

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 24

Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*

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. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 2 di 8

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 3 di 8

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 4 di 8

Centri di Referenza Nazionali accreditati e riconosciuti dall'Autorità centrale, possono essere utilizzati da altri Laboratori senza ulteriore validazione purché:

- 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. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 5 di 8

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. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 6 di 8

Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome	<i>Xanthomonas</i> spp. (<i>X. vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. perforans</i> e <i>X. gardneri</i>)
Tassonomia	Ordine: <i>Xanthomonadales</i> Famiglia: <i>Xanthomonadaceae</i> Genere: <i>Xanthomonas</i>
Avversità causata	Maculatura batterica del pomodoro

1. Protocollo di diagnosi di *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*

Il metodo di prova descritto nel presente protocollo si basa sulla tecnica di Real time PCR Quadruplex, che permette di identificare la presenza o l'assenza, in un'unica reazione di amplificazione, delle quattro specie di *Xanthomonas* spp. agenti della maculatura batterica del pomodoro. Il metodo è stato validato per la matrice semi di pomodoro.

2. Metodo di prova Real Time PCR Quadruplex

La metodica Quadruplex Real Time PCR utilizza quattro sonde ciascuna marcata all'estremità 5' in modo che si possano rilevare i 4 patogeni simultaneamente. Le sequenze dei primers e delle sonde utilizzati per le amplificazioni di *X. perforans* ed *euvesicatoria* (FP1 e RP1) e di *X. gardneri* e *vesicatoria* (FP2 e RP2), sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Primers e sonde utilizzati nel metodo Real Time PCR Quadruplex.

FP1	5'CGTCGACGGCCTGGGCGA-3'
RP1	5'CCGGTGCCTGCGCCTGGA-3'
P- <i>X. perforans</i>	5'/56-FAM/CGGGCAAGGAGCCATCGCCTGT/31ABkFQ/-3'
P- <i>X. euvesicatoria</i>	5'/5TET/CGGGCAAGGCGCAATCGCCTGT/3BHQ_2/-3
FP2	5'-AGGTCAGCCTGGGCGAGGT-3'
RP2	5'-TGAAGCCCACCACCTCGGC-3'

Documento tecnico ufficiale n. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 7 di 8

P- *X. gardneri* 5'-/5TexRd-XN/TGCGCCAGCGTGACGGCAGGCC/3IAbRQSp/-3'

P-*X. vesicatoria* 5'-/5CY5/TGCGCCAGCGCGATGGCAGGC/3IAbRQSp/-3'

In ogni reazione di amplificazione devono essere inseriti i seguenti controlli:

- Controllo negativo di amplificazione (NAC): campione in cui il DNA è costituito da H₂O.
- Controllo positivo di amplificazione (PAC): DNA di *X. Vesicatoria*, *X. Euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. Gardneri*.

I volumi e le concentrazioni dei reagenti utilizzati per la preparazione della miscela di reazione per l'amplificazione in Quadruplex Real Time PCR sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Miscela di reazione per l'amplificazione Real time PCR Quadruplex

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH ₂ O	0,72	-
2X Reaction Mix (PCR buffer)*	5,5	1X
FP1	0,78	0,7 µM
RP1	0,78	0,7 µM
FP2	0,78	0,7 µM
RP2	0,78	0,7 µM
P-Xp	0,165	0,15 µM
P-Xe	0,165	0,15 µM
P-Xg	0,165	0,15 µM
P-Xv	0,165	0,15 µM
DNA	1,0	-
Totale	11,0	

*PCR reaction buffer Biorad Sso Advanced universal probe super mix (172-5281).

- Preparare la miscela di reazione come sopra descritto, quindi dispensare 10 µL nei pozzetti di una piastra o in tubi per real time PCR.
- Aggiungere 1 µL di DNA di ciascun campione da analizzare e dei relativi controlli. Caricare ciascun campione in triplicato tecnico.
- Caricare la piastra o i tubi sul termociclatore ed avviare il ciclo di amplificazione dopo aver impostato il programma riportato di seguito (tabella 3).

Tabella 3. ciclo termico per la Real time PCR quadruplex

	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione	95°C	30'	1
Amplificazione	95°C	3''	40
	69°C	30''	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 24	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , <i>X. Euvesicatoria</i> , <i>X. Perforans</i> , <i>X. gardneri</i>	Pag. 8 di 8
72°C	30''
4°C	10'
	1

3. Valutazione dei risultati

Il saggio di amplificazione mediante Quadruplex Real time PCR è attendibile solo se il NAC è negativo e se il PAC per ciascuno dei batteri target (*X. Euvesicatoria*, *X. Vesicatoria*, *X. Gardneri*, *X. Perforans*) evidenzia un valore di $0.00 < Ct < 40.0$.

Il campione è considerato positivo se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo utilizzato è $0.00 < Ct < 40.0$. Il campione è considerato negativo per la presenza del target se non si rileva alcuna curva esponenziale. I campioni che danno origine ad un segnale debole dovranno essere testati nuovamente.

4. Validazione

Tutti i parametri sono stati ottenuti mediante le procedure descritte ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e sono riportati nella tabella 3. È stato analizzato il DNA estratto da semi di pomodoro contaminati con concentrazioni note dei patogeni target e di non target in tre ripetizioni biologiche. È stato calcolato anche il valore soglia di sensibilità analitica del DNA di *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* miscelati. Sono state eseguite 3 ripetizioni biologiche analizzate in triplicato nell'intervallo di concentrazione 10 ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg. I risultati sono riportati in tabella 4.

Tabella 4. Valori di validazione ottenuti per la Quadruplex-Real time PCR

Parametri	Valori
Sensibilità analitica	10^4 cfu/mL
Specificità analitica	5/5
Inclusività	23/30
Esclusività	7/30*
Accuratezza	83%
Ripetibilità	75%
Riproducibilità	72%

*Indica che altre specie possono essere rilevate (“cross reazione”) con questo metodo di prova.