

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 10

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

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.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 2 di 9

## Sommario

PREMESSA .....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI.....	4
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> - .....	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 3 di 9

## **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.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 4 di 9

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.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 5 di 9

**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.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 6 di 9

## ***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* -**

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

---

### Classificazione dell'agente eziologico

---

<b>Nome</b>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<b>Tassonomia</b>	Ordine: <i>Micrococcales</i> Famiglia: <i>Microbacteriaceae</i> Genere: <i>Clavibacter</i>
<b>Avversità causata</b>	Cancro batterico del pomodoro
<b>Sinonimi</b>	<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> (Smith) Dye & Kemp; <i>Corynebacterium michiganense</i> (Smith) Jensen (Cmm)

---

### **1. Protocollo di diagnosi di *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Scopo del metodo è rilevare la presenza di un agente patogeno batterico, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), tramite reazione di amplificazione del DNA batterico. Esso fornisce il rilevamento del batterio in modo qualitativo: assenza/presenza. Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione di DNA è positivo; se viceversa non si evidenzia tale frammento, il campione di DNA è negativo.

Il presente metodo di prova è stato validato sulla matrice seme di pomodoro.

### **2. Metodo di prova PCR (primers usati da Pastrick and Rainey 1999 modificato secondo Woudt)**

Questo metodo è stato validato impiegando l'enzima Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase TM (Bioline), e relativo tampone comprensivo di MgCl<sub>2</sub>.

Le sequenze dei primers utilizzati sono indicate nella tabella 1.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.10	<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Pag. 7 di 9

**Tabella 1.** Primer utilizzati per la reazione di PCR

PSA-8	5'-TTGGTCAATTCTGTCTCCCTTC-3'
PSA-R	5'-TACTGAGATGTTGTTTCACTTCCCC-3'

Preparare la miscela di reazione come descritto in tabella 2:

**Tabella 2.** Miscela di reazione per l'amplificazione di PCR con primers Pastrick and Rainey, 1999

<b>Componenti</b>	<b>Volume (µL)</b>	<b>Concentrazione finale</b>
dH <sub>2</sub> O	11,1	-
PCR buffer	2,5	1X
dNTPs	1,0	400 µM
MgCl <sub>2</sub>	1,2	2,4 mM
PSA-8	2,0	0,4 µM
PSA-R	2,0	0,4 µM
Taq DNA Polimerasi*	0,2	0,04 U/µL
DNA	5,0	-
Totale	25	

\* Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase TM (Bioline)

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

**Tabella 3.** Ciclo termico per l'amplificazione di PCR con primers Pastrick and Rainey 1999

	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>N° di cicli</b>
Denaturazione	95°C	10'	1
Amplificazione	95°C	15''	35
	63°C	15''	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>			
Documento tecnico ufficiale n.10			<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>			Pag. 8 di 9
	72°C	45''	
Estensione finale	72°C	5'	1
Hold	4°C	∞'	1

### ***Elettroforesi su gel di agarosio***

Preparare un gel di agarosio 2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 10 µL di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 2 µL di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

## **2.1 Valutazione dei risultati**

L'esito del saggio si basa sulla espressione qualitativa che rileva assenza/presenza del patogeno target a seconda che nel campione si produca il frammento di DNA atteso o se, viceversa, non si evidenzia tale frammento. Se il saggio è positivo si osserverà una banda di 268 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.

## **3. Valori di validazione ottenuti per i metodi di prova molecolari così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione**

I materiali di riferimento utilizzati per la validazione sono campioni di DNA ottenuti da materiali di riferimento interno (vedi tabella 4): 5 campioni di semi di pomodoro infetti da Cmm e 5 campioni di semi non infetti. Aliquote di DNA dei campioni oggetto della validazione sono state congelate e conservati a -20°C ± 3.

**Tabella 4.** Materiali di riferimento utilizzati per la validazione

N°	ETICHETTA	STATO FITOSANITARIO	CODICE IDENTIFICATIVO CAMPIONE NELLA VALIDAZIONE
<b>1</b>	B14-Pom1	INFETTO 100:5000	1-6
<b>2</b>	B14-Pom2	INFETTO 50:5000	7-14
<b>3</b>	B14-Pom3	INFETTO 10:5000	15-22
<b>4</b>	B14-Pom4	INFETTO 5:5000	23-30
<b>5</b>	B14-Pom5	INFETTO 1:5000	61-66
<b>6</b>	B14-Pom12	SANO	31-36
<b>7</b>	B14-Pom13	SANO	37-42
<b>8</b>	B14-Pom14	SANO	43-48



<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>			
Documento tecnico ufficiale n.10			<b>Metodi diagnostici</b>
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>			Pag. 9 di 9
<b>9</b>	B14-Pom15	SANO	49-54
<b>10</b>	B14-Pom16	SANO	55-60

Tutti i dati di validazione sono stati ottenuti mediante procedure sperimentali definite ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e sono riportati nella seguente tabella 5.

**Tabella 5.** Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti

<b>Criterio di performance scelto per la validazione</b>	<b>Valori di performance ottenuti</b>	<b>Adeguatezza in base all'analisi dei rischi di validazione per lo scopo e l'utilizzo previsti</b>	<b>Documentazione disponibile presso il DIALAB</b>
Sensibilità analitica (LOD)	5 semi infetti su 5000	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)
Sensibilità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)
Specificità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)
Accuratezza	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)
Accordanza	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)