

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 15

Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Tilletia indica*

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. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 2 di 15

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Tilletia indica</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 3 di 15

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 4 di 15

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. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 5 di 15

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. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 6 di 15

Tilletia indica

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

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome	<i>Tilletia indica</i> Mitra
Tassonomia	Ordine: <i>Tilletiales</i> Famiglia: <i>Tilletiaceae</i> Genere: <i>Tilletia</i>
Avversità causata	Karnal bunt, carie parziale del grano

1. Protocollo diagnostico della *Tilletia indica*

Scopo del presente metodo di prova è rilevare la presenza del fungo *Tilletia indica* (nome scientifico *Tilletia indica* Mitra), agente della carie parziale del grano, nota come 'Karnal bunt', in cariossidi di grano. Il metodo si basa sull'individuazione delle teliospore del fungo mediante un filtraggio selettivo dell'acqua di lavaggio di una parte del campione di seme di grano in esame (3 sub-campioni da 50 ± 3 g) e successiva osservazione al microscopio ottico del materiale che si ottiene per l'eventuale identificazione attraverso i caratteri morfologici delle teliospore di *Tilletia* spp. presenti. In presenza di teliospore sospette e ascrivibili a *Tilletia* spp. in numero inferiore a 10 teliospore si procede all'estrazione di DNA dai pellet derivanti dai lavaggi di altri 3 sub-campioni di 50 ± 3 g, seguita da una pre-amplificazione in PCR convenzionale con primers specifici per *Tilletia* spp. e dall'identificazione tramite Real-Time PCR con primers e sonda specifici per *T. indica*. Nel caso in cui si rilevino dieci o più teliospore, l'analisi molecolare è necessaria solo in caso di dubbio nell'identificazione morfologica. Il metodo permette di rilevare il patogeno in modo qualitativo: assenza/presenza.

Di seguito si riporta il diagramma di flusso relativo al processo diagnostico per il rilevamento di *T. indica*.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 7 di 15

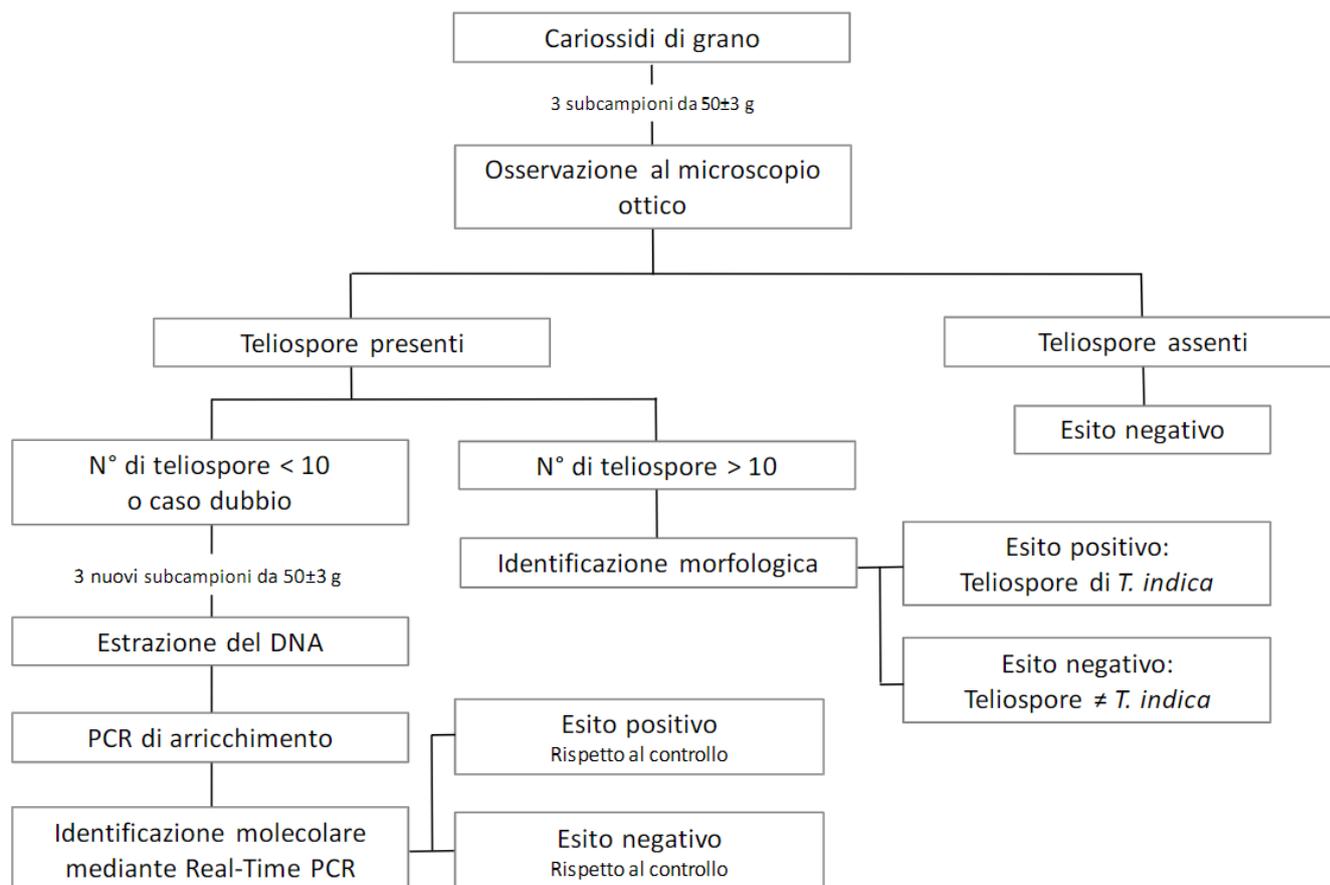


Figura 1. Diagramma di flusso del processo da seguire per il rilevamento e l'identificazione di *Tilletia indica*.

2. Procedura operativa

2.1. Wash test

Sterilizzare filtri, imbuti e beute in ipoclorito di sodio diluito in acqua 3:7 (v/v) per 15 minuti e successivamente sciacquare 2 volte con acqua di rubinetto. Sotto cappa bio-hazard, il campione viene suddiviso in 3 sub-campioni di 50 ± 3 g ciascuno. Il sub-campione viene trasferito in una beuta da 250 mL in cui si aggiungono 100 mL di una soluzione di Tween20 allo 0,01%, preparata con 100 mL di acqua distillata e 20 μ L di Tween20 50%. Sigillare la beuta con della pellicola, quindi procedere come di seguito dettagliato.

1. Agitare manualmente la beuta per 3 min circa.
2. Posizionare il filtro da 53 μ m in un imbuto posto su una beuta da 500 mL e filtrare l'intero contenuto della prima beuta (acqua di lavaggio e cariossidi).
3. Disporre le cariossidi sul filtro, con l'aiuto di una spatola, in modo da occupare omogeneamente l'intera superficie.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 8 di 15

4. Risciacquare la beuta utilizzata al punto 1 con 20-50 mL di acqua distillata e versare nel filtro da 53 µm.
5. Sciacquare le cariossidi presenti sul filtro con altra acqua distillata servendosi di una spruzzetta fino ad ottenere un volume di circa 300-400 mL.
6. Rimuovere il filtro da 53 µm dall'imbuto e risciacquare quest'ultimo con 2 aliquote di 10-20 mL di acqua distillata. Il campione di semi si conserva temporaneamente in un tubo da 50 mL, fino alla conclusione dell'analisi morfologica.
7. Posizionare il filtro da 20 µm in un imbuto posto su una beuta da 500 mL.
8. Versare tutta la prima soluzione di lavaggio ottenuta fino al punto 6 all'interno del filtro da 20 µm, poco alla volta.
9. Risciacquare la beuta 2 volte con 20 mL di acqua distillata versando il risciacquo sul filtro da 20 µm.
10. Inclinare il filtro da 20 µm di 30-45° e sciacquare delicatamente concentrando il deposito in una parte del filtro.
11. Recuperare la sospensione del deposito ottenuto, contenente le eventuali teliospore della *T. indica*, e trasferire in una provetta da 1,5 mL.
12. Ripetere i punti 11 e 12 fino a che il filtro non rimane pulito; se necessario si possono utilizzare più provette per recuperare più volume di risospensione.
13. Centrifugare la sospensione raccolta a 2000 g per 3 min.
14. Rimuovere delicatamente il surnatante.
15. Risospendere il pellet in acqua sterile fino ad un volume di 50-100 µL, in base alla densità del pellet. Nel caso in cui sono state usate più provette per concentrare lo stesso filtrato, al termine della centrifuga i pellet si risospendono e si uniscono in una stessa provetta, mantenendo un volume massimo di 100 µL.
16. Prelevare 20 µL della sospensione, trasferirli su un vetrino portaoggetto e coprire con un coprioggetto 18X18 evitando la formazione di bolle d'aria*.
17. Osservare l'intero vetrino al microscopio ottico per l'identificazione morfologica di eventuali teliospore di *T. indica*
18. Ripetere il punto 17 con altri 20 µL fino ad esaurimento della sospensione del punto 16.

Se vengono rinvenute teliospore sospette, le cariossidi dei campioni sottoposti al *Wash Test* e del campione di partenza possono essere ispezionate visivamente, per trovare eventuali sori o cariossidi parzialmente cariate.

2.2. Identificazione morfologica

Per le osservazioni al microscopio si inizia utilizzando l'obiettivo 20X per ricercare la presenza di corpi sospetti. Una volta visualizzata l'area d'interesse, si passa all'obiettivo 40X per una migliore definizione dell'immagine che possa consentire l'osservazione dei caratteri morfologici d'interesse e per la misurazione delle eventuali teliospore. Per l'identificazione morfologica di *T. indica* si applica lo schema diagnostico riportato nella tabella seguente (tabella 1), registrando i caratteri morfologici delle teliospore presenti (dimensioni, colore,

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 9 di 15

ornamentazione), confrontando le immagini al microscopio con foto di repertorio disponibili in letteratura.

Tabella 1. caratteristiche morfologiche delle teliospore di *T. indica*, *T. walkeri* e *T. horrida*. Le celle in grigio indicano il carattere conforme alla corrispondente specie.

		<i>T.indica</i>	<i>T.walkeri</i>	<i>T.horrida</i>
Dimensioni massime diametro (µm)	45-50+			
	36-45			
	<36			
Dimensioni medie diametro (µm)	35-41			
	30-31			
	24-28			
	18-20			
Colore	Arancione pallido ma prevalentemente marrone rossastro scuro fino a nero opaco.			
	Da giallo pallido a prevalentemente marrone rossastro (mai opaco).			
	Da giallo pallido a prevalentemente castano chiaro o scuro (fino a semi-opaco).			
Spine (ornamentazione dell'episporio) viste con messa a fuoco superficiale e mediana	Dense; echinulate o creste strettamente ravvicinate (finemente cerebriforme). Appuntite o tronche, occasionalmente ricurve.			
	Grossolane, creste ampie incompletamente cerebriformi (formazioni di tipo coralloide) oppure in aggregati molto spessi. Da coniche a tronche.			
	Echinulate; scaglie poligonali con messa a fuoco superficiale; occasionalmente creste cerebriformi o raramente aggregati. Appuntite, possono trasformarsi in scaglie tronche, occasionalmente ricurve.			

Se in nessuno dei tre sub-campioni sottoposti a *Wash Test* sono rilevate teliospore sospette di *T. indica*, il parametro *T. indica* si considera assente. Se in almeno uno dei tre sub-campioni si determina il riconoscimento morfologico di *T. indica*, il parametro si considera presente.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 10 di 15

2.3. Identificazione molecolare

Poiché molti caratteri morfologici si sovrappongono e l'identificazione morfologica delle singole specie è spesso dubbia, qualora vengano identificate meno di 10 teliospore sospette, è sempre necessario procedere con l'analisi molecolare. Nel caso in cui si rilevano 10 o più teliospore, l'analisi molecolare è necessaria solo in caso di dubbio identificativo. L'estrazione del DNA si effettua sul pellet ottenuto dal Wash Test al punto 15.

2.3.1. Estrazione di DNA da teliospore di *T. indica* o da pellet *Wash Test* (kit NucleoSpin Plant II, Macherey-Nagel)

Sterilizzare i micropestelli incubandoli per 15 minuti in ipoclorito di sodio diluito in acqua 3:7 (v/v) e successivamente sciacquati 2 volte con acqua di rubinetto. Effettuare contemporaneamente tutto il procedimento di estrazione sul controllo negativo di estrazione e sul controllo positivo di estrazione.

- Aggiungere 100 µL di buffer PL1 e omogeneizzare il pellet ottenuto dal *Wash Test* (o le teliospore del target) con il micropestello per circa 30 secondi. Aggiungere altri 300 µL di buffer PL1.
- Aggiungere 10 µL di RNase A al lisato e mischiare con il vortex.
- Incubare la sospensione per 10 minuti a 65°C ± 3.
- Trasferire la sospensione in una "NucleoSpin Filter" inserita in un tubo da collezione (entrambi forniti dal kit) e centrifugare a 11000xg per 2 minuti.
- Trasferire l'eluato in una provetta da 1,5 mL e aggiungere 450 µL di Buffer PC. Mischiare bene con il vortex.
- Trasferire il campione (massimo 700 µL) in una "NucleoSpin Plant II Column" inserita in un nuovo tubo da collezione (entrambi forniti dal kit) e centrifugare a 11000 x g per 1 minuto. Scartare l'eluato. Se il volume del campione è maggiore di 700 µL, ripetere questo passaggio.
- Aggiungere 400 µL di Buffer PW1 nella colonna e centrifugare a 11000 x g per 1 minuto. Scartare l'eluato.
- Aggiungere 700 µL di Buffer PW2 nella colonna e centrifugare a 11000 x g per 1 minuto. Scartare l'eluato.
- Aggiungere 200 µL di Buffer PW2 nella colonna e centrifugare a 11000 x g per 2 minuti. Scartare l'eluato.
- Inserire la "NucleoSpin Plant II Column" in una nuova provetta da 1,5 mL. Depositare 50 µL di Buffer PE (preriscaldato a 65°C ± 3) sulla membrana. Incubare la "NucleoSpin Plant II Column" per 5 minuti a 65°C ± 3. Centrifugare a 11000xg per 1 minuto.

Il DNA purificato può essere conservato in frigorifero per una settimana o a -20 ± 3 °C e si mantiene stabile fino a un massimo di 5 anni. Il DNA estratto dalle teliospore deve essere diluito 1:100 prima di essere usato come stampo per la reazione di Real-Time PCR.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 11 di 15

2.3.2. Amplificazione PCR di arricchimento (Biotaq polimerasi, Bioline) primers usati da Tan *et al.*, 2009

Per ciascun campione da analizzare si eseguono due reazioni di amplificazione. Preparare la miscela di reazione come descritto in tabella 2.

Tabella 2. Miscela di reazione per l'amplificazione PCR di arricchimento

Componenti	Volume (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O	8.4	-
NH ₄ Reaction Buffer	2.0	1X
dNTPs	0.4	0.2 mM
MgCl ₂	2.0	5 mM
BSA	1.0	0.5 mg/mL
MK56	1.0	0.5 μM
Tilletia-R	1.0	0.5 μM
Biotaq polimerasi, Bioline	0.2	0.05 U/ μL
DNA	4.0	
Totale	20	

Le sequenze dei primers utilizzati sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3. Primers utilizzati per l'amplificazione PCR di arricchimento

MK56	5' - GTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATT - 3'
Tilletia-R	5' - CAAGAGATCCGTTGTCAAAAAGTTG - 3'

Il ciclo termico della PCR di arricchimento è descritto nella seguente tabella 4.

Tabella 4. ciclo termico per l'amplificazione PCR di arricchimento

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	95 °C	3'	1
	94 °C	20"	
1 ^a amplificazione	Touch-down da 63° a 59°C (-1°C/ciclo)	30"	5

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 12 di 15

	72 °C	30''	
	94°C	20''	
2 ^a amplificazione	59°C	30''	15
	72°C	30''	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Hold	4 °C	∞	1

Terminata la PCR di arricchimento i campioni possono essere amplificati subito in Real-Time PCR o conservati a 4°C per una settimana e amplificati successivamente.

2.3.3. Saggio Real-Time PCR (Immolase DNA Polimerasi, Biorline) primers usati da Tan *et al.*, 2009.

Preparare la miscela di reazione come riportato in tabella 5. Preparare sufficiente miscela per effettuare due ripetizioni tecniche per ciascun campione pre-amplificato.

Tabella 5. Miscela di reazione per il saggio Real-Time PCR

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH ₂ O	10.4	-
Tampone di amplificazione	2.0	1X
dNTPs	0.4	0.2 mM
MgCl ₂	2.0	5 mM
KB-DL-For	0.8	0.4 µM
KB-DL-Rev	1.8	0.9 µM
Probe TI	0.4	0.2 µM
Immolase DNA Polymerase	0.2	0.05 U/µL
DNA	2.0	-
Totale	20	

Le sequenze dei primers e sonda utilizzati sono riportati nella seguente tabella 6.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 13 di 15

Tabella 6. Primers e sonda utilizzati per il metodo di prova Real-Time PCR

KB-DL-For	5' - CTTCGGAAGAGTCTCCTT - 3'
KB-DL-Rev	5' - CCGGACAGGTACTIONCAG - 3'
Probe Ti	FAM -ACGGAAGGAACGAGGC-BHQ1

Il ciclo termico della Real-Time PCR è descritto in tabella 7.

Tabella 7. ciclo termico per il saggio Real-Time PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	95 °C	10'	1
	94 °C	15''	
1 ^a amplificazione	Touch-down da 65° a 60°C (-1°C/ciclo)	1'	6
	94°C	15''	
2 ^a amplificazione	60°C	1'	34

L'esito del saggio è di tipo qualitativo e rileva la presenza/assenza del DNA del patogeno.

Per un determinato campione, il saggio si considera positivo per *T. indica* se il suo *Ct* è inferiore o uguale al *Ct* LOD. L'esito dell'analisi molecolare si considera attendibile se i controlli previsti corrispondono a quanto atteso.

3. Valori di validazione ottenuti così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione

I materiali di riferimento utilizzati per la validazione sono riportati nella tabella sottostante. Il materiale di riferimento N. 1 (Grano sano, MR51) è stato valutato mediante analisi morfologica e molecolare per verificare l'assenza del parametro *T. indica*. Tutti gli isolati fungini vitali (target e NON target) di riferimento sono stati identificati tassonomicamente con analisi specifiche, morfologiche e molecolari, e sono conservati presso la collezione del CREA-DC a -20 °C in glicerolo. Per ciascun isolato sono stati preparati 3 campioni da 50 g di cariossidi di frumento sano (1) a cui sono state aggiunte le teliospore fungine.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 14 di 15

Tabella 6. Materiali di riferimento utilizzati per la validazione

N°	Materiale di riferimento	N. collezione fungina CREA-DC	Descrizione	Campo di applicazione
1	Cariossidi sane (MR51)	-	Cariossidi di frumento duro varietà Achille	Materiale di riferimento sano (parametro assente)
2	<i>Tilletia indica</i> isolato A	ER 2224	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	Parametro target controllo di specificità
3	<i>Tilletia indica</i> isolato B	ER 2225	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	Parametro target controllo di specificità
4	<i>Tilletia indica</i> isolato C (MR52)	ER 2226	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	Materiale di riferimento target
5	<i>Tilletia indica</i> isolato D	ER 2227	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	Parametro target controllo di specificità
6	<i>Tilletia indica</i> isolato G732	ER 2228	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	Parametro target controllo di specificità
7	<i>Tilletia indica</i> isolato I499	ER 2229	Teliospore vitali di <i>T. indica</i>	a Parametro target controllo di specificità
8	<i>Tilletia laevis</i>	ER 2235	Teliospore vitali di <i>T. laevis</i>	Controllo di specificità NON target
9	<i>Tilletia horrida</i>	TH riso96	Teliospore NON vitali di <i>T. horrida</i>	Controllo di specificità NON target
10	<i>Tilletia walkeri</i>	TW 6/98	Teliospore NON vitali di <i>T. walkeri</i> (aggiornamento del 18/11/2021)	Controllo di specificità NON target
11	Cariossidi sane 2a	-	Grano duro provenienza Foggia Varietà Duilio	Ospite del target per analisi selettività
12	Cariossidi sane 2b	-	Grano duro provenienza Foggia Varietà Svevo	Ospite del target per analisi selettività
13	Cariossidi sane 2c	-	Grano tenero provenienza Foggia Varietà Imerio	Ospite del target per analisi selettività
14	Cariossidi sane 2d	-	Grano tenero provenienza Foggia Varietà San Pastore	Ospite del target per analisi selettività

Le prove di validazione per sensibilità analitica dell'analisi morfologica sono state integrate per la valutazione dell'efficacia su 10 teliospore di *Tilletia* spp. Sono stati valutati 3 campioni, aggiungendo a ciascun pellet ottenuto da ciascun subcampione 10 teliospore di *Tilletia* spp.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 15	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Tilletia indica</i>	Pag. 15 di 15

secondo il seguente schema. La scelta è ricaduta su *T. walkeri* essendo la specie morfologicamente più simile al *T. indica*

Tabella 7. Criteri di performance utilizzati per la validazione dell'analisi morfologica

Subcampione	Teliospore aggiunte	Subcampione	Teliospore aggiunte	Subcampione	Teliospore aggiunte
A1	4 teliospore <i>T.indica</i> + 6 teliospore <i>T.walker</i>	B1	4 teliospore <i>T.indica</i> + 6 teliospore <i>T.walker</i>	C1	4 teliospore <i>T.indica</i> + 6 teliospore <i>T.walker</i>
A2	5 teliospore <i>T.indica</i> + 5 teliospore <i>T.walker</i>	B2	5 teliospore <i>T.indica</i> + 5 teliospore <i>T.walker</i>	C2	5 teliospore <i>T.indica</i> + 5 teliospore <i>T.walker</i>
A3	7 teliospore <i>T.indica</i> + 3 teliospore <i>T.walker</i>	B3	7 teliospore <i>T.indica</i> + 3 teliospore <i>T.walker</i>	C3	7 teliospore <i>T.indica</i> + 3 teliospore <i>T.walker</i>

Nei sub campioni in cui sono state aggiunte meno di 5 teliospore del parametro l'esito dell'analisi morfologica è stato considerato dubbio, stabilendo che nel mix di 10 teliospore di *Tilletia* spp, l'identificazione del parametro avviene quando è in numero > 5.

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 8.

Tabella 8. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti per l'identificazione molecolare

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)	5 teliospore di <i>T.indica</i> con analisi molecolare; 5 teliospore di <i>T.indica</i> in minimo 10 teliospore di <i>Tilletia</i> spp	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)
Ripetibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)
Riproducibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (3)