

# *Servizio fitosanitario nazionale*

## **DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI**

Documento n. 68

### **Metodo di estrazione del DNA con kit commerciale per la diagnosi di Grapevine flavescence dorée phytoplasma**

<b>REV.</b>	<b>DESCRIZIONE REVISIONE</b>	<b>COMPILAZIONE</b>	<b>APPROVAZIONE</b>	<b>DATA DI ADOZIONE</b>	<b>FIRMA</b>
0	Revisione 0	GdL Laboratori	CFN 25/06/2024	02/07/2024	

**SOMMARIO**

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 2 di 11

PREMESSA.....	3
RIFERIMENTI NORMATIVI .....	4
Metodo di estrazione del DNA con kit commerciale per la diagnosi di Grapevine flavescence dorée phytoplasma .....	6
Dati di validazione .....	7

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 3 di 11

## **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 nazionale di riferimento 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

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 4 di 11

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.

## 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. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 5 di 11

**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. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 6 di 11

## Metodo di estrazione del DNA con kit commerciale per la diagnosi di Grapevine flavescence dorée phytoplasma

Classificazione dell'agente eziologico	
<b>Nome (acronimo)</b>	Grapevine flavescence dorée phytoplasma (FDp)
<b>Tassonomia</b>	Ordine: Acholeplasmatales Famiglia: Acholeplasmataceae Genere: Phytoplasma Specie ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma': proposto ' <i>Ca. P. vitis</i> ' (IRPCM, 2004) Gruppo 16Sr: 16SrV (Elm yellow), sottogruppi 16SrV-C e -D
<b>Avversità causata</b>	Flavescenza dorata della vite

Il presente metodo estrattivo, basato sull'impiego di un kit commerciale (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) in abbinamento al tampone di estrazione CTAB 2,5%, è stato validato con lo scopo di renderlo accreditabile come metodo normalizzato ai sensi dello Standard EPPO PM7/79 (2). Quest'ultimo, infatti, prevede la possibilità di utilizzare kit commerciali di estrazione, purché previa opportuna validazione.

Il metodo, precedentemente validato nell'ambito del Progetto ARNADIA per la diagnosi dei fitoplasmidi delle piante da frutto, è stato oggetto di un 'test performance studies' (TPS) nell'anno 2023 finalizzato alla sua validazione su matrice vite. La validazione del metodo è stata eseguita a seguito di richiesta da parte di diversi laboratori afferenti ai Servizi fitosanitari regionali, per gli indubbi vantaggi pratici che esso presenta. Si tratta, infatti, di un metodo rapido basato sull'uso di un kit commerciale che non richiede la polverizzazione delle nervature in azoto liquido ed evita l'utilizzo di reagenti tossici per l'operatore e per l'ambiente quali,  $\beta$ -mercaptoetanololo e cloroformio isoamil-alcool.

Il metodo di estrazione è stato validato analizzando il DNA estratto a partire da un set definito di campioni vegetali con i metodi ufficiali di amplificazione descritti nelle Appendix 3, 4, 5 e 6 dello Standard EPPO PM 7/79 (2) e confrontando i rispettivi valori dei parametri di validazione ottenuti nel TPS con quelli dichiarati, per ciascun metodo, nello stesso Standard.

### Procedura di estrazione del DNA

La presente procedura di estrazione prevede l'utilizzo del tampone di estrazione CTAB 2,5% abbinato al kit commerciale DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, cat. n. 69104), senza esecuzione della fase preliminare di polverizzazione del campione vegetale in azoto liquido, prevista dal kit stesso. Il buffer CTAB 2,5% sostituisce il buffer AP1 fornito dal kit.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 7 di 11

Per quanto riguarda le modalità d'uso del kit, la procedura di seguito descritta si attiene alle istruzioni d'uso fornite dal produttore in ultima revisione, salvo quanto specificato nelle note riportate nella procedura stessa.

Estrarre il DNA seguendo scrupolosamente la procedura di seguito descritta.

1. Preparare il tampone di estrazione CTAB 2,5% come di seguito specificato, utilizzando H<sub>2</sub>O sterile: pesare una quantità di CTAB corrispondente al 2,5% del volume finale, quindi aggiungere Tris pH 8 [100 mM], NaCl [1,4 M], EDTA pH 8 [50 mM]; sterilizzare mediante filtrazione con filtro da 0,2 µm o autoclavare la soluzione così ottenuta; prima dell'uso aggiungere 1% PVP-40 e 0,5% acido ascorbico.
2. Aggiungere 3 mL di tampone di estrazione CTAB 2,5% direttamente nella bustina Bioreba contenente il campione (0,5 g di nervature fogliari fresche o congelate a -20°C ± 5°C); se si parte da materiale vegetale conservato a -20 °C, aggiungere il tampone sul campione ancora congelato.
3. Macerare accuratamente le nervature all'interno della bustina, utilizzando un omogeneizzatore meccanico o manuale.
4. Prelevare dalla bustina 400 µL di lisato e trasferirlo in un tubo da centrifuga da 2 mL.
5. Aggiungere 4 µL di RNase A (100 mg/mL) fornita con il kit, vortexare e porre ad incubare a 65°C ± 2 °C per 10 minuti; invertire i tubi 2-3 volte durante l'incubazione.
6. Aggiungere 130 µL buffer P3, mescolare e incubare 5 minuti in ghiaccio.
7. Centrifugare il lisato per 5 minuti a 20.000 x g (14.000 rpm).

**N.B.** Nelle istruzioni fornite dal produttore questa fase di centrifuga viene indicata come "raccomandata", sottintendendo anche la possibilità di non farla; tuttavia, nel presente metodo va intesa come obbligatoria e, dunque, da eseguire necessariamente.

8. Pipettare il lisato nella colonnina QIAshredder posta in un tubo da 2 mL, quindi, procedere secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

**N.B.** Dall'esperienza acquisita, una sola eluizione è sufficiente per ottenere un'adeguata concentrazione di DNA, pertanto, non si rende necessario eseguire una seconda eluizione come riportato nelle istruzioni fornite dal produttore.

Gli estratti di DNA che si ottengono possono essere sottoposti ad amplificazione tal quali, senza necessità di una preventiva diluizione. Se non vengono immediatamente analizzati, conservare gli estratti di DNA a -20°C ± 5 °C.

### **Amplificazione**

Sulla base dei dati di validazione di seguito indicati, la diagnosi di flavescenza dorata della vite può essere effettuata mediante l'impiego di uno dei test di amplificazione indicati nelle Appendix 3-4-5-6 dello standard EPPO PM7/79 (2).

### **Dati di validazione**

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 8 di 11

Il presente metodo estrattivo è stato validato attraverso un TPS organizzato nel 2023 dal CREA - Centro di ricerca Difesa e Certificazione (CREA-DC), sede di Roma nell'ambito delle attività svolte dal Centro stesso in qualità di Laboratorio Nazionale di Riferimento Area virus, viroidi e fitoplasmi.

Il TPS è stato organizzato in conformità ai criteri stabiliti dallo Standard EPPO PM 7/122 (1) ed ha visto la partecipazione di 8 laboratori afferenti ai Servizi fitosanitari di sette regioni italiane e lo stesso CREA-DC di Roma. Gli otto laboratori coinvolti avevano partecipato tutti al 'proficiency test' (PT) sulla diagnosi di FD organizzato nel 2021 dallo stesso CREA-DC di Roma, risultando proficienti e, dunque, ritenuti idonei per le finalità del TPS.

Tutti i dati di validazione sono stati ottenuti mediante procedure sperimentali definite ed eseguite presso la sede di Roma del laboratorio multisito di analisi fitosanitarie DIALAB, accreditato secondo la norma ISO 17025, afferente al CREA-DC.

In particolare, la validazione è stata eseguita sottoponendo ai laboratori partecipanti un identico set di campioni composto da 9 campioni target (rappresentati da nervature fogliari prelevate da piante di vite naturalmente infette da FDp) e 3 non-target (rappresentati da nervature fogliari prelevate da piante di vite sane e naturalmente infette da '*Ca. P. solani*'), opportunamente randomizzati e resi anonimi attraverso un sistema di codifica. I laboratori hanno effettuato l'estrazione del DNA dal set di campioni con il metodo in valutazione ed analizzato gli estratti con uno dei metodi ufficiali di amplificazione del DNA descritti nelle Appendix 3, 4, 5 e 6 dello Standard EPPO PM 7/79 (2). Sulla base dei dati complessivamente ottenuti e in accordo con quanto riportato nello Standard EPPO PM 7/98 (5), sono stati determinati i valori dei seguenti parametri di validazione: sensibilità analitica, sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, ripetibilità e riproducibilità.

### ***Sensibilità analitica***

Per la valutazione della sensibilità analitica è stato utilizzato un set specifico di estratti di DNA ottenuto a partire da tre campioni (A, B, C) con diversa concentrazione relativa di FDp: alta (campione A), media (campione B) e bassa (campione C). Il valore del ciclo di quantizzazione (Cq) ottenuto, per ciascun campione, nel test di Triplex real time PCR (EPPO PM7/79 (2) – Appendix 6) è stato utilizzato come indice indiretto del titolo di fitoplasma nel campione stesso.

Per ciascun campione (A, B, C) sono stati, quindi, realizzati cinque punti di diluizione seriali (1/10 – 1/100 – 1/300 – 1/900 – 1/2700) utilizzando DNA estratto da pianta di vite sana, in accordo con lo schema sperimentale adottato per la validazione dei metodi di prova inclusi nello Standard EPPO PM7/79 (2). Il set di 15 campioni così ottenuto è stato, quindi, suddiviso in due serie identiche di aliquote analizzate presso due distinti laboratori per verificare la sensibilità analitica dei metodi descritti nelle Appendix 3 e 6 (laboratorio 1) e dei metodi descritti nelle Appendix 4 e 5 (laboratorio 2).

Al fine di determinare la sensibilità analitica di ciascun metodo di amplificazione utilizzato a partire dal DNA estratto con la procedura oggetto di validazione, sono stati determinati l'ultimo livello di diluizione con il 100% di risultati positivi e l'ultimo livello di diluizione con almeno un risultato positivo (tabella 1).



<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 9 di 11

Tabella 1 – Valori di sensibilità analitica ottenuti per i metodi di amplificazione utilizzati a partire da DNA estratto con il metodo in valutazione (CTAB 2,5% + kit Qiagen) su diluizioni seriali di tre campioni a differente titolo di fitoplasma (A, B, C).

Parametro	Campione	Metodo amplificazione PM7/79 (2)			
		Appendix 3	Appendix 4	Appendix 5	Appendix 6
<b>Ultimo livello con il 100% di risultati positivi</b>	A	1/2700	1/900	1/2700	1/2700
	B	1/900	1/10	1/2700	1/900
	C	1/100	1/10	1/2700	1/10
<b>Ultimo livello con almeno un risultato positivo</b>	A	1/2700	1/2700	1/2700	1/2700
	B	1/900	1/100	1/2700	1/2700
	C	1/100	1/10	1/2700	1/300

Sebbene riferiti a set di campioni diversi, dunque solo parzialmente confrontabili, i valori di sensibilità analitica ottenuti per i metodi di amplificazione a partire da DNA estratto con il metodo oggetto del TPS sono risultati, nella maggioranza dei casi, coincidenti con quelli riportati per gli stessi metodi nello Standard EPPO PM 7/79 (2) o migliori (tabella 2).

Tabella 2 - Confronto fra i valori di sensibilità analitica dei metodi di amplificazione considerati ottenuti a partire dal DNA estratto con il metodo oggetto del TPS e quelli riportati, per gli stessi metodi, nello Standard EPPO 7/79 (2). (\*) Estrazione del DNA eseguita con CTAB 3%, secondo la procedura descritta nel Corrigendum dell'EPPO PM7/79 (2).

Parametro		Metodo amplificazione PM7/79 (2)			
		Appendix 3	Appendix 4	Appendix 5	Appendix 6
<b>Ultimo livello con il 100% di risultati positivi</b>	EPPO PM 7/79 (2)*	< 1/10	< 1/10	Da 1/100 a 1/2700	Da 1/10 a 1/300
	Risultato TPS	Da 1/100 a 1/2700	Da 1/10 a 1/900	1/2700	Da 1/10 a 1/2700
<b>Ultimo livello con almeno un risultato positivo</b>	EPPO Standard PM 7/79 (2)*	1/2700	1/2700	1/2700	1/2700
	Risultato TPS	1/2700	Da 1/10 a 1/2700	1/2700	Da 1/300 a 1/2700

### **Sensibilità diagnostica, specificità diagnostica e accuratezza**

L'accuratezza, la sensibilità e la specificità diagnostica sono stati calcolati per i quattro metodi sulla base dei risultati complessivamente ottenuti dai laboratori partecipanti. I dati utili per la determinazione dei parametri sono stati calcolati per ogni metodo a seconda di quanti laboratori e di quanti operatori hanno ripetuto l'analisi, con un minimo di 24 (metodi Appendix 4 e 5) ed un massimo di 120 (metodo Appendix 6) risultati.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 10 di 11

Indipendentemente dal metodo diagnostico utilizzato i valori dei parametri di accuratezza, specificità diagnostica e sensibilità diagnostica sono risultati concordanti con quelli attesi e pari al 100% (tabella 3).

*Tabella 3 - Numero di risultati ottenuti per ciascun metodo (TP =positivi attesi, TN= negativi attesi, FP= falsi positivi, FN= falsi negativi) e valori dei parametri di accuratezza, sensibilità e specificità diagnostica ottenuti.*

	<b>Metodo di amplificazione PM7/79 (2)</b>			
	<b>End point PCR</b>	<b>Real time PCR</b>		
	<b>Appendix 3</b>	<b>Appendix 4</b>	<b>Appendix 5</b>	<b>Appendix 6</b>
N. laboratori	4	2	2	7
Operatori	4	2	2	10
<b>Totale risultati</b>	<b>48</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>120</b>
Negativi attesi (TN)	12	6	6	30
Positivi attesi (TP)	36	18	18	90
Falsi negativi (FN)	0	0	0	0
Falsi positivi (FP)	0	0	0	0
<b>Sensibilità diagnostica (TP/TP+FN)</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>Specificità diagnostica (TN/TN+FP)</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>Accuratezza (TP+TN/TP+TN+FP+FN)</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

### **Ripetibilità**

La ripetibilità è stata calcolata utilizzando i dati ottenuti dai laboratori partecipanti su due campioni positivi forniti in triplicato, moltiplicati per il totale degli operatori che hanno eseguito ogni metodo (tabella 4).

*Tabella 4 – Valori di ripetibilità calcolati dai risultati concordanti rispetto agli attesi per ciascuno dei quattro metodi diagnostici utilizzati nel TPS.*

	<b>Metodo di amplificazione PM 7/79 (2)</b>			
	<b>End point PCR</b>	<b>Real time PCR</b>		
	<b>Appendix 3</b>	<b>Appendix 4</b>	<b>Appendix 5</b>	<b>Appendix 6</b>
Operatori	4	2	2	10
Campioni ripetuti	6	6	6	6
<b>Totale risultati concordanti</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>60</b>
<b>Ripetibilità</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

### **Riproducibilità**

La riproducibilità è stata calcolata utilizzando i dati ottenuti dai laboratori partecipanti sui 12 campioni inclusi nel lotto fornito, moltiplicato per il totale degli operatori che hanno eseguito ogni metodo (tabella 5).

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n. 68	<b>Metodi diagnostici</b>
Metodo di estrazione del DNA basato sull'uso di kit commerciale per la diagnosi di FD	Pag. 11 di 11

*Tabella 5 – Valori di riproducibilità calcolati dai risultati concordanti rispetto agli attesi ottenuti per ciascuno dei quattro metodi diagnostici utilizzati nel TPS.*

	<b>Metodo di amplificazione PM 7/79 (2)</b>			
	<b>End point PCR</b>	<b>Real time PCR</b>		
	<b>Appendix 3</b>	<b>Appendix 4</b>	<b>Appendix 5</b>	<b>Appendix 6</b>
Operatori	4	2	2	10
Campioni ripetuti	12	12	12	12
<b>Totale risultati concordanti</b>	<b>48</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>120</b>
<b>Riproducibilità</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>