

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 16

Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Popillia japonica*

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 2 di 9

Sommario

PREMESSA	3
RIFERIMENTI NORMATIVI	4
<i>Popillia japonica</i>	6

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 3 di 9

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. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 4 di 9

- 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. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 5 di 9

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. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 6 di 9

Popillia japonica

Metodo diagnostico validato dal CREA-DC e che rientra nello scopo di accreditamento del DIALAB

Classificazione dell'agente eziologico	
Nome	<i>Popillia japonica</i> Newman
Tassonomia	Ordine: <i>Coleoptera</i> Famiglia: <i>Scarabaeoidea</i> Genere: <i>Popillia</i>
Avversità causata	-
Sinonimi	Scarabeo giapponese

1. Protocollo diagnostico della *Popillia japonica*

Scopo del metodo è l'identificazione specifica di insetti fitofagi mediante riconoscimento morfologico. Il presente metodo di prova è stato validato per la matrice entomologica larve del "Coleottero giapponese" *Popillia japonica* (Newman, 1841).

L'identificazione specifica mediante tecnica morfologica di esemplari di larva si basa sull'esperienza maturata da personale di laboratorio e sull'uso delle risorse disponibili quali: chiavi di riconoscimento, descrizioni morfologiche originali, esemplari conservati in alcol al 70% e fotografie di materiale entomologico di riferimento, che sono riconosciuti quali materiali di riferimento/documentazione a supporto dell'identificazione

2. Procedura operativa

Il metodo di riconoscimento morfologico si basa sull'identificazione a livello specifico di larve dell'insetto mediante l'uso di descrizioni morfologiche originali e chiavi di riconoscimento validate a livello internazionale, essendo esse inserite in lavori scientifici o pubblicate da musei di scienze naturali specializzati in collezioni entomologiche e al cui interno lavorano esperti tassonomi, PM EPPO, ISPM – FAO. Il riconoscimento viene effettuato da un operatore esperto in materia mediante l'utilizzo di strumentazione, quale stereomicroscopio ottico, utile alla discriminazione di caratteri morfologici dell'organismo.

2.1. Preparazione dei campioni

Il metodo necessita di materiale entomologico ben conservato. Il campione costituito da insetti allo stadio di larva deve essere conservato in provette contenenti alcol 70%. Il materiale deve essere conservato a temperatura ambiente, lontano da fonti di calore.

Prelevare la larva dalla provetta e posizionarla all'interno di un vetrino da orologiaio o una vaschetta di porcellana. Se il campione è stato conservato in alcol 70%, sommergere il campione con alcol al 70%, fino alla copertura del campione. Posizionare il campione sotto lo stereomicroscopio.

2.2. Riconoscimento morfologico

Osservare i caratteri morfologici della larva utili al riconoscimento della specie, seguendo le descrizioni e immagini riportate in pubblicazioni scientifiche nonché nel EPPO PM7/74(1) e consultando la documentazione fotografica, riportata in questo protocollo, che costituisce il materiale di riferimento.

Riscontrare la presenza o assenza dei seguenti parametri:

- 3 paia di zampe toraciche e 10 segmenti addominali, torace e addome biancastro, testa di colore marrone chiaro, forma del corpo a C (Fig. 1).
- Capsula cefalica con larghezza massima di 3,19 mm e lunghezza massima di 2,19 mm.
- Lato ventrale del decimo segmento addominale porta due file mediali di sei-sette spine in una caratteristica forma a V (Fig. 2).



Web Fig.1: Third instar larvae.
(photo Germain LNPV)

Web Fig.2: Pygidium with characteristic "V" shape.
(photo Germain LNPV)

2.3. Valutazione dei risultati

L'esito della prova si basa sulla espressione qualitativa che rileva presenza/assenza dell'organismo target. Il campione verrà considerato rilevato solo se tutti e tre i caratteri

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 8 di 9

diagnostici principali elencati saranno considerati presenti (conforme alle descrizioni e ai materiali di riferimento utilizzati).

Il campione verrà considerato non rilevato nel caso in cui anche un solo carattere diagnostico principale dei tre viene considerato assente (non conforme alle descrizioni e MR utilizzati).

Il campione si intende idoneo al processo d'identificazione specifica solo se presenta tutti i caratteri morfologici utili al riconoscimento, specifici del campione, rilevabili mediante l'utilizzo delle chiavi di riconoscimento sopra indicate.

Il campione che non presenta tali caratteristiche morfologiche, perché parzialmente danneggiato, non può essere diagnosticato mediante questo metodo. In questo caso l'esito del metodo sarà non rilevabile.

3. Valori di validazione ottenuti così come riportati nella correlata Dichiarazione di Validazione

I materiali di riferimento utilizzati per la validazione sono riportati nella tabella sottostante. Tutti gli insetti target di riferimento sono stati identificati tassonomicamente con analisi specifiche, Le larve sono state riconosciute a livello morfologico da un esperto entomologo del CREA DC di Firenze. A conferma del riconoscimento morfologico per ognuna di esse sono state condotte anche indagini biomolecolari con il sequenziamento del DNA amplificato della regione mitocondriale Citocromo ossidasi.

Tabella 1. Materiali di riferimento utilizzati per la validazione

Materiale di riferimento	N. collezione entomologica CREA-DC	Descrizione	Campo di applicazione
Larva di <i>Popillia japonica</i> (MR01-FI)	COLL_FI_01	Larva di <i>Popillia japonica</i> conservata in alcol 70%	Parametro target controllo di specificità
Larva di <i>Protaetia cuporea</i> (MR03-FI)	COLL_FI_02	Larva di <i>Protaetia cuporea</i> conservata in alcol 70%	Parametro non target controllo di specificità
Larva di <i>Amphimallon solstitiale</i> (MR04-FI)	COLL_FI_03	Larva di <i>Amphimallon solstitiale</i> conservata in alcol 70%	Parametro non target controllo di specificità
Larva di <i>Omaloplia</i> sp. (MR05-FI)	COLL_FI_04	Larva di <i>Omaloplia</i> sp. conservata in alcol 70%	Parametro non target controllo di specificità

Tutti i dati sono stati ottenuti mediante procedure sperimentali definite ed eseguite presso il laboratorio accreditato DIALAB sede di Firenze e sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti

Servizio fitosanitario nazionale

Documento tecnico ufficiale n. 16

Metodi diagnostici

Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Popillia japonica*

Pag. 9 di 9

Criterio di performance scelto per la validazione	Valori di performance ottenuti	Adeguatezza in base all'analisi dei rischi di validazione per lo scopo e l'utilizzo previsti	Documentazione disponibile presso il DIALAB
Specificità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (5)
Ripetibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (5)
Riproducibilità	100%	SI	M35, M36, PG03, EPPO PM 7/98 (5)