



Convegno: IL SETTORE FITOSANITARIO E L'EPPO: CONTRIBUTI  
E CRITICITA' – Roma 23 febbraio 2011

# La diagnostica e l'accreditamento dei laboratori

**Graziella Pasquini e Marina Barba**

*CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale*

# Diagnosi fitosanitaria

Ricerca

Laboratori

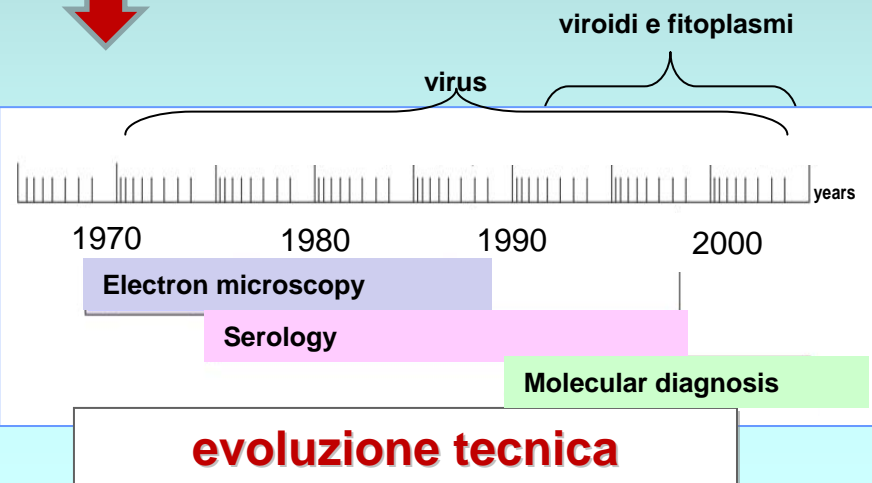
standardizzazione

Protocolli di riferimento

UNI EN ISO 9001

ringtest

UNI CEI EN ISO/IEC 17025



# Azioni COST

**COST 88 - 'Plum Pox Virus Workshop'**  
**Valencia (Spain), 2-6 june 1993**

**COST 823 – 'Zucchini viruses Workshop'**  
**Turin, October 1996**

**COST 823 - 'Iarviruses Workshop'**  
**Rome (Ispave), 24-28 october 1998**

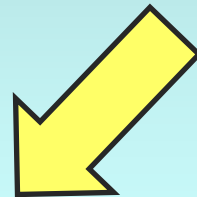
# DIAGPRO

## **Diagnostic protocols for organisms harmful to plants**

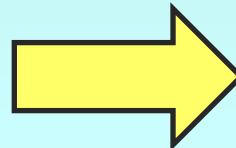
Harju, V. A.; Henry, C. M.; Cambra, M.; Janse, J.;  
Jeffries, C.; Blackwell Science, Oxford, UK, Bulletin  
OEPP, 2000, 30, 3/4, pp 365-366

**Diagnostic protocols for organism harmful to plants (DIAGPRO)** is an **EU-funded project** to develop **diagnostic protocols for 18 quarantine pests and pathogens**. Pilot test methods will be developed in the laboratories of the four partners in England, Scotland, The Netherlands and Spain. **The methods will be ring-tested** at selected EU laboratories and published on the Internet for comment.

# European and Mediterranean Plant Protection Organization



**Panel di Esperti**



**Standard**

## Panel on Diagnostic

1998

### **Obiettivo:**

Sviluppo di protocolli diagnostici per organismi da quarantena



Marina Barba, Laura Tomassoli, CRA-PAV

## Panel on technical requirements for laboratories

2004

### **Obiettivo:**

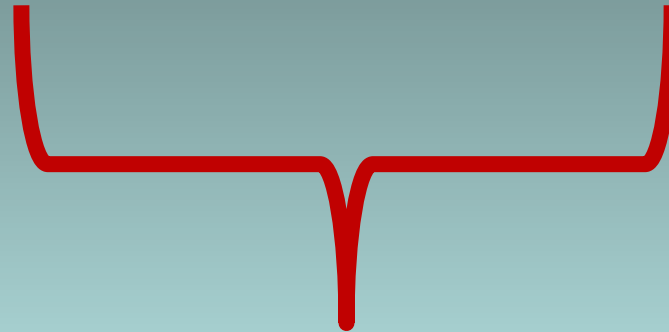
Sviluppo di uno standard EPPO che serva all'interpretazione della ISO/IEC 17025 per l'identificazione di parassiti delle piante



Graziella Pasquini, CRA-PAV; Marica Calvi, SFR Lombardia

**Panel on Diagnostic**

**Panel on technical  
requirements for  
laboratories**



**Panel on Diagnostics and Quality  
Assurance**

**Paris, 2010-11-09/12**



**Graziella Pasquini, Marina Barba; CRA-PAV**

# Standard on Diagnostic (PM7)

## 101 Standard

### Panel on Diagnostic

94 protocolli di diagnosi  
5 su tecniche di diagnosi

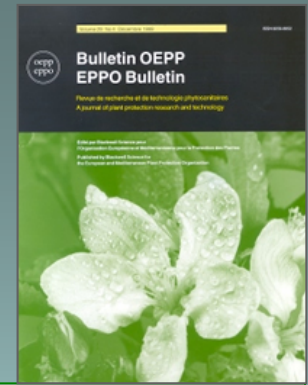
### Panel on technical requirements for laboratories

#### PM 7/84(1)

**Basic requirements for quality  
management in plant pest diagnosis  
laboratories**

#### PM 7/98(1)

**Specific requirements for  
laboratories preparing accreditation  
for a plant pest diagnostic activity**





# Standard PM 7/84 e PM7/98

**Accreditamento  
secondo Iso  
17025**

**Permesso amministrativo  
rilasciato da enti  
accreditori nazionali**



**Diverse interpretazioni**



# Standard P7/98

**Table 1** Guidance on the verification of performance criteria

Analytical sensitivity	Analytical specificity	Repeatability	Reproducibility
Analyse at least 5–10 samples at the established limit of detection. This can be combined with repeatability/reproducibility.	Select a few of the most relevant targets (e.g. different strains) and non-targets. Tests should be performed at medium levels of organisms.	Perform at least 2 experiments with 3 levels of target organism* (low <sup>†</sup> /medium/high) with the same operator and equipment at the same day.	Perform at least 3 experiments with 3 levels of target organism* (low <sup>†</sup> /medium/high) but at different moments, when possible with different operators, and when relevant with different equipment.

\*Artificial subsamples created from 1 sample can be used.

†At the limit of detection.

**Table 9** Virology

This table covers viruses, viroids and phytoplasmas.

Figures given in these tables are based on the validation experience of experts from EPPO Panels dealing with diagnostics. Deviations from this guidance may be necessary depending on pest/plant combination. In such case reasons for deviation should be documented

**Method for extraction of target from matrix** (genomic material/organism)

Remark. Extraction is always validated by a test.

Analytical sensitivity	The method should be able to extract a sufficient quantity of target organism or its DNA/RNA/protein from a relevant test sample. Isolate the target from at least 3 samples.
Analytical specificity	This parameter is not relevant. Extraction of the target organism from a sample is per definition non-specific.
Selectivity	Test selectivity of the extraction, as described in sensitivity, on different cultivars of the host plant.
Repeatability	Use one sample with low concentration of target and make 8 subsamples (extractions). Assess extraction efficiency by the relevant test method.
Reproducibility	As for repeatability but with different operator(s) if possible, on different days and with different equipment when relevant.

**Molecular methods**, e.g. hybridization, PCR and real-time PCR

Remark. This step also includes methods for isolation of RNA/DNA from the sample material.

Analytical sensitivity	Because the concentration of viruses, viroids and phytoplasmas is never known, determine the maximum dilution of RNA/DNA detected. The sensitivity determined here is not an absolute sensitivity but a <b>relative sensitivity</b> . <u>Perform at least 3 experiments with eight serial dilutions</u> . If consistent results are not obtained after 3 series then additional series should be prepared and tested.
Analytical specificity	<b>Analytical sensitivity refers to a specific set of test parameters which should be stringently defined and standardised, e.g. brand of PCR reagents (in particular DNA polymerase) and PCR cycle conditions.</b> <u>Screen once against a range of target and relevant non-target organisms that might be present in the sample.</u> In addition the test results can be supported by ' <i>in silico</i> ' comparison of probe/primer sequences to sequences in genomic libraries.
Selectivity	<b>Possible influences on the analytical sensitivity have to be considered. Determine the influence of the matrix by adding positive sample to sap from different cultivars of the crop.</b>
Repeatability	<u>At least one sample for each of the 2 modalities (regarding analytical sensitivity results) low/medium levels of target organism, min. 2 subsamples, at least 3 but preferably 8 replicates.</u>
Reproducibility	As for repeatability but <u>with different operator(s)</u> if possible, on different days and with different equipment when relevant.

**Serological methods: ELISA and Direct Tissue Blot Immuno Assay**

Analytical sensitivity	Because the concentration of viruses is never known: use one healthy sample (same matrix as to be validated), prepare at least 8 subsamples to determine the standard deviation in the optical density (OD) to determine the background reaction. Perform at least 3 experiments of eight serial dilutions of positive sample in the healthy sample selected. In each experiment, perform two repetitions for each serial dilution. Determine the highest dilution of sample extracts which could be detected. If consistent results are not obtained after 3 series then additional series should be prepared and tested. The sensitivity determined here is not an absolute sensitivity but a relative sensitivity. Analytical sensitivity refers to a specific set of test parameters which should be stringently defined and standardised, e.g. the OD threshold in the ELISA test.
Analytical specificity	Screen antibodies against a range of related target organisms and relevant non-related target organisms that might be present in the sample.
Selectivity	Possible influences on the analytical sensitivity have to be considered. Determine the influence of the matrix by adding positive sample to sap from different cultivars of the crop. Use at least 2 subsamples for each target organism.
Repeatability	Use at least 3 samples at a low target level (regarding analytical sensitivity results), 2 subsamples for each and 8 different plates (tests).
Reproducibility	This assessment will provide information on the level of uncertainty of the test result. As for repeatability but with different operator(s) if possible, on different days and with different equipment when relevant.

**Table 9** Virology (Continued)

---

<b>Bioassay methods:</b> plant test (mainly used as verification test for viruses or viroids but not for phytoplasmas) and grafting.	
Analytical sensitivity	Determine the maximum dilution of inoculum in the buffer to produce symptoms or multiply in plants. This is only an estimation of dilutions that can be used. Use 1 representative sample and 3 subsamples for each dilution. The sensitivity determined here is not an absolute sensitivity but a relative sensitivity. Analytical sensitivity refers to a specific set of test parameters which should be stringently defined and standardised, e.g. stage of test plants, inoculation method and incubation conditions. Not relevant for grafting.
Analytical specificity	Define specificity of the bioassay on (i) strains of the target organism covering genetic diversity, different geographic origin and hosts and (ii) for a set of non-target organisms, in particular those associated with the sample material.
Selectivity	Determine the relative insensitivity of the test to variations of the sample material, e.g. by using different cultivars of the host plant.
Repeatability	Use one representative sample (with eight plants for each host) of appropriate dilution determined in sensitivity assay and use the host plants determined in specificity assay. This assessment will provide information on the level of uncertainty of the test result.
Reproducibility	As for repeatability but with different operator(s) if possible, on different days and with different equipment when relevant.
<b>Biochemical methods:</b> e.g. electrophoresis, R-PAGE	
Analytical sensitivity	Determine the maximum dilution of target individuals/nucleic acid/protein to perform a reliable analysis. The sensitivity determined here is not an absolute sensitivity but a relative sensitivity. Specify positive and negative reactions. Test parameters should be stringently defined and standardised.
Analytical specificity	Compare with relevant organisms/proteins/contaminants and show differentiation can be made. Investigate also intraspecific variability. Define the characteristics to be identified.
Selectivity	Not applicable.
Repeatability	At least 8 replicates of same sample extract with low levels of target organism. These levels should be defined as proportional to the analytical sensitivity.
Reproducibility	As for repeatability but vary relevant conditions, e.g. different operator, time (delay and storing conditions after sample preparation), to assess flexibility of the test. These require at least 8 replicates. Also equipment and reagents may be varied as part of robustness. These conditions require at least 3 replicates with comparable results.

---

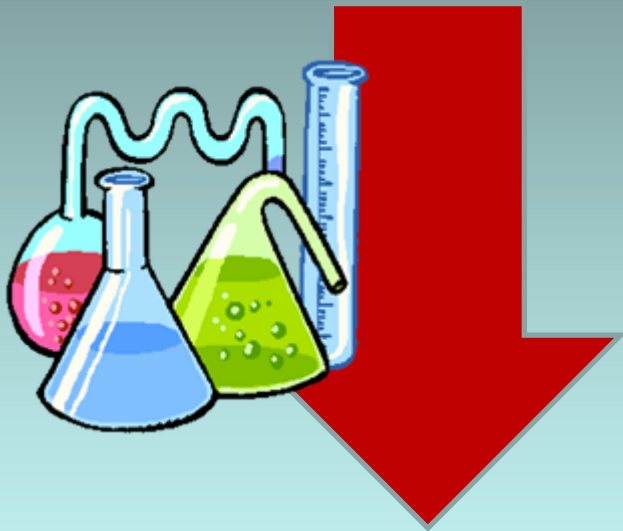
# Protocolli di diagnosi EPPO



**Protocolli di riferimento per tutti i laboratori di fitodiagnosi**

**Ampia possibilità di scelta tra più metodiche**

# Protocolli di diagnosi EPPO

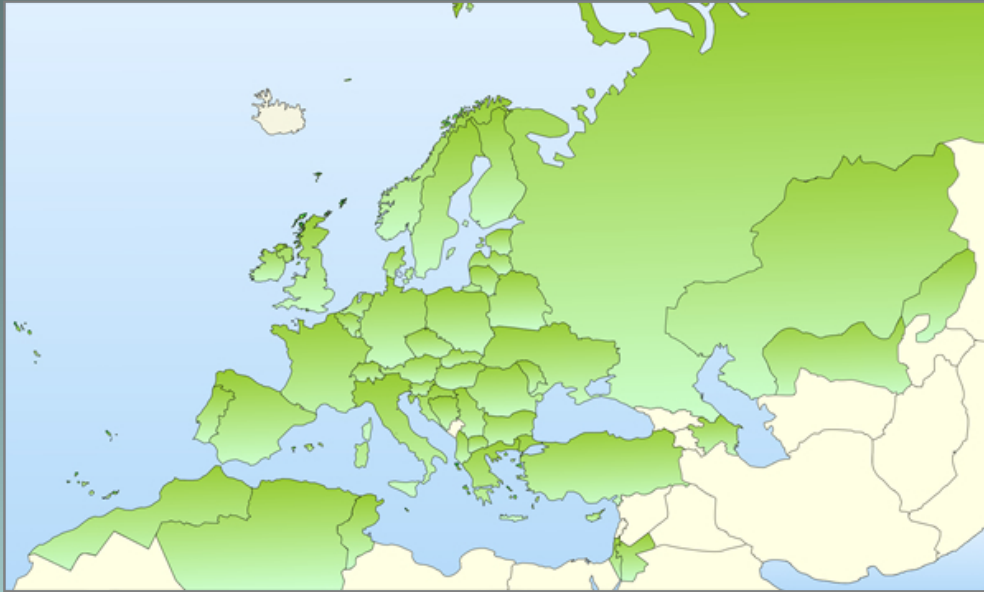


**Non sono riconosciuti in caso di contenziosi legali**

**A volte sono inefficaci su isolati a distribuzione geografica più specifica**

**Necessità di un aggiornamento continuo**





**Iniziative a  
livello  
nazionale**

**Produzione protocolli  
ufficiali nazionali**

**Laboratorio di  
riferimento accreditato**

# Decreto Legislativo 19 agosto 2005, n. 214

## Art. 53.

### *Cooperazione fra i laboratori*

1. **I laboratori per le analisi** e le consulenze specialistiche per la determinazione degli organismi nocivi contemplati dalle normative di competenza dei Servizi fitosanitari regionali **cooperano al fine di formare una rete nazionale.**
2. I laboratori dei Servizi fitosanitari regionali, nonché le strutture laboratoristiche pubbliche operanti nel settore della ricerca e della sperimentazione agraria, che si impegnano a collaborare con il Servizio fitosanitario nazionale sulla base di specifici protocolli di intesa o convenzioni fanno parte della rete nazionale di laboratori.
3. La responsabilità tecnica dei laboratori dei Servizi fitosanitari regionali deve essere affidata ad Ispettori fitosanitari o altri tecnici abilitati.
4. **I laboratori afferenti alla rete nazionale debbono soddisfare gli standard tecnici stabiliti conformemente a quanto previsto dall'articolo 49, comma 2, lettera c).**
5. La rete nazionale di laboratori è sottoposta al coordinamento e alla valutazione del Comitato.
6. I Servizi fitosanitari regionali, sotto la responsabilità delle proprie strutture tecnico-laboratoristiche, possono avvalersi, per limitati periodi e per particolari esigenze, di laboratori non facenti parte della rete, previo il parere del Comitato.
7. **Il Servizio fitosanitario centrale, sentito il parere del Comitato, può individuare uno o più laboratori della rete quali unità di riferimento e di coordinamento per la rete nazionale** di laboratori, ciascuno per il proprio settore di competenza.



**Articolo 49, comma 2, lettera c):** Al Servizio fitosanitario centrale compete:

la determinazione degli standard tecnici, cui debbono attenersi i Servizi fitosanitari regionali, previo parere del Comitato di cui all'articolo 52



**P.F. ARON-ARNADIA**

Armonizzazione della diagnosi e valutazione del rischio di patogeni da quarantena e nocivi ai vegetali e ai prodotti vegetali

SFR



Liste di patogeni



Gruppo di lavoro



SFR



PROTOCOLLO

Comitato  
fitosanitario

Approvazione



# Definizione di protocolli diagnostici standard a livello nazionale

<b>Funghi</b>	<b>Batteri</b>	<b>Fitoplasmi</b>	<b>Virus</b>
<i>Tilletia indica</i> (Ringtest in atto)	<i>Erwinia amylovora</i> da materiale asintomatico	'Candidatus <i>Phytoplasma prunorum</i> '	PPV (rilasciato)
<i>Guignardia citricarpa</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> da seme	'Candidatus <i>Phytoplasma mali</i> '	PSTVd
<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> da materiale asintomatico	'Candidatus <i>Phytoplasma pyri</i> '	Virus della vite (GLRaV 1, 2, 3, GVA, GVB, GFLV, ArMV, GFkV) (in rilascio)
<i>Phytophthora ramorum</i> (Ringtest)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i> da terreno (?)		PeMV
<i>Gibberella circinata</i> (Ringtest)			<i>Crinivirus delle cucurbitacee e del pomodoro</i> (BPYV, LIYV, CYSDV, CABYV, TICV, ToCV)
<i>Ceratocystis platani</i>			
Diagnosi su terreno: <i>Chondrostereum pupureum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>V. albo-atrum</i> , <i>Armillariella mellea</i> , <i>Nectria galligena</i> , <i>Phytophthora cactorum</i>			

# FLUSSO DELLE PROCEDURE DI LAVORO

Costituzione Gruppo di Lavoro

Disponibilità Protocollo EPPO o di riferimento (DIAGPRO, ecc.)

Assenza di Protocollo EPPO o di altri di riferimento

1

validazione  
prot. EPPO

+

Ulteriori metodi  
disponibili in bibliografia  
non inclusi in prot. EPPO  
(es. real-time-RT-PCR)

VALUTAZIONE

RING-TEST

VALIDAZIONE

2

protocolli disponibili in  
bibliografia

CONFRONTO DEI  
PROTOCOLLI E SCELTA

VALUTAZIONE

RING-TEST

VALIDAZIONE

3

protocolli non disponibili in  
bibliografia

MESSA A PUNTO DI  
NUOVI PROTOCOLLI

CONFRONTO DEI  
PROTOCOLLI E SCELTA

VALUTAZIONE

RING-TEST

VALIDAZIONE

# ***Plum pox virus***

Protocollo diagnostico  
per  
*Plum pox virus* (PPV)

- **Descrizione della malattia**

- **Parametri di validazione**

- **Metodologie di campionamento**

- **Applicazione delle diverse metodiche**

- **Descrizione dettagliata:**

a) **ELISA**

b) **RT-PCR**

c) **rt RT-PCR**

- **Schemi di lavoro**

## Menu Principale

- [Home](#)
- [Notizie](#)
- [Enti coinvolti](#)
- [Normativa di riferimento](#)
- [Contatti](#)

## Il Progetto

- [Presentazione](#)
- [Aversità coperte dal progetto](#)
- [Risultati](#)

## STRATECO

Una vasta gamma di parassiti limita la capacità di vegetare, compromette la longevità e, in ultima analisi, riduce la produzione delle colture agrarie e forestali. In ogni settore della orto-floro-frutticoltura, così come nel verde urbano, infatti, non è infrequente la comparsa di nuove manifestazioni epidemiche causate da organismi, spesso poco conosciuti, che richiedono, pertanto, studi per migliorare le conoscenze ed individuare le modalità di intervento a difesa della coltura colpita.

Il progetto si propone di affrontare, su richiesta e di concerto con il Servizio Fitosanitario Centrale (SFC) ed i Servizi Fitosanitari Regionali (SFR), alcune avversità emergenti di particolare importanza fitosanitaria al fine di individuare strategie di contenimento delle stesse. In particolare si vogliono:

- approfondire alcuni aspetti epidemiologici degli agenti causali di malattia
- eseguire indagini genetiche (caratterizzazione di ceppi e/o isolati) degli agenti di malattia
- valutare il loro impatto economico sul territorio
- individuare idonee strategie di controllo.

Il progetto è organizzato per moduli biennali. In ogni biennio verranno affrontate specifiche problematiche. Prima della scadenza del biennio il SFC, su richiesta dei SFR, indicherà le priorità da affrontare nel modulo successivo.

Il progetto si propone, inoltre, di supportare il SFR attraverso il mantenimento di banche dati e la realizzazione di un sito web che fungano da raccordo costante tra i Servizi periferici e quello Centrale al fine di fornire tutte le informazioni

# PROTOCOLLI UFFICIALI

**SI**

**Valore aggiunto al risultato  
diagnostico**

**Competitività internazionale**

**Standardizzazione inter e  
intra-laboratori**

**Tutela dei laboratori**



**NO**

**Adattamento del laboratorio  
al protocollo**

**Necessità di aggiornamenti**

.....**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**