

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 25

Protocollo diagnostico per l'identificazione di tomato infectious chlorosis virus (TICV) e tomato chlorosis virus (ToCV) su 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. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 2 di 13

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 3 di 13

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. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 4 di 13

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. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 5 di 13

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. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 6 di 13

Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro

Classificazione dell'agente eziologico

Nome (acronimo)	Tomato infectious chlorosis virus (TICV) Tomato chlorosis virus (ToCV)
Tassonomia	Ordine: Martellivirales Famiglia: Closteroviridae Genere: <i>Crinivirus</i>
Avversità causata	Giallume internervale su pomodoro

1. Protocollo di diagnosi

La diagnosi dei due virus può essere effettuata mediante metodi molecolari basati su tecnica RT-PCR e Real time RT-PCR che rilevano l'acido nucleico virale, dopo opportuna estrazione dalla matrice vegetale, mediante l'uso di oligonucleotidi specifici per il riconoscimento di RNA virale.

Il protocollo diagnostico è stato validato per la matrice foglia di pomodoro. Buona regola è prelevare sempre foglie ben sviluppate mostranti i sintomi di clorosi o giallume internervale, non in fase di senescenza o affetta da altri stress biotici e abiotici.

L'applicazione delle tue metodiche è inserita all'interno di un processo diagnostico schematizzato in figura 1 in cui la Real time RT-PCR ha anche funzione di test di conferma in caso di risultato dubbio ottenuto con la RT-PCR convenzionale.

2. Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'acido nucleico utilizzare il kit commerciale RNeasy Plant mini kit (QIAGEN). È consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette.

Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido (previsto nelle istruzioni del kit commerciale) si può procedere come segue, utilizzando il tampone fosfato 0,1 M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0,5 g di tessuto vegetale e collocarli in una bustina per estrazione tipo 'Bioreba'

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 7 di 13

- Aggiungere 2,5 mL di tampone nella bustina.
- Macerare il campione.
- Trasferire 100 µL di omogenato in una provetta da 2 mL e proseguire seguendo il protocollo del kit.

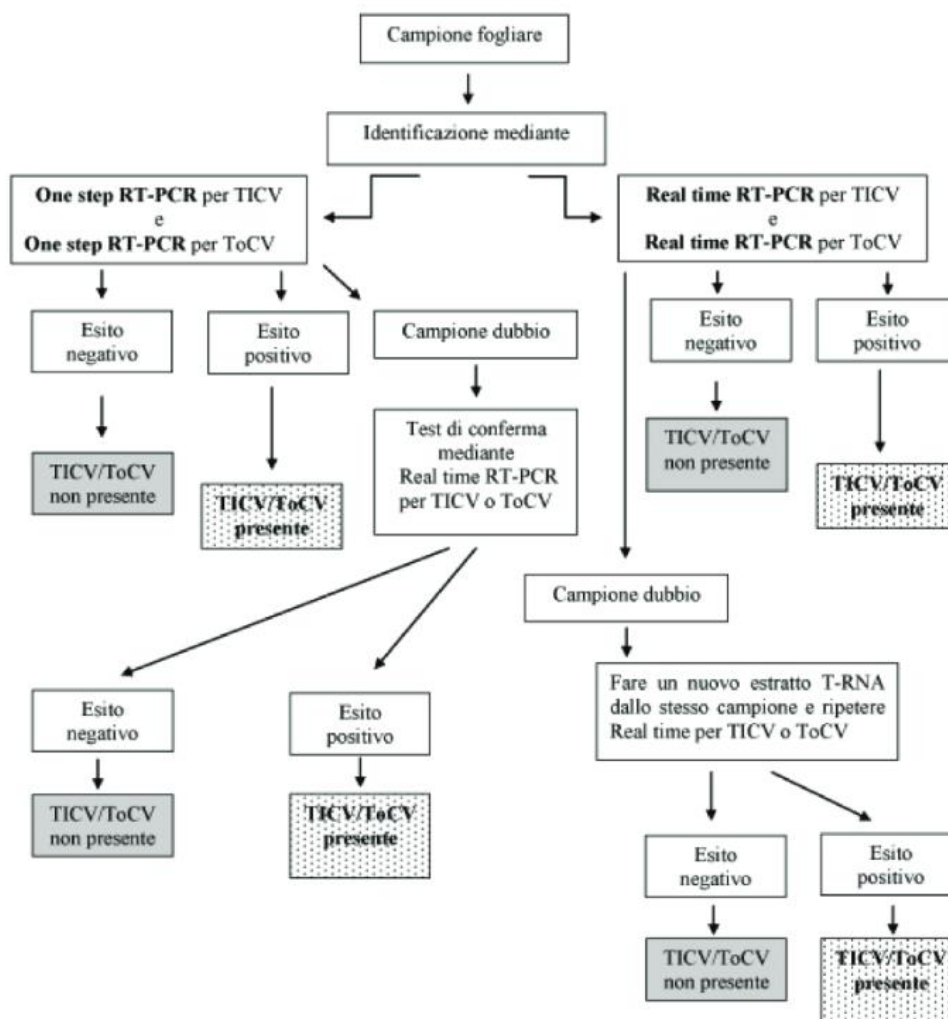


Figura 1 – Schema di flusso del processo per la diagnosi di ToCV e TICV

3. Metodo di prova one step RT-PCR

3.1 Primers

I primers utilizzati per la diagnosi di ToCV e TICV (Luoro *et al.* 2000; Vaira *et al.* 2002) riconoscono una porzione genomica nella regione codificante per la proteina HSP70. Le relative sequenze sono riportate nella seguente tabella 1:

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 8 di 13

Tabella 1. Primers utilizzati per la diagnosi di TICV e ToCV con la reazione one-step RT-PCR

ToCV-172 (forward) (*)	5' - GCTTCTGAAACTCCGTCTTG - 3'
ToCV-610 (reverse) (*)	5' - TGTCGAAAGTACCGCCACC - 3'
TICV-32 (forward) (**)	5' - TCAGTGCGTACGTTAATGGG - 3'
TICV-532 (reverse) (**)	5' - CACAGTATACAGCAGCGGCA - 3'

(*) Louro *et al.*,2000

(**) Vaira *et al.*,2002

3.2 Miscela di reazione

Preparare la miscela di reazione come specificato in tabella 2.

Tabella 2. Miscela di reazione per la one step RT-PCR

Componenti	Volume (μ L)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNasi free	9,50	-
2X Reaction mix (PCR buffer)	12,5	1X
Forward (10 μ M)	0,5	0,2 μ M
Reverse (10 μ M)	0,5	0,2 μ M
SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix (ThermoFisher)	1,0	-
RNA	1,0	-
Totale	25	

Una volta dispensata la mix ed aggiunto il campione in ciascuna provetta, avviare lo strumento seguendo il ciclo termico descritto in tabella 3.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 9 di 13

Tabella 3. Ciclo termico della one step RT-PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Trascrizione inversa	50 °C	30'	1
Denaturazione	94 °C	5'	1
Amplificazione	94 °C	30''	33
	57°C	30''	
	72 °C	60''	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Hold	4 °C	∞	1

3.3 Elettroforesi su gel di agarosio

Preparare il gel di agarosio 1,0 % in TBE 1X e caricare 10 µL del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 µL di loading buffer 10X. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

4. Valutazione dei risultati del metodo di prove one-step RT-PCR

L'esito del saggio si basa sull'espressione qualitativa che rileva l'assenza/presenza del patogeno target.

Se il saggio è positivo si osserverà una sola banda della seguente dimensione:

- 500 bp per TICV
- 439 bp per ToCV

che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo in corrispondenza della banda di riferimento del marker. La presenza di altre bande più deboli indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

Nessuna banda deve essere presente nel controllo negativo e nel controllo "bianco".

5. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova one step RT-PCR

I valori di validazione sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e sono riportati nella tabella 4.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 10 di 13

Tabella 4. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova one-step PCR

Parametri	Valori ToCV	Valori TICV
Sensibilità analitica	10^{-2}	10^{-5}
Specificità analitica (inclusività/esclusività)	100%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza	100%	100%
Riproducibilità	99%	99%

La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10^{-10} .

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per cinque volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di due estratti/virus.

6. Metodo di prova Real time RT-PCR (RT-qPCR)

Il presente metodo di prova prevede l'analisi del campione attraverso tre test indipendenti di RT-qPCR in singola reazione: uno per la ricerca di TICV, uno per la ricerca di ToCV ed uno per il gene endogeno COX (cytochrome oxidase), con funzione di controllo interno dell'estratto di RNA.

Le sequenze dei primers e delle sonde utilizzate per la diagnosi di TICV e ToCV e per il gene endogeno sono riportati nelle seguenti tabelle 5, 6 e 7. I primers e la sonda per la diagnosi di TICV (Tiberini et al., 2011) riconoscono una porzione genomica nella regione codificante per la proteina capsidica CP; i primers e la sonda per ToCV (Morris et al. 2006) riconoscono una porzione genomica nella regione codificante per la proteina HSP70.

Tabella 5. Primers e sonda utilizzati per la diagnosi di TICV con la reazione RT-qPCR

TICV- 463 for (*)	5' - GCGGGACATTTTTTATCATATGC - 3'
TICV- 577 rev (*)	5'- CAGCCCAACATCTTGTTAGTTGTT - 3'
TICV – 497 probe (*)	5'FAM - CGTCAGGTCACCCAAACGCTCTAAGG – MGB 3'

(*) Tiberini *et al.* 2011

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 11 di 13

Tabella 6. Primers e sonda utilizzati per la diagnosi di ToCV con la reazione RT-qPCR

ToCV- 258 for (*)	5' - GTCTGTTCCGGCTGATTACAAGT - 3'
ToCV- 331 rev (*)	5' - AATTGAAACCCAAAGAGGAACAAA - 3'
ToCV – P probe (*)	5'FAM - TGGGCAGAGACTTTTCATGCAGGCA – MGB 3'

(*) Morris *et al.* 2006

Tabella 7. Primers e sonda utilizzati per la diagnosi della cytochrome oxidase con la reazione Rt-qPCR

COX F	5' - CGTCGCATTCCAGATTATCCA- - 3'
COX R	5'- CAACTACGGATATATAAGRRCRRRAACTG - 3'
COX SOL 1511T probe	5' VIC-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA – MGB 3'

Miscela di reazione

Preparare la miscela di reazione come descritto nella tabella 8. Per ogni evento di amplificazione preparare tre distinte miscele di reazione: una, contenente primers e sonda per TICV una, primers e sonda per ToCV ed una, primers e sonda per il controllo endogeno COX.

Tabella 8. Miscela di reazione per la Real Time RT-PCR

Componenti	Volume (µL)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNasi free	8,875	-
Master Mix RNA to Ct (ThermoFisher)	12,5	1X
RT enzyme	0,625	1X
Forward	0,75	0,3 µM
Reverse	0,75	0,3 µM
TaqMan probe	0,5	0,1 µM
RNA	1	-
Totale	25	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 12 di 13

Una volta dispensate le miscele di reazione ed aggiunto il campione a ciascuna provetta, avviare lo strumento dopo aver impostato il ciclo termico indicato in tabella 9.

Tabella 9. ciclo termico della Real Time RT-PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Trascrizione inversa	48 °C	30'	1
Denaturazione	95 °C	10'	1
Amplificazione	95 °C	15''	40
	60°C	1'	

7. Valutazione dei risultati

Per stabilire se un campione è da considerare positivo occorre conoscere il valore del C_t soglia ('cut-off') al di sopra del quale i campioni devono essere considerati negativi. Poiché il 'cut-off' può variare da laboratorio a laboratorio in funzione di diversi fattori (tipo di termociclatore, software utilizzato, manualità dell'operatore, ecc.), è necessario che ciascun laboratorio che adotti un protocollo di real-time PCR con chimica TaqMan effettui delle analisi preliminari in modo da utilizzare analiticamente il sistema, definendo il proprio valore di C_t soglia. A tal fine, uno dei metodi suggeriti per definire il cut off è quello di seguito specificato:

- considerare positivi tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di $C_t < 38-40$ per il virus e per il rispettivo controllo interno (COX) tenendo conto del valore del C_t del controllo sano;
- considerare negativi i campioni con un valore di $C_t > 38-40$ per il virus tenendo conto del C_t del controllo positivo e con il rispettivo controllo interno (COX) a un valore di $C_t < 38-40$;
- i campioni con un valore di $C_t > 40$ devono essere analizzati di nuovo se il rispettivo controllo interno (COX) ha un analogo valore di $C_t > 40$.

8. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova Real Time RT-PCR

I valori di validazione sono stati ottenuti mediante il metodo di prova descritto ed eseguito presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma e sono riportati nella tabella 10.

Tabella 10. Valori di validazione ottenuti per il metodo di prova Real Time-PCR

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 25	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Tomato infectious chlorosis virus (TICV) e Tomato chlorosis virus (ToCV) su pomodoro	Pag. 13 di 13

Parametri	Valori ToCV	Valori TICV
Sensibilità analitica	10^{-4}	10^{-5}
Specificità analitica (inclusività/esclusività)	100%	100%
Ripetibilità	100%	100%
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza	100%	100%
Riproducibilità	100%	100%

La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10^{-10} .

La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di due estratti/virus nei test di RT-PCR.