

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	
1	Revisione 1	Tavolo Permanente della Rete nazionale dei Laboratori	CFN 13/05/2024	26/08/2024	

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 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

<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

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;
- 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.

Regolamento di esecuzione (UE) 2023/1584 della commissione del 10 agosto 2023 relativo a misure per prevenire l'insediamento e la diffusione di *Popillia japonica* Newman e a misure per l'eradicazione e il contenimento dell'organismo nocivo in questione all'interno di determinate aree delimitate nel territorio dell'Unione.

Piano di Emergenza Nazionale per *Popillia japonica* Newman approvato dal CFN nella riunione del 18 marzo 2024.

<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

La procedura prevista per l'identificazione di *Popillia japonica* descritta nel presente DTU segue quanto riportato nel protocollo *EPPO PM 7/74 (1) + Addendum – PM 7/74 (1) Popillia japonica*.

Tale metodo diagnostico validato a seguito di Test Performance Study (TPS) organizzato e coordinato dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) area Entomologia e Acarologia e svolto da 5 laboratori ufficiali della rete laboratoristica nazionale, già accreditati con metodo morfologico per il riconoscimento di larve di *P. japonica*.

Classificazione dell'organismo nocivo	
Nome specifico	<i>Popillia japonica</i> Newman, 1841
Tassonomia	Phylum: Arthropoda Classe: Insecta Ordine: Coleoptera Famiglia: Scarabaeidae Genere: <i>Popillia</i>
Avversità causata	-
Nomi comuni	Scarabeo giapponese o Coleottero 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*.

L'identificazione specifica mediante tecnica di microscopia ottica di esemplari del coleottero giapponese allo stadio di larva si basa su: descrizione morfologica presente in *EPPO PM 7/74 (1) + Addendum – PM 7/74 (1) Popillia japonica* e materiale entomologico di riferimento ben conservato.

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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 16	Metodi diagnostici
Protocollo diagnostico per l'identificazione di <i>Popillia japonica</i>	Pag. 7 di 9

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% mantenute a temperatura ambiente, lontane da fonti di calore.

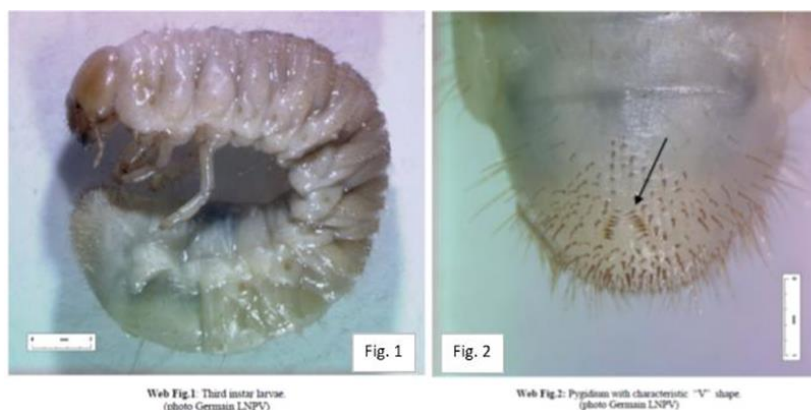
Al fine di preparare il campione all'osservazione si consiglia di posizionare lo stesso all'interno di un contenitore idoneo utile a mantenere il campione sotto alcol. Posizionare il contenitore con il campione sotto lo stereomicroscopio e procedere alla sua osservazione.

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 protocollo *EPPO PM 7/74 (1) + Addendum – PM 7/74 (1) Popillia japonica* e consultando la documentazione fotografica, riportata nel protocollo stesso, che costituisce il materiale di riferimento.

Riscontrare la presenza o assenza dei seguenti parametri come descritti in *EPPO PM 7/74 (1) + Addendum – PM 7/74 (1) Popillia japonica*:

1. Tre paia di zampe toraciche e dieci segmenti addominali, torace e addome biancastri, capo di colore marrone chiaro, forma del corpo a C (Fig. 1).
2. Lato ventrale del decimo segmento addominale porta due file mediali di setole in una caratteristica forma a V (Fig. 2).



2.3. Valutazione dei risultati

L'esito della prova si basa sulla espressione qualitativa che rileva presenza/assenza dell'organismo target.

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 quanto riportato nel protocollo *EPPO PM 7/74 (1) + Addendum – PM 7/74 (1)*

<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

Popillia japonica. Nel caso tali caratteristiche, non possano essere diagnosticate l'esito del metodo sarà "non determinabile".

Il campione verrà considerato "identificato" solo se tutti e due i caratteri diagnostici principali elencati saranno considerati presenti.

Il campione verrà considerato "non identificato" nel caso in cui anche un solo carattere diagnostico principale dei due viene considerato assente.

3. Valori di validazione ottenuti

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 sensibilità
Larva di <i>Protaetia cuprea</i> (MR03-FI)	COLL_FI_02	Larva di <i>Protaetia cuprea</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

I criteri della performance, utili alla validazione del metodo diagnostico in oggetto, sono stati valutati dal LNR area Entomologia e Acarologia (CREA-DC), a seguito dei risultati ottenuti dal TPS condotto dal 23 aprile al 9 maggio 2024, congiuntamente a prove interne svolte dallo stesso LNR per la valutazione del criterio di ripetibilità.

Nella tabella 2 sono riportati i valori della performance riferiti ai criteri scelti per la validazione del metodo diagnostico.

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

Tabella 2. Criteri di performance utilizzati per la validazione e relativi valori ottenuti in conformità con le linee guida EPPO 7/122 (2)

Parametro	Valori
Accuratezza	100%
Tasso Veri Positivi (Sensibilità diagnostica)	100%
Tasso Veri Negativi (Specificità diagnostica)	100%
Ripetibilità	100%
Riproducibilità	100%