

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS subsp
MICHIGANENSIS
DA SEME**

**¹N. Pucci, ²V. Catara, ³M. Scortichini, ⁴E. Stefani, ¹G. Perez,
¹S. Loreti.**

¹Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)

² Dipartimento di Scienze delle produzioni Agrarie e Alimentari-Università
degli Studi di Catania, Catania

³ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-
Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura
(CREA-OFA)

⁴ Dipartimento di Scienze della Vita-Università di Modena e Reggio Emilia,
Modena

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Ospite
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Descrizione del patogeno
- 1.4 Epidemiologia e trasmissione
- 1.5 Normativa

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Prove valutative gruppo di lavoro
 - 2.2.1 Preparazione estratto semi
 - 2.2.2 Estrazione DNA
 - 2.2.3 PCR specifiche
 - 2.2.4 Immunofluorescenza
- 2.3 Prove valutative Inter-Laboratorio
 - 2.3.1 Procedura A
 - 2.3.1.1 Preparazione estratto semi (CF-A)
 - 2.3.1.2 Estrazione DNA
 - 2.3.1.3 PCR specifiche
 - 2.3.2 Procedura B
 - 2.3.2.1 Preparazione estratto semi (ES)
 - 2.3.2.2 Immunofluorescenza
 - 2.3.2.3 Estrazione DNA
 - 2.3.2.4 PCR specifiche

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Valori di validazione
- 3.2 Prove valutative gruppo di lavoro
 - 3.2.1 Sensibilità analitica
 - 3.2.2 Specificità analitica
- 3.3 Prove valutative inter-laboratorio (inclusività ed esclusività)
 - 3.3.1 Campioni utilizzati per la validazione
 - 3.3.2 Metodi molecolari
 - 3.3.3 IF
- 3.4 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I -Strumenti, reagenti, materiali

Allegato II- Tamponi e terreni di crescita

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis et al.
Tassonomia	PHYLUM : Actinobacteria. Classe: <i>Actinobacteria</i> Ordine: Actinomycetales Famiglia: Microbacteriaceae
Avversità	Cancro batterico del pomodoro
Sinonimi e acronimi	<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> (Smith) Dye & Kemp <i>Corynebacterium michiganense</i> (Smith) Jensen (Cmm)
Note	Patogeno incluso nella lista A2 dell'EPPO (OEPP 2013).

1.1 Ospite

La pianta ospite di maggiore importanza economica è il pomodoro, tuttavia il patogeno è stato segnalato su alcune solanacee spontanee quali *Solanum douglasii*, *S. nigrum* e *S. triflorum*.

1.2 Sintomatologia

Le foglie delle piante infette avvizziscono e si ripiegano a doccia verso l'alto per poi ingiallire e seccare.

Sul fusto compaiono striature longitudinali di colore giallo-brunastro in corrispondenza delle quali si ha la comparsa di fenditure o cancri approfonditisi anche fino al midollo. Praticando una sezione trasversale degli organi infetti si osserva una colorazione brunastra del tessuto vascolare ed un aspetto cavernoso del midollo.

Sezionando il fusto sia trasversalmente sia a livello dell'inserzione sul fusto dei piccioli fogliari sono osservabili imbrunimenti che per la loro forma prendono il nome di "traccia a ferro di cavallo".

Sui frutti colpiti per via vascolare la polpa appare disgregata ed ingiallita con la presenza talvolta di cavità scure al centro.

Le infezioni non sistemiche, generalmente secondarie e tardive, danno origine a pustole biancastre su fusti e piccioli e a piccole lesioni cancerose bruno-nerastre circondate da un alone biancastro ("maculature ad occhio di uccello") sui frutti.

1.3 Descrizione del patogeno

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* è un batterio aerobio, Gram positivo, non sporigeno. Condizioni ottimali per il suo sviluppo sono temperature sui 26-28 °C concomitanti ad alti tenori di umidità.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

Benchè il batterio possa sopravvivere vitale nel terreno e nei residui della vegetazione o su piante spontanee dei generi *Solanum* e *Nicotiana*, è attraverso il seme che si attuano sia la sopravvivenza che la disseminazione a breve e grande distanza. Il patogeno può localizzarsi nel seme internamente e/o esternamente e da queste sedi invadere poi l'ospite diffondendosi lungo il sistema vascolare. In caso di infezione locale la penetrazione avviene invece attraverso microlesioni e/o lacerazioni causate principalmente da insetti o dall'uomo.

1.5 Normativa

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Categoria fitosanitaria: incluso nella lista A2, EPPO A2 list n° 50, EU Annex designation II/A2

2. PROTOCOLLI DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Esso fornisce i risultati di validazione di alcuni metodi per la diagnosi del batterio fitopatogeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* da seme di pomodoro. L'uso di protocolli diagnostici validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse condizioni operative. I metodi sono stati validati secondo le disposizioni ISO 16140:2003, ISO 17025 ed EPPO Diagnostic PM7/98 (EPPO 2010). Per la definizione di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato. Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati negli Allegati 1 e 2. La scelta delle metodologie diagnostiche da validare è derivata dall'attività congiunta di un Gruppo di lavoro di esperti che hanno valutato la sensibilità e specificità analitica dei metodi, costituito da:

- Dott.ssa Stefania Loreti, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (ex-CREA-PAV, gruppo Coordinatore)

- Dott. Marco Scortichini, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (ex-CRA-FRU)
- Prof.ssa Vittoria Catara -Università di Catania (UNICT)
- Prof. Emilio Stefani -Università di Modena e Reggio Emilia (UNIMORE).

Successivamente sono stati definiti i parametri di sensibilità e specificità diagnostiche, l'accuratezza relativa, l'accordanza e la concordanza attraverso l'effettuazione di un ring test nazionale (inter-laboratorio), al quale hanno partecipato i seguenti laboratori:

- Servizio Fitosanitario Regionale (SFR) Emilia-Romagna Referente A. Calzolari
- SFR Friuli-Venezia Giulia Referente G. Bianchi
- SFR Piemonte Referenti G. Mason C Morone
- SFR Sardegna Referente M. Nannini
- SFR Lombardia Referente F. Gaffuri
- SFR Campania Referente D. Benchi
- CAV-Centro Attività Vivaistiche (Tebano) Referenti M. Cardoni, M. Vibio
- CREA- SCS Referente O. Sigillo
- CREA-PAV Referente S. Loreti

La stesura del protocollo per l'esecuzione del ring test è stata effettuata presso il CREA-DC (ex CREA-PAV) con l'obiettivo di confrontare i due protocolli (di seguito riportati come A e B) seguendo le indicazioni descritte nell'EPPO standard PM7/42(2) Cmm (EPPO, 2013) integrandoli con due saggi molecolari utilizzati come screening preliminare.

2.2 Prove valutative gruppo di lavoro

2.2.1 Preparazione estratto semi

Il calcolo della sensibilità analitica è stato effettuato dai partecipanti al gruppo di lavoro a partire da un estratto di semi di pomodoro contaminato con concentrazioni calibrate del patogeno a partire da 10^7 ufc/ml fino a 10^0 ufc/ml in tre ripetizioni e dall'estratto ottenuto da campioni di 2000 semi contaminati rispettivamente con 1, 3, 5, 10 semi infetti da Cmm e trattati secondo il seguente protocollo:

1. Mantenere i semi in frigorifero (4 °C) per una notte ad imbibire in presenza di 20 ml di tampone PBS contenente Tween 0.1%
2. Frantumare i semi inserendoli in una busta Bioreba con filtro e schiacciando con martello di gomma.

3. concentrare l'estratto di semi per centrifugazione (6000g per 10 min)
4. risospendere il pellet in 2.5 ml di tampone PBS
5. metà di questo volume viene conservato glicerolo* 20-30% a -80 ° C
6. la parte restante viene utilizzata per i successivi metodi di isolamento su mezzi generici e semi-selettivi, molecolari (estrazione DNA, PCR specifiche) ed IF realizzati secondo le procedure di seguito illustrate.

**Rimozione del glicerolo*

Il glicerolo può essere rimosso (secondo la Direttiva 2006/56/CE e il D.M. 28-1-2008 per *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) dal campione mediante aggiunta di un ugual volume di tampone per sedimento, centrifugazione per 15 minuti a 7000 g e risospensione del pellet in un volume di tampone per sedimento pari al volume di partenza del campione stesso.

L'isolamento è realizzato sui mezzi semi-selettivi Dhavanthari e mSCM e sul mezzo generico YPGA. Aliquote di 50 µl di ciascun campione e le sue diluizioni decimali (10^{-1} a 10^{-6}) vengono piastrate sui due terreni ed incubate a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ per 14 giorni.

I ceppi di riferimento Cmm NCPPB 2979 e PVCT 156.1.1 vengono utilizzati per "guidare" la selezione di colonie Cmm-like. Le colonie sospette e i ceppi di riferimento vengono piastrati su terreno generico YPGA ed incubati a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ per 48-72 ore per l'identificazione. Tali colonie saranno identificate mediante saggi specifici. In particolare per ciascun campione sono selezionate 3 colonie Cmm-like. Eventuali colonie Cmm-like selezionate vanno conservate a +4°C in terreno colturale o a -80 °C in sospensione batterica con glicerolo al 20-30%, per essere utilizzate nel caso di esito negativo delle colonie Cmm-like saggate.

2.2.2 Estrazione del DNA

Si utilizza il kit QIAGEN DNeasy® Blood e Tissue Kit su 500 µl di estratto risospeso in PBS. Esso viene centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm per l'ottenimento di un pellet. Viene di seguito indicata la procedura del produttore, con alcune modifiche.

- Risospendere il pellet in 180 µl del buffer + lisozima (N.B. aggiungere al buffer enzymatic lysis fornito il lisozima immediatamente prima dell'uso e vortexare)
- Incubare a 37 °C per 30 minuti.
- Aggiungere 25 ul di proteasi K e 200 µl del buffer AL; quindi agitare con vortex.
- Incubare a 56 °C per 30 minuti.
- Aggiungere 200 µl di etanolo (100%) e agitare con vortex.
- Trasferire la soluzione (SA) nella colonnina inserita in un tubo (forniti) e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.
- Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo (fornito).
- Aggiungere 500 µl del Buffer AW1 e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

- ●●Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo (fornito).
- Aggiungere 500 µl del buffer AW2 e centrifugare a 14000 rpm per 1 minuto per asciugare la membrana.
- Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo.
- Aggiungere 200 µl buffer AE direttamente nella membrana della colonnina, attendere 10 minuti.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto per l'ottenimento di un eluito finale.

2.2.3 PCR specifiche

Il DNA estratto dai campioni mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR. I controlli, qualora si parta dalla colonia pura, devono essere trattati con la procedura di denaturazione termica.

Denaturazione termica

1. prelevare un'ansata di coltura (o una piccola colonia batterica) di 24 – 48 ore
2. sospenderla in 100 µl di acqua distillata sterile
3. mescolare ripetutamente per inversione.
4. incubare a 95 -100°C per 15 min, poi trasferire subito in ghiaccio.
5. quando le sospensioni denaturate si sono raffreddate, centrifugare a 6000 g per 1 minuto.
6. utilizzare 5 µl di surnatante, contenente il DNA, nella reazione di amplificazione.

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

La Taq DNA polimerasi è la GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega.

I primer suggeriti sono i seguenti (secondo Dreier *et al.*, 1995):

CMM 5 5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA A -3'
 CMM 6 5- CGT CAG GAG GTC GCT AAT A -3'

La dimensione attesa dell'amplicone è di 614 bp.

Aliquotare 45 µl della Master mix preparata secondo lo schema:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		25,6µl	
PCR buffer	5x	10 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	3µl	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1µl	0,2 mM
primer CMM5	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
primer CMM6	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimerasi	5 U/µl	0,4 µl	0,04 U/µl= 2 U

Aggiungere a ciascuna aliquota 5 µl di templat.

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale: 96°C / 2 min
 30 cicli: 96°C / 60 sec
 55°C / 90 sec
 72°C / 60 sec
 estensione finale: 72°C / 10 min, poi mantenere a 4°C.

Elettroforesi:

Preparare un gel di agarosio 1,5% in TAE 1X; caricare nei pozzetti 12-20 µl di ciascun prodotto della PCR; applicare una tensione elettrica intorno ai 100 V per circa 45 minuti.

Interpretazione del risultato della prova PCR

- i) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e se nei controlli positivi si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm (614 bp).
- ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.
- iii) Se non si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm, il campione è negativo.

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (*dati non pubblicati*)

Questo metodo è stato saggiato con due enzimi:

- 1) Taq DNA polimerasi GoTaq® Flexi DNA Polymerase, (Promega).
- 2) Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase™ (Bioline).

I primer indicati sono i seguenti:

PSA-8 5'- TTG GTC AAT TCT GTC TCC CTT C -3'
 PSA-R 5'- TAC TGA GAT GTT GTT TCA CTT CCC C -3'

La dimensione attesa dell'amplicone 268 bp.

Aliquotare 22,5 della Master mix preparata secondo lo schema:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		12,8 µl	
PCR buffer	5 x	5 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	1,5µl	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1 µl	0,4 mM
PSA-8	5µM	1 µl	0, 2 µM
PSA-R	5µM	1µl	0, 2 µM
Taq DNA Polimerasi	5 U/µl	0,2 µl	0,04 U/µl = 3 U

Aggiungere a ciascuna aliquota 2,5 µl di templat.

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale: 95°C / 5 min
 95°C / 15 sec
 35 cicli: 63°C / 15 sec
 72°C / 45 sec
 estensione finale: 72°C / 5 min, poi mantenere a 4°C.

Nel caso dell'utilizzo della Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase™ (Bioline) la fase iniziale di denaturazione viene allungata a 10 min anziché 5.

Elettroforesi:

Preparare un gel di agarosio 2% in TAE 1X; caricare nei pozzetti 12-20 ml di ciascun prodotto della PCR; applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

Interpretazione del risultato della prova PCR

- i) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e se nei controlli positivi si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm (268 bp).
- ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.
- iii) Se non si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm, il campione è negativo.

2.2.4 Immunofluorescenza (IF) (EPPO standard PM7 / 42 (1), 2004)

La procedura di seguito proposta è adatta per il kit di Adgen test fluoriscan IF Kit (1113-8) (Adgen Phytodiagnosics); si raccomanda di preparare i vetrini in doppio e conservarne una serie per un eventuale secondo uso.

Nota: Misurare con lo spettrofotometro l'assorbanza di una sospensione di *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cresciuto 48 ore su NA e preparata in tampone fosfato PB (paragrafo A.1): $A_{600} = 0,2$ OD corrisponde a $1-2 \times 10^8$ cfu/ml.

1. Preparare vetrini separati del controllo positivo con una sospensione di 10^6-10^5 cellule/ml del ceppo di riferimento. Usare un vetrino in ciascuna serie di prove.
2. Preparare una diluizione decimale (1:10) del campione, risospeso nel tampone per sedimentazione.
3. Trasferire su ciascuna fila di pozzetti del vetrino un volume standard di ES-tal quale e della diluizione decimale (per es. 20 µl è adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro). Aliquotare la sospensione controllo in un vetrino separato.
4. Far evaporare completamente le goccioline a temperatura ambiente overnight o mediante riscaldamento alla temperatura di 37°C per due ore.
5. Fissare le cellule batteriche al vetrino passandolo sulla fiamma.
6. I vetrini pronti possono essere conservati a 4°C fino al momento dell'utilizzo, entro qualche giorno.
7. Preparare il tampone IF in quantità sufficiente per i lavaggi.

8. Preparare la diluizioni dell'anticorpo primario come indicato dal produttore in tampone IF. vedi fig. pag. 229
9. Coprire completamente ciascun pozzetto di saggio con l'appropriata diluizione dell'anticorpo (come indicato in figura). Il volume di anticorpo messo su ciascun pozzetto deve essere almeno equivalente al volume di estratto (cioè per es. 20 µl).
10. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C.
11. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
12. Lavare immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con una leggera agitazione.
13. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.
14. Preparare la diluizione 1:160 dell'anticorpo secondario coniugato di FITC, che andrà distribuita su tutti i pozzetti di tutti i vetrini.
15. Coprire i pozzetti di saggio con la diluizione di anticorpo secondario coniugato di FITC. Il volume di coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'anticorpo primario (cioè per es. 20 µl).
16. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C, al riparo dalla luce.
17. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
18. Lavare (al riparo dalla luce) immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con leggera agitazione.
19. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.
20. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di un liquido di montaggio, ad esempio glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato*, su ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.
21. Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro.

* In alternativa può essere utilizzato il mezzo di montaggio abitualmente in uso presso il laboratorio.

liquido di montaggio glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato*:

Questo liquido si prepara con glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato formato della rimozione del glicerolo a pH 9, nelle proporzioni 9:1. La soluzione finale così ottenuta va conservata a 4 °C, con l'accortezza di rinnovarla ogni 6-8 mesi.

Interpretazione del risultato della colorazione IF

1. Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza verde brillante.

Nota: Il saggio IF deve essere ripetuto se la colorazione è anomala o se il vetrino di controllo non risulta colorato.

2. Passare ora ad osservare i vetrini di saggio. Verificare prima l'assenza di cellule fluorescenti nei pozzetti di controllo PBS. Cellule fluorescenti nel controllo PBS indicano un legame non specifico del coniugato o contaminazione.
Nota: in questo caso ripetere il saggio.
3. Facendo riferimento ai vetrini di controllo, verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di Cmm nei pozzetti di saggio dei vetrini. L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpo.
 - > Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è negativo.
 - > Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è positivo.
 - > Le cellule che presentano una colorazione incompleta o aberrante o una debole fluorescenza devono essere ignorate, a meno che non siano numerose. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio.

2.3 Prove valutative inter-laboratorio

2.3.1 Procedura A

2.3.1.1 Preparazione estratto semi (concentrato finale CF-A)

Aggiungere ad ogni campione di semi 4 ml tampone fosfato sterile 50 mM (PB) per g di seme lasciando imbibire a 2-6°C per 16-24 h; trasferire i campioni in buste Bioreba e rompere con cautela i semi con martello di gomma fino a quando il tampone di estrazione non diviene lattiginoso (3-4 min) (la garza di nylon presente all'interno del sacchettino Bioreba impedirà la fuoriuscita di detriti vegetali). Lasciar riposare il materiale per 5 min a T ambiente, trasferire 10 ml dell'estratto da seme e qualora risultassero presenti detriti o impurità, centrifugare a bassa velocità (180 g per 5 min) e prelevare il surnatante. Lasciar decantare il surnatante e centrifugarlo a 9000 g per 20 min a 4°C. Risospendere il pellet con 1 ml di 50 mM tampone fosfato (PB) per ottenere un concentrato finale (CF-A) da suddividere in 2 eppendorf da utilizzare nei successivi step.

Le due aliquote vanno addizionate del 30% di glicerolo qualora debbano essere mantenute a -20°C a medio-lungo termine per ulteriori accertamenti.

Per identificare possibili inibitori della reazione di amplificazione presenti nella matrice vegetale viene preparato un campione di controllo (ottenuto contaminando l'estratto dei semi con l'aggiunta di cellule del ceppo Cmm di riferimento NCPPB 2979^T con una concentrazione finale di 1000-5000 cellule per ml di PBS) che verrà trattato come gli altri.

2.3.1.2 Estrazione del DNA

Si utilizza il kit QIAGEN: DNeasy® Blood e Tissue Kit su 500µl di concentrato finale CF-A precedentemente centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm per l'ottenimento di un pellet. I campioni sono stati saggiati con i metodi successivi seguendo le procedure riportate nei rispettivi paragrafi indicati (paragrafo 2.2.2.).

2.3.1.3 PCR specifiche

(come descritto nel paragrafo 2.2.3.)

Il DNA estratto dal concentrato finale del campione mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR. I controlli, qualora si parta dalla colonia pura, devono essere trattati con la procedura di denaturazione termica (paragrafo 2.2.3.).

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

(come descritto nel paragrafo 2.2.3.).

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (dati non pubblicati)

(come descritto nel paragrafo 2.2.3.).

2.3.2 Procedura B

2.3.2.1 Preparazione estratto semi (ES-B)*

Aggiungere ad ogni campione 7,5 mL 0.01M PBS per g di seme lasciando imbibire i semi a temperatura ambiente per 3 giorni in agitazione 120-150 rpm.

Questo passaggio consente la moltiplicazione di cellule di Cmm, è quindi opportuno monitorare la temperatura che deve essere compresa fra 20 e 25 °C. I semi devono essere completamente immersi nel buffer assicurandone il movimento all'interno del contenitore. Trasferire in sacchetti con filtro e lasciare sedimentare i semi per raccogliere l'estratto finale (ES).

L'ES va addizionato del 30% glicerolo qualora debba essere mantenute a -20 °C a medio-lungo termine per ulteriori accertamenti.

*Non prevede l'ottenimento di un concentrato finale in quanto la procedura di 'soaking' permette la moltiplicazione di cellule di Cmm.

2.3.2.2 Immunofluorescenza (IF)

In questa fase del protocollo viene analizzato l'estratto da seme ottenuto secondo la procedura illustrata, eventualmente privato del glicerolo, ed il controllo, seguendo le procedure precedentemente riportate nel paragrafo 2.2.4.

2.3.2.3 Estrazione del DNA

Si processano 500 µl di ciascun ES-B con il kit QIAGEN: DNeasy® Blood e Tissue Kit centrifugando per 5 minuti a 10000 rpm per l'ottenimento di un pellet.

I campioni sono stati saggiati con i metodi successivi seguendo le procedure precedentemente riportate nei rispettivi paragrafi.

Anche in questo caso per identificare possibili inibitori della reazione di amplificazione presenti nella matrice vegetale viene preparato un campione di controllo (seguendo la procedura indicata nel paragrafo 2.3.2) che verrà analizzato come gli altri.

2.3.2.4 PCR specifiche

Il DNA estratto dall'ES-B del campione mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR.

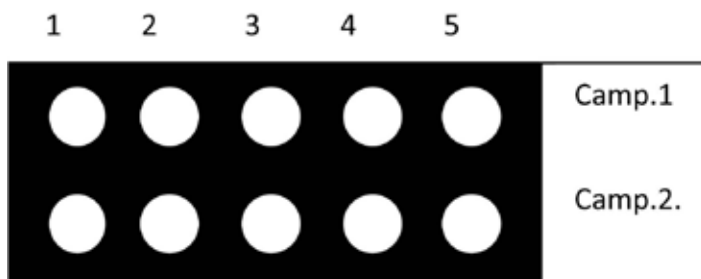
Per i controlli, qualora si parta dalla colonia pura, occorre procedere all'estrazione del DNA attraverso la denaturazione termica come descritto nel paragrafo 2.2.3

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

Come descritto nel paragrafo 2.2.3.

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (dati non pubblicati)

Come descritto nel paragrafo 2.2.3.



3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Valori di validazione

I seguenti parametri di validazione sono stati elaborati secondo i documenti EPPO PM 7/98 (2) ed Iso 16140:2003(E): sensibilità analitica, specificità analitica, sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, accuratezza relativa, accordanza e concordanza.

3.2 Prove valutative gruppo di lavoro

3.2.1 Sensibilità analitica (LOD) dei metodi di isolamento, molecolari ed IF

Il limite di rivelazione (LOD), espresso in ufc/ml viene di seguito riportato per ciascun metodo:

Isolamento su mezzi generici e semi-selettivi

ufc/ml	Isolamento su YPGA	Isolamento su Dhavanthari	Isolamento su mSCM
LOD	10 ³ 3:2000	10 ⁶ 3:2000	10 ⁴ 5:2000

IF e metodi molecolari

ufc/ml	IF*	PCR Pastrick and Rainey, 1999	PCR Dreier et al.,1995	PCR Pastrick and Rainey, 1999**
LOD	10 ³ 3:2000	10 ⁵ 1:2000	10 ⁵ 1:2000	--- 1:2000

*I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

- Kit per immunofluorescenza: Neogen Phytodiagnosics (1113-18) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Fluoriscan IF Kit;
- Vetrini per immunofluorescenza: vetrini multipli per microscopio, diametro pozzetti 6 mm Menzel-Gläser Diagnostica e Thermo Scientific cod. X1XER308B#MNZ, vetrini copri oggetto 24 x 60 mm Prestigi di Vemi S.r.l.;
- Microscopio a fluorescenza: Zeiss, Axioskop 2 plus - HAL 100 e Nikon Eclipse 80i.

**Hot Start Immobilase™ DNA Polymerase

3.2.2 Specificità analitica (esclusività ed inclusività)

La specificità analitica è stata valutata a partire da una collezione di ceppi batterici ‘target’ e ‘non target’ (tabelle 1 e 2) utilizzando le tecniche di IF e molecolari precedentemente illustrate (paragrafi 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4).

TABELLA 1 - Isolati ‘target’ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) provenienti da diversi areali geografici:

“ TARGET”	PROVENIENZA
NCPPB 2979T	UNGHERIA
ISPAVe 1045	SICILIA
NCPPB 382	UK
PVCT 150.8	ITALIA (RG)
PVCT 156.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 161.6.1	ITALIA (RG)
PVCT 163.2.3	ITALIA (RG)
PVCT 172.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 317.4	EMILIA ROMAGNA
PVCT 342	EMILIA ROMAGNA
PVCT 171.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 07265N1	BATTIPAGLIA(SA)

TABELLA 2 - Isolati ‘non target’ rappresentati da isolati batterici appartenenti a differenti generi:

“NON TARGET”	PROVENIENZA
C. MICHIGANENSIS SUBSP. NEBRASKENSIS	NCPPB2581 T STATI UNITI
C. MICHIGANENSIS SUBSP. TESSELLARIUS	NCPPB3664 T STATI UNITI
C. MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS	NCPPB 2140 REPUBBLICA CECA
PSEUDOMONAS CORRUGATA	CFBP5454 ITALIA
P. MEDITERRANEA	CFBP5447 ITALIA
P. SYRINGAE PV TOMATO	PVCT28.3.1 ITALIA
RALSTONIA SOLANACEARUM	NCPPB 325 STATI UNITI
NON IDENTIFICATO	184.2 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.3 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.4 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.5 ITALIA

L'IF ha prodotto due risultati debolmente positivi con i seguenti ceppi batterici 'non-target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis*. subsp. *nebraskensis*

NCPPB 2140 *C. michiganensis*. subsp. *sepedonicus*

e tre risultati debolmente positivi con il seguente ceppo batterico 'non target':

NCPPB 3664 *C. michiganensis*. subsp. *tesselarius*

La PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) ha prodotto un risultato falso positivo con i seguenti ceppi batterici 'non target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

NCPPB 2140 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

NCPPB 3664 *C. michiganensis* subsp. *tesselarius*

PVCT 184.6 Contaminante

La PCR CMM 5/6 Dreier et al. (1995) ha prodotto un risultato falso positivo con il seguente 'non target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis*. subsp. *nebraskensis*

I migliori risultati sono stati ottenuti con la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) utilizzando hot start' Immolase TM DNA polimerasi (Bioline) dove tutti gli isolati batterici sono stati correttamente identificati.

3.3 Prove valutative inter-laboratorio

3.3.1 Campioni utilizzati per la validazione

Ai partecipanti sono stati forniti i seguenti campioni (Tab. 3):

- n.11 campioni di 5000 semi ciascuno (1A-11A) che andranno processati come da protocollo A
- n. 11 campioni di 2000 semi ciascuno (1 B-11B) che andranno processati come da protocollo B
- due ceppi come controlli positivi, (CMM NCPPB 2979T e PVCT 156.1.1) liofilizzati, che andranno processati con entrambi i protocolli.

TABELLA 3 - Campioni utilizzati per la validazione dei metodi diagnostici saggiati

Numero di campioni	Livello contaminazione	
	Protocollo A	Protocollo B
2	5000 semi contaminate con 1 seme infetto da Cmm	2000 semi contaminate con 1 seme infetto da Cmm
2	5000 semi contaminate con 3 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 3 semi infetti da Cmm
2	5000 semi contaminate con 5 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 5 semi infetti da Cmm
2	5000 semi contaminate con 5 semi infetti con un non target (<i>Pseudomonas corrugate</i>)	2000 semi contaminate con 5 semi infetti con un non target (<i>Pseudomonas corrugate</i>)
2	5000 semi non infetti	2000 semi non infetti
1	5000 semi contaminate con 10 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 10 semi infetti da Cmm

3.3.2 Metodi molecolari

Per quanto riguarda i risultati relativi ai parametri di validazione ottenuti dall'estratto CF-A ed ES-B per i metodi molecolari (Tabella 4), tutti i laboratori hanno ottenuto risultati insoddisfacenti (non riportati) utilizzando la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) con la Go Taq®Flexi DNA polimerasi (Promega). L'utilizzo dell'Immolase™ Hot Start DNA Polymerase (Bioline) con lo stesso metodo ha invece migliorato l'esito delle analisi dei campioni, compresi quelli alla dose più bassa di contaminazione (1:5000), rilevati in 7 laboratori su 9 per il protocollo A e 5 laboratori su 9 per il protocollo B. Relativamente alla PCR CMM 5-6 (Dreier *et al.*, 1995) per il protocollo A due laboratori non hanno ottenuto alcun risultato alterando così tutti i valori mentre per il protocollo B si sono avuti risultati attendibili soltanto nel caso di due laboratori, ragione per cui i valori di validazione vengono riportati in tabella ma non sono ritenuti soddisfacenti.

TABELLA 4 - Dati di validazione delle performance metodi molecolari per le procedure A e B.

Criterio di valutazione %	PCR PSA8/R Immolase TM DNA polimerasi		PCR CMM 5-6 (Dreier et al. ,1995)	
	CF-A	ES-B	CF-A	ES-B
Sensibilità diagnostica	81,0	84,1	61,9	17,5
Specificità diagnostica	86,1	91,7	94,4	88,9
Accuratezza relativa	82,8	86,9	73,7	43,4
Accordanza	79,8	79,4	70,2	52,2
Concordanza	70,5	87,9	60,1	57,9

3.3.3 IF

I valori di validazione della tecnica di IF sono riportati in Tabella 5.

I risultati ottenuti non appaiono soddisfacenti: in diversi laboratori si sono avuti risultati falsi negativi e positivi, anche in campioni con alti livelli di inoculo. Tutti i parametri si attestano intorno al 50%, in quanto solo i campioni alla più alta dose di inoculo sono stati rilevati positivi. Ciò dipende probabilmente dalla necessità di personale altamente qualificato per il riconoscimento di cellule batteriche al microscopio.

Tabella 5 - Dati di validazione delle performance della tecnica di IF per la procedura B.

Criterio di valutazione %	IFAS
Sensibilità diagnostica	51,8
Specificità diagnostica	59,4
Accuratezza relativa	54,5
Accordanza	52,9
Concordanza	50,1

3.4 Conclusioni

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza accettabili valori di performance per alcuni metodi molecolari saggiati (84-92%) rispetto alla tecnica di IF (50-59%). Fattore indispensabile per ottenere risultati positivi con la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) è l'utilizzo di una polimerasi 'hot-start', come d'altronde indicato nel lavoro originale di Pastrick e Rainey (1999). Le performance di questo metodo appaiono superiori anche rispetto alla PCR CMM 5-6 (Dreier *et al.*, 1995). Diversamente i valori di performance ottenuti utilizzando la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) con la GoTaq® Flexi DNA Polymerase, (Promega) hanno fornito valori di accuratezza inaccettabili (es. 38% con procedura A).

Per quanto riguarda il protocollo di estrazione dei semi si ottengono risultati simili con entrambe le procedure di estrazione utilizzando di seguito la PCR secondo Pastrick e Rainey (1999). Attualmente il protocollo EPPO non prevede una fase di "screening" preliminare che si basi su metodi molecolari, ma suggerisce 2 diagrammi di flusso paralleli che come prima tecnica di diagnosi prevedono rispettivamente l'isolamento e l'IF. Tuttavia l'isolamento è notoriamente una fase critica per questo patogeno sia come tempistica che come possibilità di successo. Il batterio è infatti a lenta crescita e nel caso di matrici come il seme questi possono aver subito trattamenti o possono essere presenti popolazioni antagoniste, fattori che possono inibire la crescita su substrato del patogeno. Per quanto riguarda l'IF, anche i valori ottenuti da questo studio evidenziano risultati insoddisfacenti per le problematiche relative alla necessità di personale qualificato con esperienza nel riconoscimento delle cellule batteriche. Alla luce di quanto sopra riportato, l'utilizzo di saggi molecolari come screening preliminare appare un passaggio utile al fine di valutare in maniera preliminare lo stato fitosanitario di campioni in analisi. Essendo i valori di performance per i metodi molecolari intorno all'80% è comunque auspicabile la messa a punto e/o la validazione di nuovi metodi più sensibili e specifici delle PCR convenzionali, basati su sistemi come la Real Time PCR, la LAMP e la Digital PCR.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- DHAVANTHARI BV (1988) Comparison of selective media for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **77**, 1694
- DREIER J, BERMPHOHL A & EICHENLAUB R ,1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Phytopathology* **85**, 462-468.
- Eppo Diagnostic Pm 7/98 (2010) Specific Requirements For Laboratories Preparing Accreditation For A Plant Pest Diagnostic Activity.
- EPPO, 2004 PM7/42 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO Bulletin 35, 275-283
- EPPO, 2013. PM 7/42(2). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO Bulletin 43 (1), 46-67
- V. OLIVIER, A. BALOCHE, A. DROUIN, C. AUDUSSEAU, S. PAILLARD AND H. SOUBELE 2010 Internal methods comparison study and inter laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds1 Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **40**(2):248 - 256
- PASTRIK KH & RAINEY FA (1999). Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* **147**, 687-693.
- WATERS C. M. AND BOLKMAN H. A. (1992) An improved semi selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Phytopathology* **82**, 1072.

ALLEGATO I Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Strumenti

1. autoclave
2. blocco termostato
3. cappa aspirante
4. cella elettroforetica
5. centrifuga
6. frigoriferi +4°C e - 20°C
7. macchina per produzione ghiaccio
8. microscopio a fluorescenza
9. mortai o Stomacher
10. pH-metro
11. piastra agitante con ancorette magnetiche
12. pipette da P-2 a P-1000
13. spettrofotometro
14. termociclatore
15. termostato
16. transilluminatore UV

Reagenti

1. acido bórico
2. agar
3. agarosio per elettroforesi
4. CaCO_3
5. D(+)-glucosio
6. EDTA
7. estratto di lievito
8. glicerolo
9. $\text{d H}_2\text{O}$
10. $\text{d H}_2\text{O}$ ultrapura per PCR
11. KH_2PO_4
12. K_2HPO_4
13. MgSO_4
14. NaCl
15. Na_2CO_3

16. NaHCO_3
17. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
18. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
19. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
20. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
21. NaOH
22. peptone batteriologico
23. D(+)-saccarosio
24. trizma base

Materiali

1. guanti monouso
2. piastre di Petri con diametro 90 mm
3. provette "Eppendorf" da 1,5 ml
4. provette da PCR
5. puntali per P-2 a P-1000 con filtro
6. puntali per P-20 a P-1000 senza filtro
7. vetrini multipli per microscopio
8. vetrini coprioggetto
9. per IFAS: Adgen Phytodiagnosics 1113-17 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 500 test fluoriscan IF Kit;
10. per estrazione DNA: DNeasy® Blood e Tissue Kit (50). QIAGEN
11. per PCR: kit
12. per PCR: coppie di primer CMM 5/6.; PSA8/R
13. per PCR: dNTPs,

Allegato II Tamponi e terreni di crescita

Tampone fosfato di estrazione PB (tampone fosfato 50 mM, pH 7,4):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	19,57 g
KH_2PO_4	1,65 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,5 g
d H_2O fino a	1,0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min, lasciar raffreddare a temperatura ambiente ed aggiungere 0,2 ml di Tween 20 (soluzione 10%) sterile.

Tampone di estrazione PBS (tampone fosfato salino 0,01M, pH 7,2):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
d H_2O fino a	1,0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min, lasciar raffreddare a temperatura ambiente.

Tampone IF (Na-PBS):

NaCl	42,50 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	0,68 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2 \text{H}_2\text{O}$	8,00 g
d H_2O	5,00 l

Liquido di montaggio (glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato):

Questo liquido si prepara con glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato a pH 9, nelle proporzioni 9:1. La soluzione finale così ottenuta va conservata a 4 °C, con l'accortezza di rinnovarla ogni 6-8 mesi.

Tampone TAE 1X

Tris base	48,40 g
acido acetico glaciale	11,42 ml
EDTA	4,65 g

(oppure 20 ml soluzione 0,5M, pH = 8,0)

d H_2O portare a Vf =	1,00 l
---------------------------------------	--------

Tampone per sedimento (tampone fosfato 10 mM, pH 7,2):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
d H_2O	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

Terreno non selettivo YPGA

Yeast Extract	5 g
Bacto Peptone	5 g
Glucosio	10 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1,0 L

Terreno semi selettivo Dhanvantari (Dhanvantari, 1988, modified)

Glicerolo	10 g
Difco Bacto Pseudomonas agar F	38 g
dH ₂ O	1,0 L
Dopo autoclave (115 °C for 20 min.) aggiungere	
Cycloheximide	0,2 g
Acido nalidixico sodium salt (Sigma Chemicals)	30 mg
Potassio tellurite	10 mg

Terreno semi-selettivo mSCM (Waters C. M. and Bolkman H. A. (1992)

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2.62 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.25 g
Acido borico	1.5 g
Mannosio	10 g
Estratto di lievito	0.1 g
Agar	12 g
dH ₂ O	1,0 L
Dopo autoclave (115 °C for 20 min.) aggiungere:	
Acido nalidixico	30 mg
Acido nicotinico	100 mg
Cycloheximide	200 m g
Potassio tellurite	13 mg