima dell'uso; preparare i tamponi utilizzando H<sub>2</sub>O e reagenti sterili).
- Macerare accuratamente il campione.
- Prelevare dalla bustina 400 µl di lisato e trasferirlo in una provetta da 2 ml.
- Aggiungere 4 µL di RNase A (100 mg/mL) e porre ad incubare a 65°C ± 3 per 10 minuti.
- Proseguire secondo le istruzioni del kit.

## 3. Metodo di prova 1: PCR

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione sono riportate in tabella 1.

Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 8 di 16

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua). Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da 'Ca. P. mali' e da una pianta sicuramente esente da 'Ca. P. mali', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

**Tabella 1.** Primers utilizzati per la reazione di amplificazione

fAT	5'- CATCATTTAGTTGGGCACTT- 3' *
rAS	5'- GGCCCCGGACCATTATTATT- 3' *

\* Smart *et al.* 1996

- Preparare la miscela di reazione così come descritta nella successiva tabella 2, aggiungendo i reagenti secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima.
- Distribuire 24 µL di miscela di reazione per ciascuna provetta e aggiungere 1 µL dell'estratto di TDNA.

**Tabella 2.** Miscela di reazione per il metodo di prova 1: PCR

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O sterile	11	-
Taq DNA polimerasi buffer (includente MgCl <sub>2</sub> )	5	1X
dNTPs each	0,5	200 µM
Primer fAT	0,625	0,25 µM
Primer rAS	0,625	0,25 µM
Taq DNA polimerasi	6,25	1,25 U
DNA totale estratto	1	-
Volume totale	25	-

- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 3.

**Tabella 3.** Ciclo termico di amplificazione metodo di prova 1: PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95°C	5'	1
Denaturazione	94°C	30''	} 35
Annealing	56°C	75''	
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	7'	1



<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'	Pag. 9 di 16
Hold	4°C
	10'
	1

### 3.1 Elettroforesi su gel di agarosio

La visualizzazione dei risultati ottenuti si effettua mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Preparare un gel di agarosio 1,2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 5 µL di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 1 µl di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 60 minuti.

### 3.2 Valutazione dei risultati

Il saggio è positivo se si osserva una banda di 500 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo. Qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto.

## 4 Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 1: PCR

La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10<sup>-6</sup>.

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10<sup>-6</sup>.

I valori di validazione ottenuti sono riportati nella Tabella 3. I dati sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma, ad eccezione della riproducibilità che è stata valutata mediante un test interlaboratorio effettuato da sei laboratori.

**Tabella 3.** Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 1: PCR

Parametri	Valori
Sensibilità analitica <sup>(1)</sup>	10 <sup>-2</sup>
Specificità analitica	100%
Ripetibilità <sup>(2)</sup>	100%
Sensibilità diagnostica	81%
Accuratezza	90,5%

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 10 di 16
Riproducibilità <sup>(3)</sup>	89,1%

## 5 Metodo di prova 2: PCR nested

Il saggio prevede una doppia amplificazione genica mediante PCR diretta mediante l'uso di primers universali seguita da PCR nested eseguita con primers specifici per il gruppo ribosomico 16SrX.

### 5.1 Reazione di amplificazione PCR diretta

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione diretta sono riportate in tabella 4.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua). Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da 'Ca. P. mali' e da una pianta sicuramente esente da 'Ca. P. mali', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

**Tabella 4.** Primers utilizzati per la reazione di amplificazione diretta

P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' *
16S-Sr	5'-GGTCTGTCAAACACTGAAGATG-3' **

\* Deng and Hiruki, 1991

\*\* Lee *et al.*, 2004

- Preparare la miscela di reazione così come descritta nella successiva tabella 5, aggiungendo i reagenti secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima.
- Distribuire 24 µL di miscela di reazione per ciascuna provetta e aggiungere 1 µL dell'estratto di TDNA.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 11 di 16

**Tabella 5.** Miscela di reazione per il metodo di prova 2: PCR diretta

<b>Componenti</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentrazione finale</b>
H <sub>2</sub> O sterile	10,25	-
Taq DNA polimerasi buffer (includente MgCl <sub>2</sub> )	5	1X
dNTPs each	0,5	200 µM
Primer P1	1	0,4 µM
Primer 16S-Sr	1	0,4 µM
Taq DNA polimerasi	6,25	0,625 U
DNA totale estratto	1	-
Volume totale	25	-

- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 6.

**Tabella 6.** Ciclo termico di amplificazione metodo di prova 2: PCR diretta

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>N° di cicli</b>
Denaturazione iniziale	94°C	2'	1
Denaturazione	94°C	1'	} 36
Annealing	55°C	1'	
Estensione	72°C	2'	
Estensione finale	72°C	8'	1
Hold	4°C	10'	1

## 5.2 Reazione di amplificazione PCR nested

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione PCR nested sono riportate in tabella 7.

**Tabella 7.** Primers utilizzati per la reazione di PCR nested

fO1	5'-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3' *
rO1	5'-AAGTGCCCAACTAAATGAT-3' *

\* Lorenz *et al.*, 1995

Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 12 di 16

- Realizzare una diluizione 1:30 del prodotto di PCR diretta in acqua sterile. Cambiare i guanti dopo aver eseguito le diluizioni.
- Preparare la miscela di reazione così come descritta nella successiva tabella 8, aggiungendo i reagenti secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima e distribuire 24 µL di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Prelevare 1 µL della diluizione 1:30 ottenuta per ciascun campione e caricarlo nella corrispondente provetta contenente la miscela di reazione.

**Tabella 8.** Miscela di reazione unitaria metodo di prova 2: PCR nested

Componenti	Volume	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O sterile	13,375	-
Taq DNA polimerasi buffer (include 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5	1X
dNTPs each	0,5	200 µM
Primer fO1	1	0,4 µM
Primer rO1	1	0,4 µM
Taq DNA polimerasi	3,125	0,625 U
DNA totale estratto	1	-
Volume totale	25	-

- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 9.

**Tabella 9.** Ciclo termico di amplificazione metodo di prova 2: PCR nested

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	2'	1
Denaturazione	94°C	1'	} 38
Annealing	50°C	1'	
Estensione	72°C	2'	
Estensione finale	72°C	8'	1
Hold	4°C	10'	1

### 5.3 Elettroforesi su gel di agarosio

La visualizzazione dei risultati ottenuti in PCR nested si effettua mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Preparare un gel di agarosio 1,2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 5 µL di ciascun prodotto di PCR nested dopo aver aggiunto 1 µL di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 60 minuti.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di 'Candidatus Phytoplasma mali'	Pag. 13 di 16

#### 5.4 Valutazione dei risultati (PCR nested)

Il saggio è positivo se si osserverà una banda di 1050 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo. Qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto. Eventualmente, si può effettuare la corsa elettroforetica degli amplificati ottenuti in PCR diretta e se i controlli in bianco e il controllo sano risultano 'puliti' si può ripetere la sola PCR nested, partendo da nuove diluizioni.

### 6. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 2: PCR nested

I valori di validazione sono riportati nella tabella 10.

La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a  $10^{-6}$ .

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a  $10^{-6}$ .

I dati sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio DIALAB, ad eccezione della riproducibilità che è stata valutata mediante una prova interlaboratorio effettuato fra sei laboratori.

**Tabella 10.** Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 2: PCR nested

Parametri	Valori
Sensibilità analitica	$10^{-3}$
Specificità analitica	100%
Ripetibilità	100%
Sensibilità diagnostica	83%
Accuratezza	91,5%
Riproducibilità	63,6%

### 7. Metodo di prova 3: SYBR Green Real-Time PCR (rtPCR)

Le sequenze dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione in SYBR Green rtPCR sono riportate in tabella 11.

Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 14 di 16

**Tabella 11.** Primers utilizzati per la reazione di amplificazione rtPCR

fAP <sub>2</sub>	5'- AAGAGCAATTCGTA CTTTCG -3' *
rAP <sub>2</sub>	5'- GCCGAACTAGTTTCTAATTGAC-3' *

\* (Galetto *et al.*, 2005)

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua). Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. mali*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. mali*', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

- Preparare la miscela di reazione così come descritta nella successiva tabella 12,

**Tabella 12.** Miscela di reazione unitaria metodo di prova 3: SYBR Green rtPCR

Componenti	Volume	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O sterile		-
SYBR Green Master Mix	12,5	1X
Primer fAP <sub>2</sub>		300 nM
Primer rAP <sub>2</sub>		300 nM
DNA totale estratto	2	-
Volume totale	25	-

- Distribuire 23 µL di miscela di reazione per ciascuna provetta e aggiungere 2 µL dell'estratto di TDNA.
- Avviare il termociclatore dopo aver impostato il ciclo di amplificazione descritto in tabella 13.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 15 di 16

**Tabella 13.** Ciclo termico di amplificazione metodo di prova 3: SYBR Green rtPCR

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>N° di cicli</b>
Denaturazione iniziale	95°C	5'	1
Denaturazione	95°C	15''	} 45
Annealing	57°C	1'	
<i>Curva di melting</i>			
Estensione finale	95°C	1'	1
Hold	65°C	1'	1
0,5°C /ciclo fino a 95°C			

## 7.1 Valutazione dei risultati

Considerare positivi tutti i campioni che mostrano una curva esponenziale di amplificazione e la cui temperatura di Melting (TM) ed il relativo picco di Melting (PM) coincidono con quelli del controllo positivo.

## 8. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 3: SYBR Green rtPCR

I valori di validazione sono riportati nella tabella 14.

La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a  $10^{-6}$ .

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a  $10^{-6}$ .

I dati sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio DIALAB, ad eccezione della riproducibilità che è stata valutata mediante un test interlaboratorio effettuato da sei laboratori.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 19	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	Pag. 16 di 16

**Tabella 14.** Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova 3: SYBR Green RT-PCR

<b>Parametri</b>	<b>Valori</b>
Sensibilità analitica	$10^{-5}$
Specificità analitica	100%
Ripetibilità	100%
Sensibilità diagnostica	83%
Accuratezza	91,5%
Riproducibilità	90,9%