

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 27

Protocollo diagnostico per l'identificazione di

Pantoea stewartii subsp. *stewartii*

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0		CFN 13/12/2022	23/12/2022	

Sommario

PREMESSA.....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Pag. 4 di 10

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Pag. 5 di 10

laboratori nazionali di riferimento per ogni laboratorio di riferimento dell'Unione europea designato a norma dell'articolo 93, paragrafo 1.

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.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Pag. 6 di 10

Pantoea stewartii* subsp. *stewartii

Classificazione dell'agente eziologico

Nome	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> .
Tassonomia	Phylum: Proteobacteria Classe: Gammaproteobacteria Ordine: Enterobacteriales Famiglia: Enterobacteriaceae Genere: <i>Pantoea</i> Specie: <i>stewartii</i>
Avversità causata	Avvizzimento batterico del mais

1. Protocollo di diagnosi

Pantoea stewartii subsp. *stewartii*, agente causale dell'avvizzimento batterico del mais, è un batterio gram-negativo che si diffonde sistemicamente nella pianta attraverso il sistema vascolare. Si può trovare nei semi di mais che tuttavia non presentano sintomi caratteristici. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* causa gravi avvizzimenti delle giovani piante, striature delle foglie longitudinali e parallele ai fasci vascolari, imbrunimento dei fasci vascolari della spiga, avvizzimento e annerimento delle cariossidi. Nel fusto si osservano cavità midollari a volte associate a marciumi in prossimità del colletto. I batteri si possono diffondere attraverso i vasi e raggiungere anche le cariossidi. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* è stata segnalata in Italia a partire dal 2015 e negli anni successivi, nelle regioni Emilia-Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia.

Questo protocollo diagnostico consente di rilevare la presenza di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (*Pss*) da seme di mais, mediante la tecnica molecolare di amplificazione real time PCR.

I metodi molecolari riportati nello Standard EPPO PM 7/60 (2) (EPPO, 2016) per lo screening di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, sono:

- la real-time PCR di Tambong *et al.*, 2008: i criteri di performance sui semi sono stati valutati nel Test performance study (TPS) effettuato con 5 laboratori partecipanti al Euphresco project EUPH05 *P. stewartii* subsp. *stewartii* (Euphresco, 2010 unpublished)
- la PCR convenzionale (PCR A con primers AGES): utilizzata da un solo laboratorio nell'ambito del progetto Euphresco, 2010, non è stata validata e pertanto non è raccomandata come test di screening su seme.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Pag. 7 di 10

Nel caso in cui il test di screening fornisca esito positivo è prevista la conferma di tale risultato e l'identificazione di *P. stewartii* subsp. *stewartii* con uno dei metodi riportati nello stesso Standard. Tali metodi, tuttavia, determinano l'insorgenza di risultati falsi positivi. Al fine di oltrepassare tale problematica è stato, quindi, sviluppato il saggio riportato nel presente protocollo che consente l'identificazione specifica di *P. stewartii* subsp. *stewartii*.

Il metodo di prova di seguito descritto è quello pubblicato da Pal et al (2019) e validato nell'ambito del progetto europeo Valitest (H2020-SFS-2016-2017, grant agreement n° 773139) per lo screening di *P. stewartii* subsp. *stewartii* su semi di mais.

2. Metodo di prova real time PCR

2.1 Materiale vegetale

Il presente metodo di prova è stato validato su campioni vegetali asintomatici costituiti da semi di mais.

Il metodo di prova si applica a campioni conservati in condizioni idonee, che vengono prelevati in base alla dimensione del lotto di appartenenza. In particolare, si raccomanda una dimensione massima del campione pari a 400 semi per lotto, corrispondente alla probabilità di rilevare una infezione pari al 1%. Il campione di 400 semi è diviso in sub-campioni di 100 semi al massimo sui quali si procede all'estrazione del batterio secondo le linee guida riportate nel PM7/60(2)

2.2 Preparazione dei campioni ed estrazione del DNA

Relativamente all'estrazione del DNA dal campione vegetale, nel Report del TPS sui metodi molecolari per la diagnosi di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (TPS code: Pstew-1), sono riportati diversi protocolli che sono stati utilizzati per validare il metodo Pal *et al* 2019. I metodi di estrazione di DNA utilizzati dai partecipanti sono di seguito specificati:

- QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile)
- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen),
- DNeasy mericon Food Kit (Qiagen),
- PREP-GS kit (AgroDiagnostica)
- QIAasympyony mericon Bacteria Kit (Qiagen).

2.3 Esecuzione real time PCR (Pal *et al.* 2019)

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti i seguenti controlli:

- controllo positivo di amplificazione (PAC - Positive Amplification Control): DNA di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* che è garante dell'esito del test manifestando la reazione di amplificazione

- controllo positivo di estrazione (PIC - Positive Isolation Control): campione vegetale artificialmente infetto da *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* che è garante dell'esito della fase di estrazione e del test, dovendo manifestare la reazione di amplificazione;
- controllo negativo di estrazione (NIC - Negative Isolation Control): campione vegetale sicuramente esente da *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* che è garante dell'esito della fase di estrazione e del test, non dovendo manifestare la reazione di amplificazione;
- controllo negativo di amplificazione (NAC - Negative Amplification Control): costituito dalla miscela di amplificazione in cui non viene aggiunto il DNA target ma il controllo acqua ed è garante dell'esito del test non dovendo manifestare la reazione di amplificazione (fornisce indicazioni sulla qualità del test evidenziando eventuali contaminazioni)

2.3.1 Preparazione della reazione

Le sequenze dei primers utilizzati e la composizione della miscela di reazione sono riportati nelle seguenti tabelle.

Tabella 1. Primers per l'amplificazione di *Pss* (Pal et al 2019)

	Dimensione (nucleotidi)	Sequenza (5'-3') per singolo campione
Pal_Fw	20	AGAAAACGCTGATGCCAGAC
Pal_Rev	20	ACTATCCTGACTCAGGCACT

Tabella 2. Miscela di primers e reagenti utilizzati per l'amplificazione di *Pss* (Pal et al 2019)

	Concentrazione finale (nmol)/volume per reazione (μl)
Acqua bidistillata- sterile	-
SybrGreen PCR MasterMix	1x
Pal_Fw	400 nmol
Pal_Rev	400 nmol
DNA	4 μ L
Totale	20 μ L

2.3.2 Procedimento

- Miscelare bene le soluzioni.
- Distribuire 16 μ L di miscela di reazione in ciascun pozzetto della piastra.
- Aggiungere 4 μ L di estratto di DNA in ciascun pozzetto, cambiando puntale ad ogni campione.

Nota: ciascun campione e i controlli devono essere analizzati in due replicati.

- Chiudere la piastra con la pellicola e inserirla nel termociclatore.

- Impostare lo schema della piastra e la sequenza termica per l'amplificazione quindi, avviare la corsa.

Il ciclo di termico per la reazione di real time PCR è riportato nella tabella 3.

Tabella 3. *Ciclo termico per l'amplificazione real time PCR*

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale *	95 °C	10'	1
Denaturazione	95 °C	15''	40
Amplificazione	65 °C	1	
Temperatura ramping		1.6 °C/s	
Melting curve		65-95 °C, 0.05 °C/s	

*Questa fase del ciclo di amplificazione deve essere adattata in funzione del tipo Master mix utilizzata per effettuare l'amplificazione

3. Interpretazione dei risultati

Un saggio si considera attendibile quando, per ogni reazione si ottiene:

- sui controlli positivi (PAC e PIC) una curva esponenziale di amplificazione
- sui controlli negativi (NAC e NIC) nessuna amplificazione o curve non esponenziali.

Quando queste condizioni sono verificate, il campione si considera:

- positivo, se genera curve esponenziali di amplificazione;
- negativo, se non genera curve di amplificazione;
- indeterminato, se si ottengono risultati contraddittori (es., risultati delle repliche non coincidenti) o dubbi.

4. Validazione del metodo di prova real time PCR (Pal et al. 2019)

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.27	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Pag. 10 di 10

Tabella 4. Valori di validazione ottenuti per la real time PCR Pal et al. 2019 nell'ambito del progetto Valitest (H2020-SFS-2016-2017, grant agreement n° 773139). Pubblicati nel Test Performance Study – Report v 1.0, Pstew-1 2019.

Parametri	Valori ottenuti su semi di mais
Sensibilità analitica	10 ⁵
Specificità analitica	89 %
Riproducibilità	56 %