

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 14

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose
fruit virus**

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.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 2 di 16

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Tomato brown rugose fruit virus	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	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.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	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.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	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.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 6 di 16

Tomato brown rugose fruit virus

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

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo) Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

Tassonomia
 Ordine: *Martellivirales*
 Famiglia: *Vigaviridae*
 Genere: *Tobamovirus*

Avversità causata -

1. Protocollo diagnostico del Tomato brown rugose fruit virus da seme e foglie di pomodoro e foglie di peperone

Questo protocollo diagnostico ha lo scopo di rilevare la presenza del tomato brown rugose fruit virus, a partire da seme di pomodoro, tramite reazione di retrotrascrizione ed amplificazione molecolare quantitativa (RT-qPCR) in singolo stadio.

Ai sensi dei Regolamenti di esecuzione (UE) 2020/1191 e 2021/74, i metodi molecolari per il rilevamento e l'identificazione del tomato brown rugose fruit virus su seme di pomodoro sono esclusivamente la reazione RT-qPCR con utilizzo dei primers e sonde descritti nel protocollo ISHI-Veg (metodo ISHI-Veg) e in Menzel and Winter, 2021 [Acta Hort. 1316, 143-148] (metodo Menzel & Winter).

Il presente protocollo diagnostico prevede l'esecuzione di un primo saggio, con uno dei due metodi sopra citati, su tutti i campioni seguito da un secondo saggio confermativo eseguito con l'altro metodo, esclusivamente sui campioni risultati dubbi/positivi nella prima reazione di amplificazione. Non è necessario seguire un ordine prestabilito nell'esecuzione dei due metodi (Menzel & Winter e ISHI-Veg) descritti nei successivi paragrafi, ma è fondamentale confermare i campioni risultati dubbi/positivi nella prima reazione RT-qPCR per il rilevamento del ToBRFV con un secondo saggio, diverso dal primo.

Di seguito si riporta il diagramma di flusso che descrive la procedura diagnostica a partire da seme (figura 1).

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 7 di 16

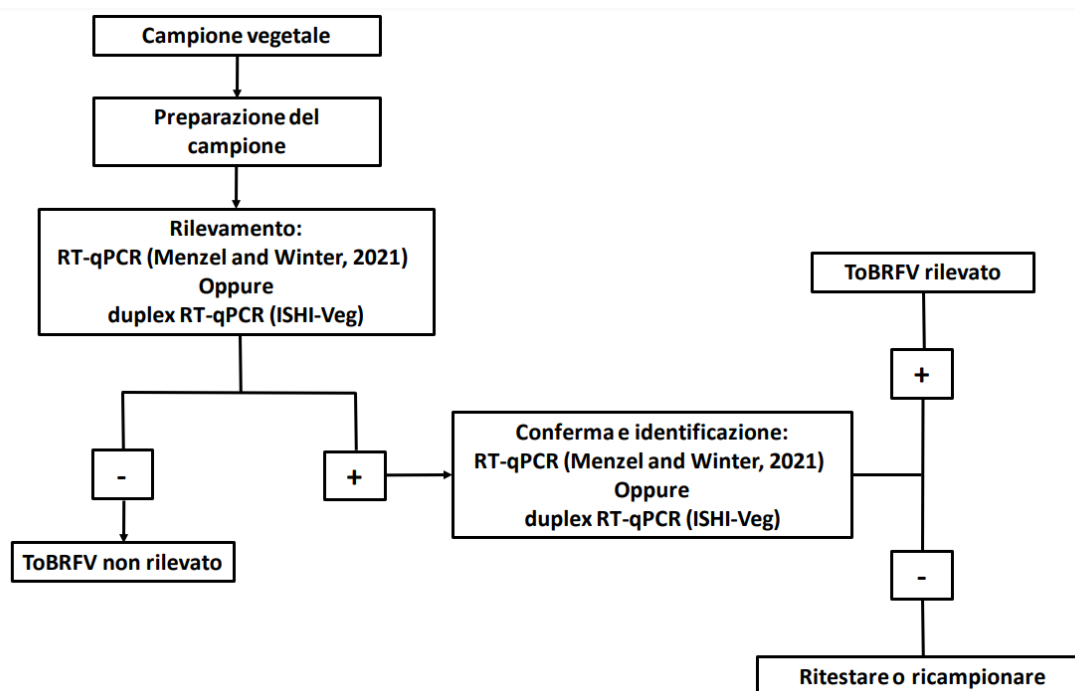


Figura 1. Diagramma di flusso della procedura diagnostica del ToBRFV in semi di pomodoro.

2. Metodo di prova RT-qPCR

2.1 Materiale vegetale

Il presente metodo di prova è stato validato su campioni fogliari e semi di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e campioni fogliari di peperone (*Capsicum annuum* spp).

Il metodo di prova si applica su campioni (materiale fogliare di pomodoro e peperone e/o lotti di semi di pomodoro) ben conservati che vengono campionati in base alla loro grandezza. In particolare, per i semi si prevede una dimensione massima del campione pari a 3000 semi da dividere, grazie al peso, in 3 sub-campioni da 1000 semi ciascuno analizzato separatamente.

Il metodo necessita di materiale vegetale ben conservato; il campione costituito da foglie può essere conservato al massimo una settimana in buste sigillate a $6^{\circ}\text{C} \pm 3$, mentre i semi possono essere conservati, sempre in buste sigillate a $6^{\circ}\text{C} \pm 3$ per un periodo massimo di un mese.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 8 di 16

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli:

- controllo positivo: campione vegetale infetto da ToBRFV che è garante per l'esito del test manifestando la reazione di amplificazione;
- controllo negativo: campione vegetale sicuramente esente ToBRFV che è garante per l'esito del test, non manifestando 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).

2.2 Preparazione dei campioni

2.2.1 Campioni fogliari (pomodoro/peperone)

- Prelevare una porzione omogenea di foglie (se il campione è costituito da un pool di foglie, assicurarsi di prendere una porzione da ogni foglia che compone il campione) e riporre 1 g di tessuto fogliare nella corrispondente bustina numerata.
- Aggiungere 10 mL di tampone di estrazione PO₄ (rapporto peso volume 1:10) e macerare il campione con un omogeneizzatore.

Preparazione del tampone di estrazione PO₄

Preparare il tampone di estrazione rispettando le concentrazioni dei reagenti riportate nella successiva tabella.

Tabella 1. Composizione del tampone PO₄

Tampone di estrazione PO ₄	portare ad 1 L con acqua distillata
Na ₂ HPO ₄ 0,5 M	57 mL
KH ₂ PO ₄ 0,5 M	143 mL

Portare/aggiustare a pH 7,2.

Possono essere preparati anche volumi minori di soluzioni rispettando le proporzioni di sali e soluzioni.

Le soluzioni di Na₂HPO₄ 0,5 M e di KH₂PO₄ 0,5 M possono essere conservate a temperatura ambiente fino a sei mesi dalla preparazione. Il tampone PO₄ può essere conservato dopo la preparazione fino a tre mesi a 4°C ± 3.

2.2.2 Campioni di semi (pomodoro)

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 9 di 16

- Se il lotto di seme da analizzare supera i 1000 semi, dividere il lotto in sub-campioni di circa 1000 semi ciascuno, al massimo; stimare il numero dei semi del lotto sulla base del peso di un'aliquota rappresentativa (250 semi). In caso di lotti o sub-campioni con 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 secondi.

Preparazione del tampone di estrazione GH+

Preparare il tampone di estrazione rispettando le concentrazioni dei reagenti riportate nella successiva tabella.

Tabella 2. Composizione 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

Sciogliere la guanidina idrocloruro in 400 mL di acqua, aggiungere il PVP-10 precedentemente disciolto in poca acqua, aggiungere la soluzione di acetato di sodio (4M) e l'EDTA in polvere.

Portare a volume con acqua distillata e sterilizzare.

Preparare la soluzione di DTT (5M) sciogliendo 7,71 g di DTT in 10 mL Acqua RNasi free in un contenitore sterile. La soluzione di DTT può essere conservata dopo la preparazione fino a sei a 4°C ± 3. Il volume delle soluzioni preparate può variare in base alla quantità di campioni attesi rispettando le proporzioni di sali e soluzioni riportate.

Il tampone GH+ può essere conservato dopo la preparazione fino a sei mesi a 4°C ± 3.

2.3 Estrazione dell'RNA totale

Materiale fogliare (macerato in tampone PO₄)

- Prelevare 100 µL di omogenizzato (vedi sezione 2.2.1) e mescolarlo con 380 µL di tampone RLT, caricare tutto sulla colonnina viola – “QIAshredder spin column” – colonnine viola e centrifugare 2 minuti a massima velocità.

- Trasferire tutto il liquido in una nuova provetta sterile da 2 mL (circa 450 μ L) e aggiungere 0,5 volumi di etanolo assoluto (circa 225 μ L) e mescolare pipettando bene.
- Trasferire la soluzione (circa 675 μ L) nelle "RNeasy spin column" - colonnine rosa e centrifugare per 15 sec a 11000 rpm, eliminare il lisato.
- Aggiungere alla colonnina 700 μ L di buffer RW1 e centrifugare per 15 secondi a 11000 rpm, eliminare il filtrato.
- Aggiungere 500 μ L di buffer RPE (precedentemente diluito con l'opportuna quantità di etanolo assoluto). Centrifugare per 15 secondi a 11000 rpm. Eliminare l'eluato e ripetere il passaggio centrifugando a 11000 rpm per 2 minuti.
- Centrifugare a velocità massima per 1 minuto a vuoto.
- Posizionare la colonnina rosa su una provetta sterile da 1,5 mL, aggiungere 50 μ L di acqua RNase-free, chiudere il tappo e centrifugare per 1 minuto a 9500 rpm per eluire l'RNA.

Semi (macerati in tampone GH+)

- Trasferire 1 mL di soluzione (vedi sezione 2.2.2) in una provetta sterile, aggiungere 30 μ L di DTT (5M) e incubare a 65 °C \pm 3 per 15 minuti agitando a 850 rpm nel termostato agitato.
- Centrifugare a 16000 giri per 10 minuti, prelevare 750 μ L del surnatante ottenuto e caricarli nella colonnina viola, "QIAshredder spin column" e centrifugare 2 minuti a massima velocità.
- Preparare delle nuove provette sterili e riempirle con 300 μ L di etanolo assoluto e trasferirci 600 μ L del percolato ottenuto dalla fase 2 e mescolare bene la soluzione con la pipetta.
- Trasferire la soluzione 700 μ L della soluzione nelle "RNeasy spin column" - colonnine rosa e centrifugare per 30 secondi a 16000 giri, eliminare l'eluato.
- Aggiungere alla colonnina 700 μ L di buffer RW1 e centrifugare per 30 secondi a 16000 giri, eliminare il filtrato ottenuto dopo la centrifugazione.
- Aggiungere 500 μ L di buffer RPE (precedentemente eluito con l'opportuna quantità di etanolo assoluto). Centrifugare per 30 secondi a 16000 giri a 4 °C \pm 3. Eliminare l'eluato e ripetere il passaggio centrifugando per 2 minuti.
- Centrifugare a velocità massima per 1 minuto a vuoto.
- Posizionare la colonnina rosa su nuove provette sterili da 1,5 mL, aggiungere 50 μ L di acqua RNase-free, chiudere il tappo e lasciare incubare 1 minuto e centrifugare per 1 minuto a 8000 giri per eluire l'RNA. Ripetere aggiungendo altri 50 μ L di acqua RNase-free.

2.4 Esecuzione metodo di prova RT-qPCR (Menzel and Winter, 2021)

Le sequenze dei primers e della sonda utilizzati sono indicate in tabella 3, mentre la composizione della miscela di primers e sonda e della miscela di reazione sono riportate nelle seguenti tabelle 4 e 5.

Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus Tabella 3. primers e sonda utilizzati nella reazione di RT-qPCR	Pag. 11 di 16

ToBRFV Fw qs1	5'-CAA TCA GAG CAC ATT TGA AAG TGCA-3'
ToBRFV Rev qas2	5'-CAG ACA CAA TCT GTT ATT TAA GCA TC-3'
ToBRFV p1	5'-6FAM-ACA ATG GTC CTC TGC ACC TG-BHQ1-3

Tabella 4. Miscela di primers e sonda per l'amplificazione del ToBRFV

	Volume (μL) per singolo campione	Concentrazione finale (μM)
Acqua DePC	3.67	-
ToBRFV Fw qs1	0.03	0.3
ToBRFV Rev qas2	0.03	0.3
ToBRFV Pr p1	0.025	0.25
Totale	3.75	

Tabella 5. Miscela di reazione per l'amplificazione del ToBRFV)

Reagenti	Volume per reazione (μL)	Concentrazione finale
TaqMan RT-PCR Master mix	5,0	1x
RT enzyme mix	0,25	1x
Miscela di primers e sonda	3,75	0,3 μ M primer 0,25 μ M sonde
RNA	1	
Totale	10	

Mescolare bene le soluzioni e distribuire 9 μ L di miscela di reazione per ciascun pozzetto della piastra. Aggiungere 1 μ L di estratto di TRNA in ciascun pozzetto. Il ciclo di termico per la reazione di amplificazione in one-step RT-qPCR è riportato nella tabella 6.

Tabella 6. Ciclo termico per l'amplificazione RT-qPCR

Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 12 di 16

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

Esecuzione metodo di prova duplex RT-qPCR (ISHI-Veg)

Le sequenze dei primers da utilizzare per la reazione, che si differenzia per il tipo di matrice (campioni fogliari o semi) sono riportate in tabella 7, mentre le miscele dei primers e delle sonde sono riportate nelle seguenti tabelle 8 e 9.

Tabella 7. Primers e sonde utilizzate per il metodo di prova duplex RT-qPCR

ToBRFV CaTa28 Fw	5'-GGT GGT GTC AGT GTC TGT TT-3'
ToBRFV CaTa28 Rev	5'-GCG TCC TTG GTA GTG ATG TT-3
ToBRFV CaTa28 Pr	5'-6FAM-AGAGAATGGAGAGAGCGGACGAGG-BHQ1-3
ToBRFV CSP1321 Fw	5'-CAT TTG AAA GTG CAT CCG GTT T-3
ToBRFV CSP1321 Rev	5'-GTA CCA CGT GTG TTT GCA GAC A-3'
ToBRFV CSP1321 Pr	5'-HEX-ATGGTCCTCTGCACCTGCATCTTGAGA-BHQ1-3

Tabella 8. Miscela di primers e sonde per l'amplificazione di ToBRFV in campioni fogliari

	Volume (µL) per singolo campione	Concentrazione finale (µM)
Acqua DePC	3,67	-
ToBRFV Cata28 Fw	0,015	0,15
ToBRFV CaTa28 Rev	0,015	0,15
ToBRFV CaTa28 Pr	0,01	0,1
ToBRFV CSP1325 Fw	0,015	0,15
ToBRFV CSP1325 Rev	0,015	0,15
ToBRFV CSP1325 Pr	0,01	0,1
Totale	3,75	

Tabella 9. Miscela di primers e sonde per l'amplificazione di ToBRFV in campioni di seme

Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 13 di 16

	Volume (μL) per singolo campione	Concentrazione finale (μM)
Acqua DePC	2,59	-
ToBRFV Cata28 Fw	0,03	0,3
ToBRFV CaTa28 Rev	0,03	0,3
ToBRFV CaTa28 Pr	0,02	0,2
ToBRFV CSP1325 Fw	0,03	0,3
ToBRFV CSP1325 Rev	0,03	0,3
ToBRFV CSP1325 Pr	0,02	0,2
Totale	2,75	

La composizione della miscela di reazione, che si differenzia per il tipo di matrice (campioni fogliari o semi), è riportata nelle tabelle 10 e 11.

Tabella 10. Miscela di reazione per l'amplificazione di ToBRFV in campioni fogliari

Reagenti	Volume per reazione (μL)	Concentrazione finale
TaqMan RT-PCR Master mix	5,0	1x
RT enzyme mix	0,25	1x
Miscela di primers e sonde	3,75	0,3 μ M primer 0,2 μ M sonde
RNA	1	
Totale	10	

Tabella 11. Miscela di reazione per l'amplificazione di ToBRFV in campioni di seme

Reagenti	Volume per reazione (μL)	Concentrazione finale
TaqMan RT-PCR Master mix	5,0	1x
RT enzyme mix	0,25	1x
Miscela di primers e sonde	2,75	0,3 μ M primer 0,2 μ M sonde
RNA	2	
Totale	10	

Mescolare bene le soluzioni e distribuire 9 (foglia) o 8 (semi) μ L di miscela di reazione per ciascun pozzetto della piastra. Aggiungere 1 (foglia) o 2 (semi) μ L di estratto di TRNA in ciascun pozzetto. Il ciclo di termico per la reazione di amplificazione in one-step RT-qPCR è riportato nella tabella 12.

Tabella 12. Ciclo termico per l'amplificazione RT-qPCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Trascrizione inversa	48 °C	10'	1

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 14 di 16

Denaturazione	95 °C	10'	1
Amplificazione	95 °C	10''	40
	60 °C	60''	

3. Valutazione dei risultati

L'esito del saggio, con entrambi i metodi, si basa sulla espressione qualitativa che rileva assenza/presenza del patogeno target. Il rilevamento della positività/negatività è di tipo visivo/numerico mediante osservazione dell'andamento delle curve di amplificazione e relativo valore di C_t , come nella tabella di seguito riportata (Tabella 13), registrato nell'emissione della fluorescenza della sonda.

Sia per il metodo Menzel & Winter, sia per quello ISHI-Veg, il saggio si considera attendibile quando, per ogni reazione:

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

N.B. 1: solo se entrambe le suddette condizioni sono soddisfatte, gli eventuali campioni che presentano una curva esponenziale di amplificazione verranno considerati positivi.

N.B. 2: la presenza di ToBRFV nel campione analizzato è attribuita solo ed esclusivamente in caso di positività con entrambi i metodi di RT-qPCR utilizzati (Menzel&Winter e ISHI-Veg).

Tabella 13. Matrice per l'interpretazione dei risultati per entrambi i metodi di amplificazione RT-qPCR (Menzel&Winter e ISHI-Veg)

		Risultato pozzetto 1		
		$C_t < 32$	$32 \leq C_t \leq 40$	no C_t
Risultato pozzetto2	$C_t < 32$	Positivo	Dubbio	Dubbio
	$32 \leq C_t \leq 40$	Dubbio	Negativo	Negativo
	no C_t	Dubbio	Negativo	Negativo

4. Validazione dei metodi di prova RT-qPCR Menzel & Winter e ISHI-Veg così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione

I materiali biologici di riferimento utilizzati sono campioni provenienti dalla collezione di piante infette da ToBRFV presente nel CREA-DC (sede di Roma) e isolati acquistati dalla DSMZ (tabella 14). La presenza/assenza del virus è stata confermata sia mediante test diagnostici sia tramite sequenziamento di prodotti di amplificazione. In particolare, sono state usate piante di pomodoro o peperone infettate con gli isolati virali riportati in tabella 14.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.14	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato brown rugose fruit virus	Pag. 15 di 16

Tabella 14. Materiali di riferimento utilizzati per la validazione

MATERIALI DI RIFERIMENTO UTILIZZATI			
N°	SPECIE	STATO FITOSANITARIO	CODICE IDENTIFICATIVO CAMPIONE NELLA VALIDAZIONE
1	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	MR50 ToB-SIC21/19
2	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	ToB-SIC22/19
3	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	ToB-SIC23/19
4	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	ToB-SIC24/19
5	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	ToB-SIC 25/19
6	<i>S. lycopersicum/C. annuum</i>	Infetto da ToBRFV	ToB-PIE105/2019
7	Non nota	Infetto da ToBRFV	PV-1236
8	Non nota	Infetto da ToBRFV	PV-1241
9	Non nota	Infetto da ToBRFV	PV1244
10	Non nota	no-target	ToMV PV-0141
11	Non nota	no-target	TMV PV-1252
12	Non nota	no-target	PMMoV PV-0165
13	Non nota	no-target	BPeMV PV-0170
14	Non nota	no-target	TMGMV PV-0124
15	<i>S. lycopersicum</i>	sano	MR 5
16	<i>C. annuum</i>	sano	-

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 15.

Tabella 15. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi 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 il DIALAB
Sensibilità analitica (LOD)	Foglie pomodoro:10 ⁻⁷ Foglie peperone:10 ⁻⁵ Semi pomodoro:10 ⁻⁴	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)

Sensibilità diagnostica	Foglie pomodoro: 100% Foglie peperone: 100% Semi pomodoro: 100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Specificità diagnostica	Foglie pomodoro: 100% Foglie peperone: 100% Semi pomodoro: 100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Ripetibilità	Foglie pomodoro: 100% Foglie peperone: 100% Semi pomodoro: 100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)
Riproducibilità	Foglie pomodoro: 100% Foglie peperone: 100% Semi pomodoro: 100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (4)