

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 23

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Phytophthora ramorum*,
*Phytophthora kernoviae***

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. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	Pag. 2 di 9

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</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. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</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. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</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. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	Pag. 6 di 9

Phytophthora ramorum*, *Phytophthora kernoviae

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome	<i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i> Brasier, Beales & S. A.
Tassonomia	Ordine: <i>Peronosporales</i> Famiglia: <i>Peronosporaceae</i> Genere: <i>Phytophthora</i>
Avversità causata	<i>P. ramorum</i> : Marciume radicale e del colletto, deperimento, ovvero "Sudden oak death" (SOD), moria <i>P. kernoviae</i> : Avvizzimento fogliare, moria e cancri su diverse piante arbustive o arboree in particolare faggio europeo

1. Protocollo di diagnosi

Il metodo si basa sulla Real Time PCR che utilizza primer/sonde disegnati nella regione del gene "ras-related protein gene *Ypt1*". Questo metodo è stato scelto in quanto le regioni non codificanti del gene *Ypt1* mostrano una sufficiente variabilità per lo sviluppo di sonde e primer in grado di ben discriminare le diverse specie del genere *Phytophthora* ed hanno inoltre una maggiore affidabilità rispetto alla regione ITS (*internal transcribed spacer*) dove *P. ramorum* risulta molto simile a *P. lateralis* con conseguenti fenomeni di falsi positivi.

2. Estrazione del DNA

Il DNA può essere estratto utilizzando diversi kit quali: Wizard (Promega), Qiagen DNeasy Plant Mini Kit e Macherey-Nagel "Nucleospin Plant II". I risultati ottenuti dalle prove comparative eseguite hanno evidenziato che la diagnosi non veniva alterata dal tipo di metodo/kit di estrazione. Per la validazione è stato utilizzato il kit di estrazione Wizard (Promega). Nel caso si disponesse di altro kit commerciale è necessario seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	Pag. 7 di 9

3. Real time PCR

3.1 Controlli

In ogni reazione di amplificazione PCR Real Time devono essere inseriti i seguenti controlli:

- Controllo negativo di amplificazione (NAC): DNA stampo è sostituito con H₂O.
- Controllo positivo di amplificazione (PAC): DNA target di *P. ramorum* o *P. kernoviae* diluito al limite di rivelazione (LOD). È utilizzato come valore di riferimento per la valutazione dei risultati e per confermare la correttezza di preparazione della reazione.

3.2 Primers e sonde (Schena *et al.* 2006)

Per la diagnosi di *P. ramorum* vengono utilizzati primers e sonda che permettono di ottenere una sequenza target di 87 paia di basi (bp) localizzata sul gene Ypt1 specifica per *P. ramorum* (*Yram*). Per la diagnosi di *P. kernoviae* vengono utilizzati primers e sonda che amplificano una sequenza target di 78 paia di basi (bp) localizzata sul gene Ypt1 specifica per *P. kernoviae* (*Yptc*). Le sequenze dei primers e delle sonde impiegate sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Primer e sonde utilizzati per l'amplificazione in Real Time PCR

Yram4F	5'-TTTGTGTCAGTGACCTCTCTCTCTCTC -3'
Yram3R	5'- GCATAAGTATAAGTCAGCAAGCCTGT-3'
YramP	5'FAM-AGAACACGATCCCCTCGTCAGCAGTC-BHQ1-3'
Yptc3F	5'-GCTCCAAATTGTACGTCTCCG-3'
Yptc4R	5'-AACCAATTAGTCACGTGCTGATATAAAA-3'
YptcP	5'Yakima Yellow -ATCATAGCCCTTCCCAGAAGCTGTCACA-BHQ1-3'

3.3 Miscela di reazione

Per la reazione di PCR viene impiegato il qPCR™ Core Kit (Eurogentec) come descritto in tabella 2; in alternativa può essere utilizzata la SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad) (tabella 3) che è stata testata nelle condizioni sotto descritte ed è risultata essere paragonabile all'Eurogentec.

La reazione di amplificazione può essere allestita a temperatura ambiente, dal momento che la DNA polimerasi utilizzata è un enzima hot-start.

Documento tecnico ufficiale n. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	Pag. 8 di 9

Tabella 2. Miscela di reazione per la Real time PCR con qPCR™ Core Kit, (Eurogentec)

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH ₂ O	9,1	-
10X Reaction buffer	1,5	1X
MgCl ₂)	1,5	5 mM
dNTPs	0,6	0,2 mM
Primer forward	0,5	0,33 µM
Primer reverse	0,5	0,33 µM
Sonda	0,2	0,13 µM
Hot Gold Start	0,1	0,03 U/µL
DNA	1,0	-
Totale	15,0	

Tabella 3. miscela di reazione per la Real time PCR con SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad)

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH ₂ O	5,3	-
2X Universal Probe Supermix	7,5	1X
Primer forward (10 mM)	0,5	0,33 µM
Primer reverse (10 mM)	0,5	0,33 µM
Sonda (10 mM)	0,2	0,13 µM
DNA	1,0	-
Totale	15,0	

- Preparare la miscela di reazione come sopra descritto, quindi dispensare 15 µL nei pozzetti di una piastra o in tubi per real time PCR.
- Aggiungere 1 µL di DNA di ciascun campione da analizzare e dei relativi controlli.
- Caricare la piastra o i tubi sul termociclatore ed avviare il ciclo di amplificazione dopo aver impostato il programma riportato di seguito (tabella 4).

Tabella 4. Ciclo termico per la Real time PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	95°C	10'	1
Amplificazione	95°C	20''	40
	62,5°C	20''	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 23	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Phytophthora ramorum</i> , <i>Phytophthora kernoviae</i>	Pag. 9 di 9

4. Valutazione dei risultati

Il campione sarà considerato positivo per la presenza di *P. ramorum* o *P. kernoviae* se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo, è rilevato in corrispondenza di un ciclo soglia (*Ct*) inferiore al *Ct* del controllo positivo di amplificazione (PAC). Viceversa, se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un *Ct* superiore a quello del controllo positivo di riferimento, il campione si considera negativo per la presenza di *P. ramorum* o *P. kernoviae*.

5. Dati di validazione del metodo diagnostico

Tutti i dati sono stati ottenuti mediante le procedure sperimentali descritte ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma. Gli esperimenti di validazione per la *P. ramorum* sono stati eseguiti su 3 campioni target e tre campioni non target mentre gli esperimenti di validazione per la *P. kernoviae* sono stati eseguiti su 2 campioni target e 3 campioni non target. I risultati sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5. Dati di validazione del metodo di prova

Parametri	Valori <i>P. ramorum</i>	Valori <i>P. kernoviae</i>
Sensibilità analitica	1 pg	1 pg
Specificità analitica (inclusività/esclusività)	98,4%	100%
Accuratezza	98,9%	97,6%
Ripetibilità	97,9%	95,5%
Riproducibilità	97,8%	95,3%