

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 21

Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
	Revisione 0	GdL Laboratori	CFN 28/06/2022	29/09/2022	BCF 29/09/2022
1	Revisione 1	GdL Laboratori	CFN 08/02/2023	06/03/2023	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 2 di 12

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Virus della vite coperti da norme fitosanitarie.....	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 3 di 12

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 ministeriale 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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 4 di 12

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 un metodo diagnostico ufficiale del Servizio Fitosanitario Nazionale.

In particolare, suddetto protocollo si affianca a tutti gli altri protocolli di analisi già previsti e riconosciuti dalla normativa in vigore.

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 5 di 12

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

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. 16 del 2 febbraio 2021. Norme per la produzione e commercializzazione dei materiali di moltiplicazione della vite, 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 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.

Nota tecnica del Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste, protocollo n. 202217 del 05/05/2022 concernente le modalità operative e i protocolli diagnostici da utilizzare ai fini del controllo virologico dei vigneti di viti madri.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 6 di 12

Virus della vite oggetto del presente protocollo

Il protocollo che segue è stato validato nell'ambito del progetto ARNADIA. Attrezzature, kit o reagenti alternativi a quelli presenti nel protocollo possono essere utilizzati qualora sia stata preventivamente effettuata una verifica di validità (vedi standard EPPO PM 7/98).

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo)	Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1); Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2); Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3); Grapevine virus A (GVA); Grapevine virus B (GVB); Arabis mosaic virus (ArMV); Grapevine fanleaf virus (GFLV); Grapevine fleck virus (GFkV).
Avversità causate	Complesso dell'accartocciamento fogliare (GLRaV 1 e GLRaV 3) e disaffinità d'innesto (GLRaV 2); scanalatura del Kober del complesso del legno riccio (GVA); suberosi corticale del complesso del legno riccio (GVB); degenerazione infettiva della vite (ArMV e GFLV); maculatura infettiva della vite (GFkV).

1. Protocollo di diagnosi

Il protocollo diagnostico permette la diagnosi e l'identificazione degli 8 virus sopraindicati ed è stato validato su matrice costituita da tessuto floematico ottenuto da materiale legnoso raccolto durante la fase di riposo vegetativo, ovvero durante il periodo invernale.

2. Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA si effettua mediante l'utilizzo del kit commerciale RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) previa macerazione del campione con tampone di estrazione MacKenzie, descritto in tabella 1.

Tabella 1. Tampone MacKenzie pH 5 (per 1 litro di tampone)

Tampone MacKenzie pH 5	Concentrazione	Quantità
Guanidina isotiocianato	4 M	472 g
Sodio Acetato	0,2	16,4 g
EDTA	25 Mm	9,2 g

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 7 di 12

PVP 40%

2,5 %

25 g

Portare a pH 5 e autoclavare.

- Rimuovere lo strato corticale esterno (ritidoma) dai tralci legnosi fino a scoprire il tessuto floematico. Prelevare il floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino sterili.
- Pesare 0,25 g di tessuto floematico
- Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello autoclavati.
- Aggiungere 1,7 mL di tampone MacKenzie e 17 µL di β-mercaptoetanololo e mescolare.
- Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12000 rpm per 6 minuti.
- Trasferire 1 mL di surnatante in eppendorf da 1,5 mL aiutandosi con un puntale cui è stata tolta la punta.
- Aggiungere 100 µL di Sarkosyl 20% ad ogni provetta.
- Incubare a 70 °C ± 3 per 10 minuti agitando periodicamente i tubi.
- Versare il contenuto caldo nelle prime colonnine del kit.
- Centrifugare a 12.000 rpm per 2 minuti.
- Prelevare il percolato senza toccare il pellet, trasferirlo in una nuova provetta eppendorf e aggiungere 500 µL di Et-OH assoluto freddo e mescolare delicatamente con la pipetta.
- Versare 700 µL della soluzione nelle seconde colonnine del kit.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato e ripetere per la restante soluzione.
- Aggiungere 700 µL di tampone RW1 a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Aggiungere 500 µL di tampone RPE (già addizionato di Et-OH) a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Ripetere il passaggio centrifugando a 10000 rpm per 2 minuti. Eliminare l'eluato.
- Centrifugare a vuoto a 12.000 rpm per 1 minuto
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 mL e aggiungere 50 µL di acqua RNase free. Ripetere il passaggio 2 volte.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1'.
- Eliminare la colonnina e mettere 15-20' a -80°C ± 3 prima di usare l'estratto.

2.1 Trattamento con Dnasi

- Diluire 1 µg di RNA in 8 µL di H₂O DEPC.
- Aggiungere 1 µL di 10X tampone di reazione.
- Aggiungere 1 µL di enzima Dnasi.
- Lasciare a temperatura ambiente per 15 minuti.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 8 di 12

- Aggiungere 1 µL di stop solution (EDTA 50mM) per un volume totale di 11µL.
- Incubare a 65°C per 10 minuti.
- Trasferire in ghiaccio e proseguire o congelare a -80 °C ± 3.

2.2 Trascrittasi inversa (sintesi cDNA)

Utilizzare RNA trattato con Dnasi

Aggiungere i primi due componenti della miscela di reazione, descritta in tabella 2; incubare a 65 °C per 5 minuti e trasferire i campioni in ghiaccio.

Aggiungere i restanti componenti e incubare a 25°C per 10 minuti, 37 °C per 1 ora e 70 °C per 15 minuti su termociclatore. Trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20 °C ± 3.

Tabella 2. Miscela di reazione per la sintesi di cDNA

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
RNA trattato con DNasi	10	-
dNTP	1	0,5 mM
Random nonameri	1	2,5 µM
First strand buffer	4	1X
DTT	2	10 mM
Inibitori RNasi	1	2U
Trascrittasi inversa M-MLV	1	10U
Volume totale	20	-

Per ogni evento di estrazione ed amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo e un controllo acqua. Si consiglia di non superare il numero di 30 campioni per evento di estrazione/amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta dai virus e da una pianta sicuramente esente dai virus, rispettivamente. Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto del RNA totale del campione da saggiare.

1. Metodo di prova Multiplex RT-PCR (Gambino and Gribaudo, 2006)

Per la diagnosi dei virus della vite mediante il protocollo Multiplex RT-PCR vanno utilizzati i primer riportati nella seguente tabella 3:

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 9 di 12

Tabella 3. Primer per la diagnosi dei virus della vite coperti da norme sanitarie

Nome	Sequenza 5'-3'	Gene	bp amplificato
18S-M1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	controllo interno RNA vite	844
18S-M2	TTCAGCCTTGCGACCATACT		
GLRaV2-CP1	GGTGATAACCGACGCCTCTA	prot capsidica	543
GLRaV2-CP2	CCTAGCTGACGCAGATTGCT		
GVB-M1	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	putat RNA binding protein	460
GVB-M2	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG		
ArMV-9	TGACAACATGGTATGAAGCACA	RNA-dependent RNA polymerase	402
ArMV-10	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT		
GLRaV3-M3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	prot capsidica	336
GLRaV3-N2	TGCGGCATTAATCTTCATTG		
GVA-6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	prot capsidica	272
GVA-6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC		
GLRaV1-M3	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	prot capsidica	232
GLRaV1-M4	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG		
GFKV-M1	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	prot capsidica	179
GFKV-M2	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG		
GFLV-M3	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	RNA polim RNA dip	118
GFLV-M4	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG		

Preparare la miscela di primers per la reazione multiplex RT-PCR come riportato nella tabella 4.

Tabella 4. Miscela di primers da utilizzare per la reazione in multiplex RT-PCR

Primer mix multiplex	Volume (µL)	Concentrazione (µM)
18S-M1	0,1	10
18S-M2	0,1	10
GLRaV2-CP1	0,1	100
GLRaV2-CP2	0,1	100
GVB-M1	0,2	10
GVB-M2	0,2	10
ArMV-9	0,1	100
ArMV-10	0,1	100
GLRaV3-M3	0,1	100
GLRaV3-N2	0,1	100
GVA-6591F	0,075	100
GVA-6862R	0,075	100
GLRaV1-M3	0,375	10
GLRaV1-M4	0,375	10
GFKV-M1	0,5	10
GFKV-M2	0,5	10
GFLV-M3	0,075	100
GFLV-M4	0,075	100
Totale primer per 1 campione	3,25	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 10 di 12

- Preparare la miscela di reazione per la reazione multiplex RT-PCR come descritto nella tabella 5.

Tabella 5. Miscela di reazione per la multiplex RT-PCR

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
H ₂ O sterile	14,4	-
Buffer	2,75	1X
MgCl ₂	1,6	3,2 mM
dNTPs	0,75	300 nM
Primer mix multiplex	3,25	
Platinum Taq polimerasi	0,25	5 U
cDNA	2	-
Volume totale	25	-

- Distribuire 23 μ L di miscela di reazione per ciascuna provetta e aggiungere 2 μ L di cDNA.
- Avviare il termociclatore con il ciclo di amplificazione indicato in tabella 6.

Tabella 6. Ciclo termico di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° cicli
Denaturazione iniziale	94°C	2'	1
Denaturazione	94°C	30''	} 35
Annealing	55°C	60''	
Estensione	72°C	90''	
Estensione finale	72°C	10'	1
Hold	10°C	10'	1

3.1 Valutazione dei risultati per il metodo di prova multiplex RT-PCR

Il campione viene considerato positivo se si verificano le seguenti condizioni: il campione presenta almeno una banda che avrà migrato alla stessa altezza del controllo positivo, ovvero, che risulti per ogni virus della dimensione del frammento atteso, come riportato nella precedente tabella 13.

Il controllo negativo ed il controllo bianco (acqua) non presentano alcuna banda di amplificazione.

4 Elettroforesi su gel di agarosio

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 11 di 12

Preparare un gel di agarosio 2,5% in TBE 0,5X; caricare nei pozzetti 5-10 μ L di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 1 μ L di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 120 V per circa 60 minuti.

5 Valori di validazione per il metodo di prova Multiplex RT-PCR

I valori di validazione sono riportati nella tabella 7.

La sensibilità analitica è stata valutata con l'estratto non diluito fino alla diluizione 10^{-4} .

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni tal quali fino alla diluizione 2^{-2} .

I dati sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma.

Tabella 7. Valori di validazione per il metodo di prova multiplex RT-PCR

Virus	Sensibilità analitica	Specificità analitica (inclusività/esclusività)	Ripetibilità	Accuratezza	Sensibilità diagnostica	Riproducibilità
GLRaV-1	10^{-2}	100%	100%	94%	74%	70%
GLRaV-2	10^{-2}	98%	95%	85%	84%	83%
GLRaV-3	10^{-3}	93%	100%	95%	100%	100%
GVA	10^{-2}	99%	100%	98%	96%	94%
GVB	10^{-2}	100%	100%	100%	100%	90%
ArMV	10^{-2}	99%	100%	98%	92%	100%
GFLV	10^{-3}	100%	100%	90%	68%	76%
GFkV	10^{-2}	95%	100%	95%	95%	95%

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 21	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Virus della vite coperti da norme fitosanitarie	Pag. 12 di 12

Totale 8 virus	10⁻²	98%	99%	95%	89%	90%
-----------------------	------------------------	------------	------------	------------	------------	------------