

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 26

**Protocollo diagnostico per l'identificazione di potato spindle tuber
viroid**

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GdL Laboratori	CFN 28/06/2022	29/09/2022	

Sommario

PREMESSA.....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
Potato spindle tuber viroid	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 3 di 10

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. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 4 di 10

- 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. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 5 di 10

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. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 6 di 10

Potato spindle tuber viroid

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome (acronimo)	Potato spindle tuber viroid (PSTVd)
Tassonomia	Famiglia: Pospiviroidae Genere: <i>Pospiviroid</i>
Avversità causata	Affusolamento dei tuberi di patata

1. Protocollo di diagnosi di potato spindle tuber viroid

Il presente protocollo diagnostico prevede la combinazione di due tecniche molecolari, ovvero la One-step RT-PCR seguita da analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dei prodotti di amplificazione.

La one-step RT-PCR viene eseguita secondo il protocollo messo a punto da Faggioli et al. (2005), con l'impiego di primers descritti in Di Serio (2007) in grado di amplificare, tra le dieci specie di Pospiviroidi, solamente PSTVd e tomato apical stunt viroid (TASVd, Pospiviroid, Pospiviroidae). Con una successiva analisi RFLP, utilizzando l'enzima di restrizione *Alu I* è possibile distinguere, in caso di risultato positivo dell'amplificazione, PSTVd da TASVd.

Il presente metodo di prova è stato validato da matrice costituita da foglie di pomodoro e di solanacee ornamentali.

2. Estrazione dell'RNA

Il metodo di estrazione previsto nel presente protocollo diagnostico si basa sull'impiego di kit commerciali, da utilizzare seguendo scrupolosamente le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. La maggior parte dei kit in commercio prevedono la polverizzazione del campione vegetale in azoto liquido. In tal caso, polverizzare accuratamente il tessuto fogliare quindi, prelevare la quantità richiesta dal kit e procedere secondo le istruzioni.

Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido procedere come segue:

- prelevare un piccolo pezzettino da ogni foglia di cui è composto il campione e collocare il tutto per un massimo di 0,1-0,2 g nella bustina tipo 'Bioreba';

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 7 di 10

- aggiungere 1 mL del primo tampone di estrazione del kit nella bustina;
- macerare il campione fino all'ottenimento di una poltiglia semi-liquida; mantenere in ghiaccio i campioni omogenati;
- trasferire sotto cappa fino a 500 µL di omogenato in una provetta da 2,0 mL facendo attenzione di prelevare dalla bustina nella parte opposta a quella dove è stato inserito il campione, quindi aggiungere 2-mercaptoetanolio, secondo le istruzioni del kit di estrazione;
- proseguire seguendo il protocollo del kit.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal viroide e un controllo sicuramente esente dall'infezione viroidale, appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

3. Metodo di prova one-step RT-PCR + RFLP

3.1 Primers

Le sequenze dei primers utilizzati per la diagnosi del PSTVd/TASVd (Di Serio *et al.* 2007) sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 1. Primers utilizzati in one-step RT-PCR per l'individuazione di PSTVd/TASVd

PSTVd 33H (forward)	5'- TCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTC - 3'
PSTVd 32C (reverse)	5'- AAACCCTGTTTCGGCGGGAATTAC - 3'

3.2 Miscela di reazione

Preparare la miscela di reazione come descritto nella tabella 2. Per ogni reazione di amplificazione prevedere un controllo positivo (campione sicuramente infetto dal viroide) e un controllo negativo (campione sicuramente esente dall'infezione viroidale), appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

Tabella 2. Miscela di reazione per l'amplificazione in one-step RT-PCR

Miscela di reazione	Volume (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O RNasi-free	15,2	-
5X GoTaq DNA polimerasi buffer (include 15mM MgCl ₂)	5	1X
dNTPs (totale)	1	0,4mM
PSTVd 33H	0,4	0,16 µM
PSTVd 32C	0,4	0,16 µM
enzima AMV-RT	0,25	25U
enzima Taq DNA polimerasi	0,25	1,25 U
enzima inibitore delle Rnasi	0,5	20 U
RNA totale estratto (TRNA)	2	
Totale	25	

3.3 Ciclo termico amplificazione

Il ciclo di termico per la reazione in one-step RT-PCR è riportato nella tabella 3.

Tabella 3. Ciclo termico per l'amplificazione in one step RT-PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Retrotrascrizione	46°C	30'	1
Denaturazione	94°C	3'	1
Amplificazione	94°C	30''	} 35
	62°C	30''	
	72°C	60''	
Estensione finale	72°C	7'	1
Hold	4°C	10'	1

3.4 Elettroforesi su gel di agarosio

Preparare un gel di agarosio all' 1,2% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 10 µL di ciascun prodotto della PCR dopo aver aggiunto 2 µL di loading buffer. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 9 di 10

3.5 Valutazione dei risultati (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 per PSTVd/TASVd si osserverà una banda della dimensione di 360 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo ed in corrispondenza della banda o tra le bande a lunghezza nota del marker.

3.6 Analisi RFLP

I campioni risultati positivi al saggio one-step RT-PCR, ovvero che presentano una banda all'altezza di 360 bp corrispondente al controllo positivo, devono essere sottoposti all'analisi della lunghezza dei frammenti ottenuti dopo digestione del prodotto di amplificazione con l'enzima di restrizione *AluI*, per discriminare tra i due viroidi (PSTVd o TASVd).

Pr procedere all'analisi RFLP preparare la miscela di reazione secondo le indicazioni riportate nella tabella 4 quindi, incubare i campioni a 37°C per 45 minuti.

Tabella 4. Miscela di reazione per l'analisi RFLP dei campioni risultati positivi in one-step RT-PCR

Miscela di reazione	Volume (μL)	Concentrazione finale
H ₂ O RNasi free	16	-
3 μL 10X Fast Digest Green Buffer (Promega)	3	1X
1 μL enzima restrizione <i>AluI</i> (1U/μL) (Promega)	1	1U/μL
amplificato (dsDNA)	10	
Totale	30	

Elettroforesi su gel di agarosio (RFLP)

Preparare un gel di agarosio al 2,4% in TBE 1X; caricare nei pozzetti 15 μL di ciascun prodotto della reazione RFLP, non è necessario aggiungere loading buffer perché già presente nel tampone di reazione. Applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 26	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di Potato spindle tuber viroid	Pag. 10 di 10

3.8 Valutazione dei risultati (RFLP)

Si considerano infetti da PSTVd i campioni che mostrano sul gel 2 bande di dimensione, rispettivamente, di 258 bp e 101 bp. I campioni che mostrano 3 bande di dimensione, rispettivamente, di 247, 61 e 37 bp si considerano, invece, infetti da TASVd (figura 1).

Poiché la risoluzione di un gel di agarosio al 2,4 % non consente di discriminare fra loro le bande di 258 bp (PSTVd) e 247 bp (TASVd) queste appariranno sul gel alla stessa altezza. Tuttavia, la differenza nel numero complessivo di bande visibili consente una facile discriminazione fra i due viroidi.

Figura 1. Gel elettroforetico dei frammenti di restrizione generati dopo digestione enzimatica con *AluI* dei prodotti di amplificazione ottenuti in one-step RT-PCR da campioni infetti da TASVd (linee 3, 4, 5, 6 e 13) e PSTVd (linee 7, 8 e 12).

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

I valori di validazione ottenuti con il metodo di prova descritto, eseguito presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Roma, sono riportati nella tabella 5.

Tabella 5. Valori di validazione ottenuti per la procedura di prova one-step RT-PCR

Parametri	Valori
Sensibilità analitica	10^{-7}
Specificità analitica (inclusività/esclusività)*	100%
Ripetibilità	100%
Sensibilità diagnostica	100%
Accuratezza	100%
Riproducibilità	92%

* La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10^{-12} .