

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 13

Protocollo diagnostico per l'identificazione di Pospiviroidi da semi di pomodoro

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.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 2 di 12

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Pospiviroidi da semi di pomodoro	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	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 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.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 4 di 12

- 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.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 5 di 12

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.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 6 di 12

Pospiviroidi da semi di pomodoro

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

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo)	Pepper chat fruit viroid (PCFVd); Potato spindle tuber viroid (PSTVd); Tomato apical stunt viroid (TASVd); Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd); Citrus exocortis viroid (CEVd); Columnea latent viroid (CLVd)
Tassonomia	Famiglia: Pospiviroidae Genere: <i>Pospiviroid</i>
Avversità causata	ingiallimento e nanismo della bacca di peperone (PCFVd); affusolamento dei tuberi di patata (PSTVd); nanismo apicale del pomodoro (TASVd); nanismo clorotico del pomodoro (TCDVd); exocortite degli agrumi (CEVd); viroide latente della Columnea (CLVd)

1. Protocollo di diagnosi

Scopo del metodo è rilevare la presenza di agenti patogeni di tipo viroide appartenenti al genere Pospiviroidi in semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) tramite due reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione molecolare quantitativa (RT-qPCR) in singolo stadio.

Il metodo necessita di materiale vegetativo ben conservato, il campione costituito da semi può essere conservato in buste sigillate a $6^{\circ}\text{C} \pm 3$ per un periodo massimo di un mese. Questo protocollo è stato validato sulla matrice semi di pomodoro.

2. Estrazione dell'RNA

La procedura di estrazione dell'RNA prevede l'impiego del kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) previa macerazione del campione in tampone di estrazione GH+ la cui composizione è descritta nella successiva tabella 1.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 7 di 12

Tabella 1. Composizione del tampone GH+

Tampone di estrazione GH+ (6M)	portare ad 1 L con acqua distillata
Guanidina-idroclorito	573 g
Tampone sodio acetato (4M)	50 mL
EDTA	9,3 g
PVP-10	25 g

Procedura di estrazione

- Dividere il lotto di semi, se supera i 1000 semi, in subcampioni da circa 1000 semi massimo ciascuno calcolando il numero di semi sulla base del peso di un'aliquota di semi rappresentativa (250).
- Trasferirli in buste da omogeneizzazione insieme con 20 mL di buffer di estrazione GH+ per ogni subcampione. In caso di campioni costituiti da meno di 1000 semi aggiungere una quantità di GH+ proporzionale al rapporto 1000 semi/20 mL.
- Tenere in incubazione a temperatura ambiente per 60 minuti. Omogenizzare i semi impostando il BagMixer in posizione 4 per 90 sec.
- Trasferire 1 mL di soluzione in una nuova provetta sterile, aggiungere 30 µL di DTT (5M) e incubare a 65°C ± 3 per 15 minuti agitando a 850 rpm nel termostato agitato.
- Centrifugare a 16000 giri per 10 minuti, prelevare 750 µL di surnatante e caricarli nella colonnina viola, "QIAshredder spin column" e centrifugare 2 minuti a massima velocità.
- Riempire nuove provette sterili con 300 µL di etanolo assoluto e trasferirci 600 µL del percolato ottenuto dalla fase 2 e mescolare bene con la pipetta.
- Trasferire la soluzione 700 µL della soluzione nelle "RNeasy spin column" - colonnine rosa e centrifugare per 30 sec a 16000 giri, eliminare l'eluato.
- Aggiungere alla colonnina 700 µL di buffer RW1 e centrifugare per 30 s a 16000 giri, eliminare il filtrato.
- Aggiungere 500 µL di buffer RPE (precedentemente diluito con l'opportuna quantità di etanolo assoluto). Centrifugare per 30 s a 16000 giri. Eliminare l'eluato e ripetere il passaggio centrifugando per 2 min.
- Centrifugare a velocità massima per 1 minuto a vuoto.
- Posizionare la colonnina rosa su una provetta sterile da 1,5 mL, aggiungere 50 µL di acqua RNase-free, chiudere il tappo e lasciare incubare 1 min e centrifugare per 1 minuto a 8000 giri per eluire l'RNA. Ripetere aggiungendo altri 50 µL di acqua RNasi-free.

3. Saggio RT-qPCR

Preparare le mix di primers secondo le concentrazioni riportate nelle successive tabelle 2 e 4 e la mix di sonde riportata in tabella 3. Preparare il quantitativo necessario tenendo conto che ogni campione deve essere analizzato in doppio.

Tabella 2. Miscela di primers Pospisense 1

Componenti	Volume (μ L)	Concentrazione finale
dH ₂ O DEPC	20	-
PospisFW1	10	10 μ M
PospisFW5a	10	10 μ M
PospisRV1	10	10 μ M
PospisRV2	10	10 μ M
PospisRV5a	10	10 μ M
CLVd-F	10	10 μ M
CLVd-F2	10	10 μ M
CLVd-R	10	10 μ M
Totale	100	

Tabella 3. Miscela di sonde Pospisense 1

Componenti	Volume (μ L)	Concentrazione finale
dH ₂ O DEPC	70	-
PospisP1a	10	10 μ M
PospisP3a	10	10 μ M
CLVd-P	10	10 μ M
Totale	100	

Tabella 4. Miscela di primer Pospisense 2

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O DEPC	60	-
PospisFW6a	10	10 μ M
PospisFW6b	10	10 μ M
PospisFW6c	10	10 μ M
PospisRV6a	10	10 μ M
Totale	100	

Per ogni evento di amplificazione predisporre i seguenti controlli:

Controllo positivo – campione vegetale infetto da un viroide del genere considerato che è garante per l'esito del test manifestando la reazione di amplificazione.

Controllo negativo – campione vegetale sicuramente esente da uno dei viroidi del genere considerato che è garante per l'esito del test, non dovendo manifestare la reazione di amplificazione.

Controllo bianco – costituito dalla miscela di amplificazione dove non viene posto l'RNA target ma il controllo acqua e conferisce indicazioni sulla qualità del test come indice di contaminazioni (sviluppo di reazione aspecifiche).

Esecuzione del saggio di RT-qPCR

- Scongelare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio. Preparare le miscele di reazione tenendole in ghiaccio.

Tabella 5. Miscela di reazione Pospisense 1: CLVd, PCFVd, PSTVd, TCDVd, TPMVd

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O DEPC	3,35	-
Master Mix	5,0	1 X
RT enzyme mix	0,25	1 X

Documento tecnico ufficiale n.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 10 di 12

Mix di primers Pospisense 1	0,3	0,24 μ M
Mix di sonde Pospisense 1	0,1	0,08 μ M
RNA	1,0	-
Totale	10	

Tabella 6. Miscela di reazione Pospisense 2: CEVd, TASVd

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O DEPC	3,35	-
Master Mix 2X	5,0	1 X
RT enzyme mix 4	0,25	1 X
Mix di primers Pospisense 2	0,3	0.24 μ M
Sonda Pospip5	0,1	0.08 μ M
RNA	1,0	-
Totale	10	

- Mescolare bene le soluzioni. Distribuire 9 μ L di miscela di reazione per ciascuna pozzetto della piastra.
- Aggiungere 1 μ L di estratto di TRNA in ciascun pozzetto.
- Chiudere la piastra con l'apposita pellicola ottica, inserirla nel termociclatore ed avviare il programma di amplificazione, impostato secondo la sequenza termica indicata in tabella 7.

Tabella 7. Ciclo termico per la diagnosi dei Pospiviroidi

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione	48°C	10'	1
Denaturazione	95°C	10'	1
Amplificazione	95°C	10''	40
	60°C	60'	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 11 di 12

3.1 Valutazione dei risultati

L'esito del saggio si basa sulla espressione qualitativa che rileva assenza/presenza del patogeno target. Un saggio si considera attendibile quando, per ogni reazione si ottiene:

- sul controllo positivo una curva esponenziale
- sul controllo negativo e il bianco nessuna amplificazione o curve non esponenziali.

Per la definizione del risultato si può applicare il seguente schema ad entrambe le reazioni di amplificazione:

		Risultato pozzetto 1		
		<i>Ct</i> < 35	$35 \leq Ct \leq 40$	no <i>Ct</i>
Risultato pozzetto 2	<i>Ct</i> < 35	Positivo	Dubbio	Dubbio
	$35 \leq Ct \leq 40$	Dubbio	Negativo	Negativo
	No <i>Ct</i>	Dubbio	Negativo	Negativo

In caso di esito dubbio, il test va ripetuto. La presenza/assenza del parametro nel campione analizzato è assegnata sulla base della seguente matrice:

		Risultato Pospisense 1	
		Positivo	Negativo
Risultato Pospisense 2	Positivo	Parametro presente	Parametro presente
	Negativo	Parametro presente	Parametro assente

4. Validazione del metodo diagnostico così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione

I materiali biologici di riferimento utilizzati sono campioni provenienti dalla collezione di piante infette da Pospiviroidi presente nel CREA-DC (sede di Roma), la presenza/assenza dei viroidi è stata confermata sia da analisi diagnostiche che tramite sequenziamento. In particolare, sono stati usati: piante di pomodoro infette da tutti i pospiviroidi diagnosticati dal metodo, semi infetti ottenuti a partire da queste piante, piante di pomodoro sane e piante infette da patogeni no-target e semi di pomodoro sani di diverse origini.

Le piante utilizzate come controlli negativi e positivi sono riportate di seguito in tabella 8:

Tabella 8. Materiali vegetali utilizzati per la validazione del metodo di prova

MATERIALI DI RIFERIMENTO UTILIZZATI			
N°	VARIETA'	CODICE CREA-DC	STATO FITOSANITARIO
1	<i>S. lycopersicum</i> (semi)	MR5	SANO

Documento tecnico ufficiale n.13	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di pospiviroidi da semi di pomodoro	Pag. 12 di 12

2	<i>S. lycopersicum</i>	MR50	INFETTO DA ToBRFV
3	<i>S. lycopersicum</i>	MR 47	INFETTO DA PePMV
4	<i>S. lycopersicum</i>	PV-1267	INFETTO DA ToMMV
5	Citrus spp.	CMC-B	INFETTO DA HSVd
6	<i>S. lycopersicum</i>	MR6	INFETTO DA CEVd
7	<i>S. lycopersicum</i>	MR44	INFETTO DA CLVd
8	<i>S. lycopersicum</i>	CSVd-1	INFETTO DA CSVd
9	<i>S. lycopersicum</i>	MPVd-1	INFETTO DA MPVd
10	<i>S. lycopersicum</i>	MR45	INFETTO DA PSTVd
11	<i>S. lycopersicum</i>	MR46	INFETTO DA TASVd
12	<i>S. lycopersicum</i>	TCDVd-1	INFETTO DA TCDVd
13	<i>S. lycopersicum</i> (semi)	MR48	INFETTO DA TASVd
14	<i>S. lycopersicum</i> (semi)	MR47	INFETTO DA PSTVd
15	<i>S. lycopersicum</i> (semi)	MR44	INFETTO DA CLVd
16	<i>S. lycopersicum</i> (semi)	MR6S	INFETTO DA CEVd

Il materiale vegetale è in conservazione presso le serre del DIALAB sede di Roma.

Tutti i dati sono stati ottenuti mediante procedure sperimentali definite ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma, i valori ottenuti sono riportati in tabella 9.

Tabella 9. Criteri di performance utilizzati per la validazione del metodo di prova e valori ottenuti per il metodo di prova RT-qPCR

Criterio di performance scelto per la validazione	Valori di performance ottenuti	Adeguatezza in base all'analisi dei rischi di validazione per lo scopo e l'utilizzo previsti	Documentazione disponibile presso DIALAB
sensibilità analitica (LOD)	1 seme infetto su 999 sani;	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Sensibilità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
specificità diagnostica	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
ripetibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
riproducibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)