



Netherlands Food and Consumer  
Product Safety Authority  
*Ministry of Economic Affairs*



## Phyto-flexscope at the National Reference Centre

New plant health rules in the EU  
need a different approach of  
validating tests for regulated  
organisms

Saskia Bosman, Christel de Krom, Loes den  
Nijs, Annelien Roenhorst

National Reference Centre  
National Plant Protection Organization  
The Netherlands



# Why a 'new' flexible scope in plant health

New EU phytosanitary rules (14-12-2019)

- Official Controls Regulation 2017/625
- Plant Health Regulation 2016/2031

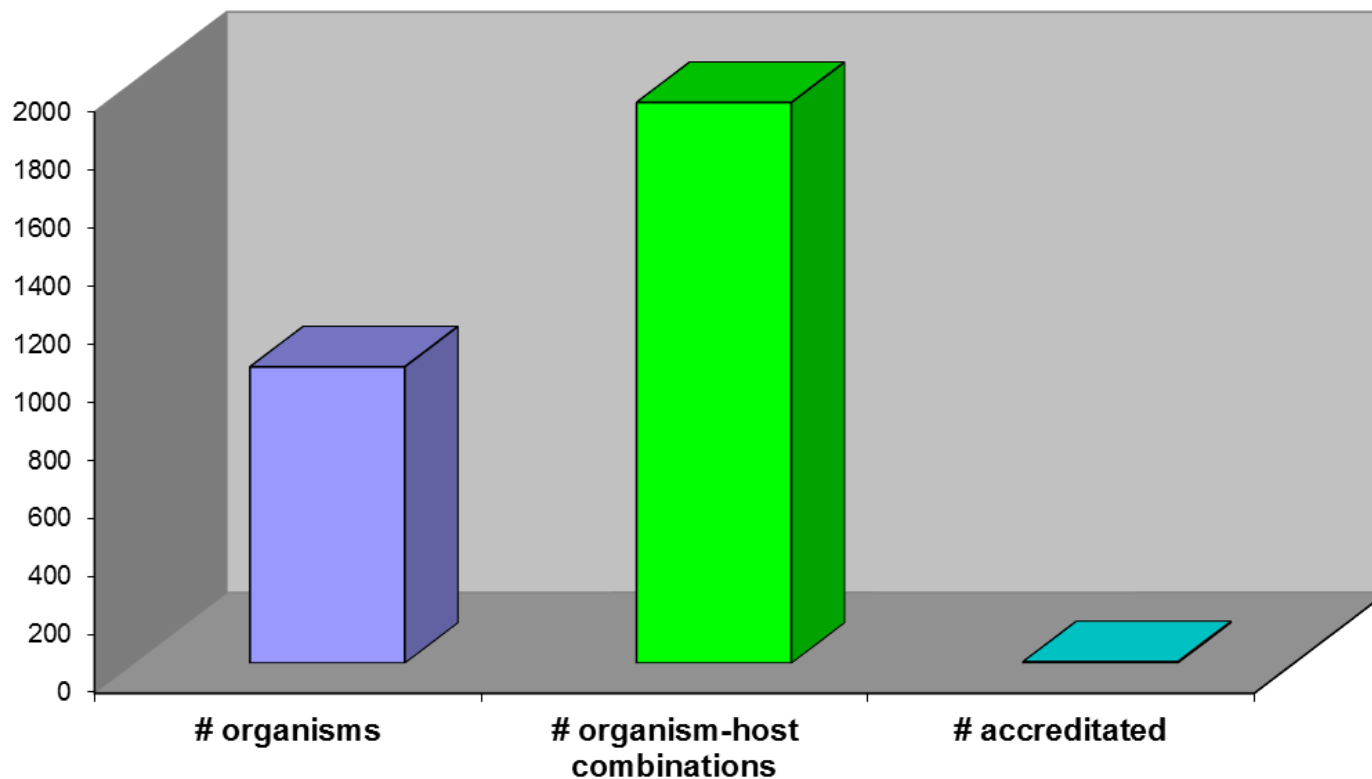
Implications

- All official tests under accreditation per 29-4-2022



# Why a 'new' flexible scope in plant health

Diagnostic results 2014



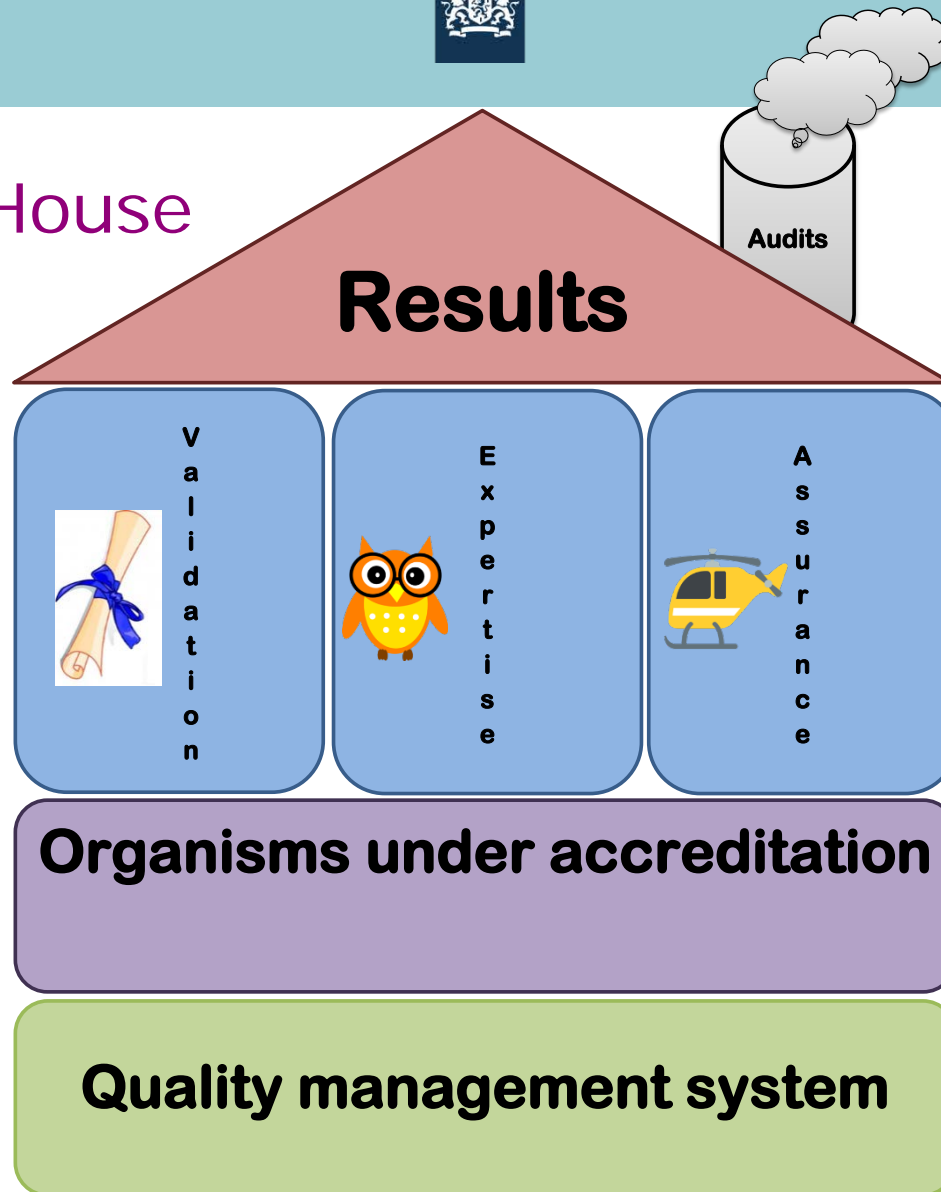


## Why a 'new' flexible scope in plant health

- Many organism-matrix (host) combination
  - Variable each year
- Fixed and flexible scope will not allow accreditation of all official tests
- Discussion with national Accreditation Body for phyto-flexscope



# PhytoFlex House NRC





# Key principles of PhytoFlex NRC



## Validation

ISO 17025 (2017):  
7.2.2.1.C  
7.2.1.5 & 6 & 7



## Expertise

ISO 17025 (2017):  
6.2.5 & 6



## Quality Assurance

ISO 17025 (2017):  
7.7.1 & 2 & 3



**Targeted samples**  
symptomatic and  
asymptomatic samples



**Non-targeted samples**  
symptomatic samples

Initiate prescribed test(s) or  
key(s)

Assessment of characteristics  
and selection of test(s) or key(s)

Analysis

Interpretation results

Identification/confirmation

Further research

Report





## Targeted samples

## Non-targeted samples

Initiate prescribed test(s) or key(s)

Assessment of characteristics and selection of test(s) or key(s)

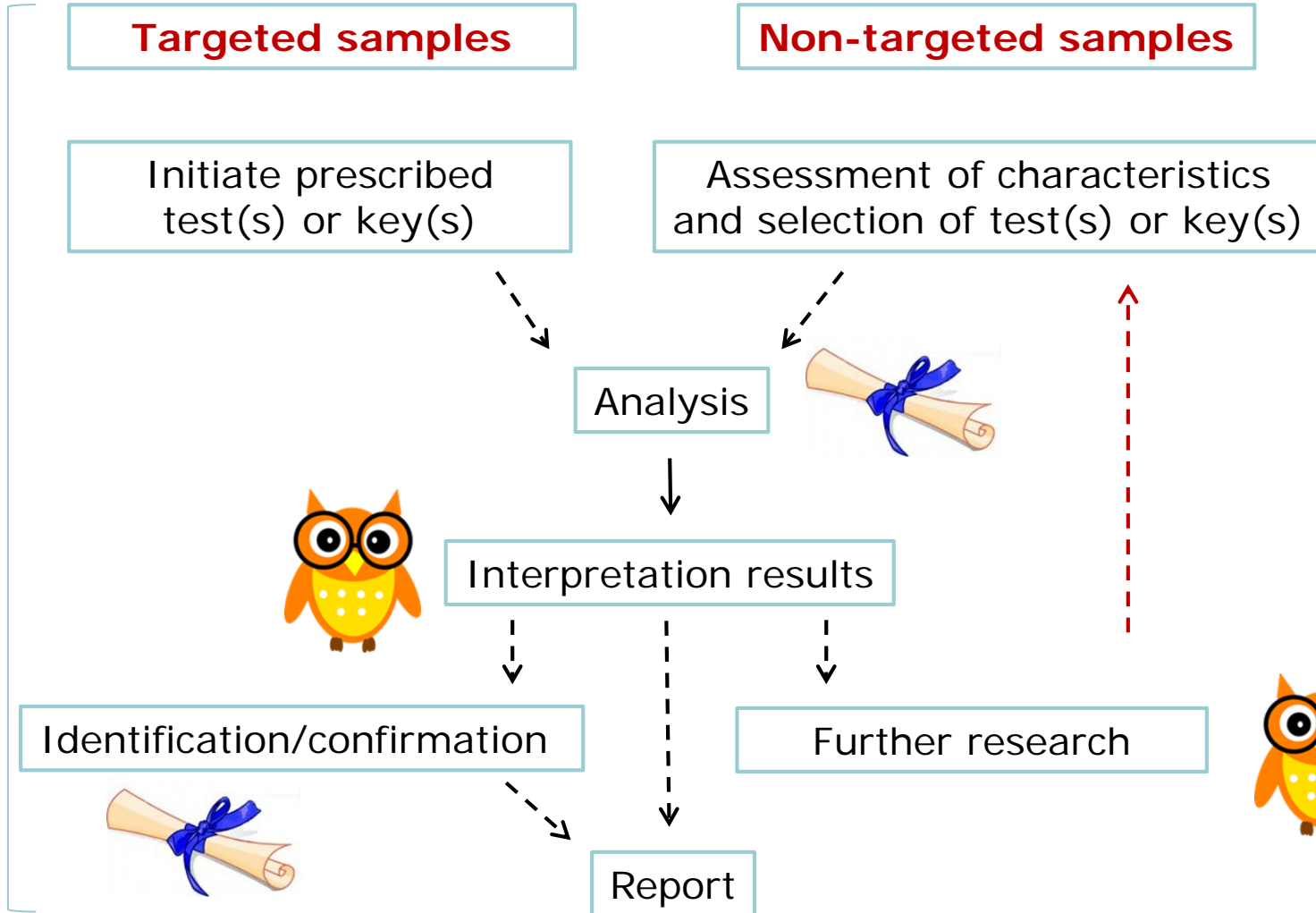
Analysis

Interpretation results

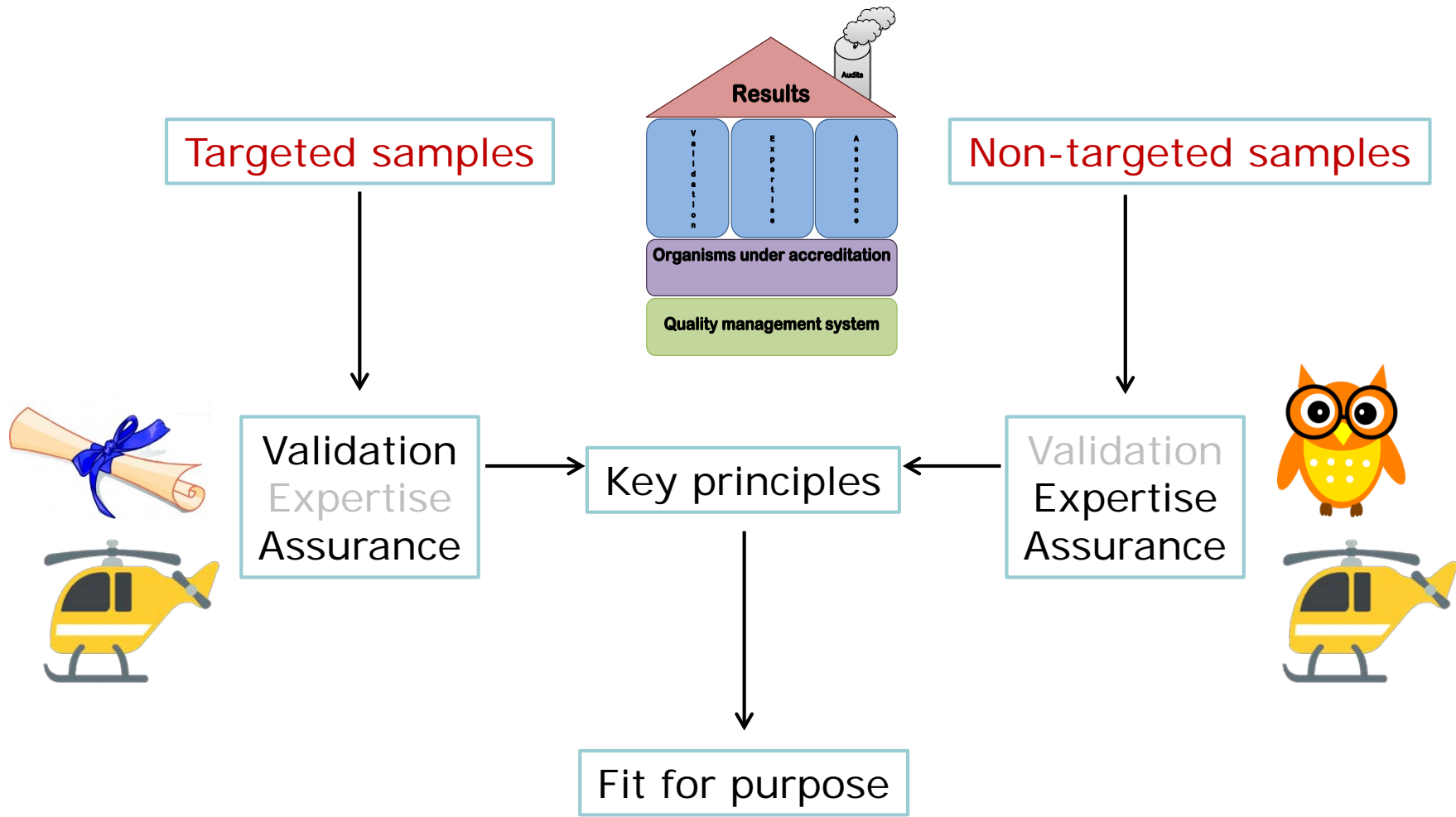
Identification/confirmation

Further research

Report









# Validation

## Performance characteristics

- Analytical sensitivity
- Analytical specificity
  - Inclusivity (intraspecies variability)
  - Exclusivity (interspecies variability)
- Selectivity (matrix effects)
- Repeatability
- Reproducibility





## Validation (risk based)



Determine relevant performance characteristics (fit for purpose)

	<b>Detection</b>	<b>Identification/ Confirmation</b>
<b>Aim</b>	Prevent false negatives	Prevent false positives
<b>Analytical sensitivity</b>	Sensitivity sufficient?	Covered by detection
<b>Analytical specificity</b>	Detect all variants of target organism (inclusivity)	Distinguish from closest relatives (exclusivity)
<b>Selectivity</b>	Inhibition?	Background reaction?
<b>Repeatability &amp; reproducibility</b>	Method level (transferable skills)	Method level (transferable skills)



## Expertise

Competences of staff  Competences of laboratory

- Safeguard data and experiences  
(images, slides, literature, test results, sequence data)
- Make knowledge accessible via databases





# Virology: database of bioassay results

Nummer	Genus	Diagnose	qui lok	qui syst	bent lok	bent syst	P1 lok	P1 syst
4266025	Orthospovirus	INSV	+	-	-	-	+	-
3453101	Orthospovirus	INSV	-	-	+	+	+	-
3453080	Orthospovirus	INSV	-	-	+	+	+	-
3038637	Orthospovirus	INSV	-	-	+	+	+	+
4328652	Cucumovirus	CMV	-	-	-	-	-	-
3984754	Cucumovirus	CMV					-	+
3692356	Polerovirus	BWYV	+	-			+	+
3468653	Polerovirus	BWYV	+	-			+	-
5628817	Cucumovirus	CMV	+	-	-	+	+	+
3468864	Cucumovirus	CMV			-	-	-	-
3264888	Cucumovirus	CMV	+	-			+	+
4308581	Cucumovirus	CMV	-	-	-	+	-	+
3614761-1	Cucumovirus	CMV	+	-	-	+	-	+
6067708	Cucumovirus	CMV	+	-	-	+	-	+
6934066	Cucumovirus	CMV	+	-	+	-	+	+
4597289	Orthospovirus	INSV	+	-	+	+	+	+
4452864	Orthospovirus	INSV	+	-	+	-	+	-



## Nematology: database of nematode and hosts

Gewas	Ned. Naam Gewas	Nematode	Toelichting
Cymbidium	Orchidee	Pratylenchus scribneri	Zie bij algemeen.
Cyperus	Cypergras	Meloidogyne	
Cytisus	Brem	Meloidogyne hapla	Zie bij algemeen.
Cytisus	Brem	Pratylenchus penetrans	Zie bij algemeen.
Dactylis glomerata	Kropaar	Heterodera bifenestra	Wel waardplant; schaderelatie niet onderzocht. Zie ook bij algemeen.
Dactylis glomerata	Kropaar	Heterodera mani	Wel waardplant; schaderelatie niet onderzocht. Zie ook bij algemeen.
Dactylis glomerata	Kropaar	Meloidogyne naasi	Zie bij algemeen.
Dactylis glomerata	Kropaar	Paratrichodorus teres	Zie bij algemeen.
Dahlia	Dahlia	Aphelenchoides ritzemabosi	Zie bij algemeen.



# Quality assurance within PhytoFlex scope

## 1<sup>st</sup> line control

- positive and negative control at test level
- second morphological identification



## 2<sup>nd</sup> and/or 3<sup>rd</sup> line control

Not feasible at test level, because of potentially unlimited number of organism-matrix combinations

- Multi-annual assurance plan with annually
  - › rotation of supergroups (family, genus)
  - › each method (ELISA, PCR)
  - › blind samples at process level (non-targeted samples)



# Quality assurance within PhytoFlex scope

	Microbiological test	Morphological test	Diagnostic process
1st	+/- controls	slide/voucher key	2nd test 2nd specialist
2nd	blind sample in test	2nd test 2nd specialist blind sample	blind sample throughout process
3rd	Proficiency test	Proficiency test Contra expertise	Proficiency test







# Documentation of adding organisms (tests) to scope based on risk analysis at process level

titel <b>Aanvragen aanpassing overzicht organismen onder accreditatie</b>		
code	F-302-000-001	versie 03   ingangsdatum 26-09-2016   pag. 1 van 3
versie	datum	toelichting
01	13-05-2015	Verschil met evt. vorige versie kort omschrijven
02	29-07-2015	Interne audit toegevoegd
03	26-09-2016	Huidige en nieuwe versie overzicht organismen toegevoegd Akkoord aanvrager toegevoegd Reviewer tekent 1x voor alle onderdelen Teesleider en afdelingshoofd apart vermeld

Code voor archivering: POSPL\_20170424

## In te vullen door Aanvrager

Vakgebied: Virologie  
Aanvrager: Ko Verhoeven (VIR)  
Reviewer: Bart van de Vossenbergh (Molbio)



## Aanpassing

1 Aanpassen scope (goedkeuring RvA vereist)  
 Nieuwe onderzoeksmethode:  
 Nieuw organismegroep:

2 Toevoeging aan lijst (goedkeuring RvA niet vereist)  
 Toets(en): PCR RPCR SEQ *2-5-17*  
 Organisme(n): naam: *Chrysanthemum stunt viroid, Tomato apical stunt viroid, Tomato planta macho viroid*

*Noot: Potato spindle tuber viroid en Tomato chlorotic dwarf viroid zijn in oktober 2015 toegevoegd. Deze worden ook op dit formulier toegevoegd, zodat één formulier bijgehouden kan worden voor de organismegroep passiviroïden.*

Code(s) voor register:

POSPL\_20170424\_PCR  
POSPL\_20170424\_RPCR  
POSPL\_20170424\_SEQ

## Beoordeling:

A) Validatiedossier  
Verwijzing validatierapport (movann, sleutel etc.):  
Korte motivatie bij validatie door aanvrager:

Bron: *NVWA. Zonder stempel is dit een ongeregistreerde kopie. Een actuele versie is digitaal beschikbaar.*

titel <b>Aanvragen aanpassing overzicht organismen onder accreditatie</b>		
code	F-302-000-001	versie 03   ingangsdatum 26-09-2016   pag. 2 van 3
POSPL_20170424_PCR: Validatierapporten PCR beschikbaar: 2010.molbio.032, 2010.molbio.033 en 2011.molbio.006 POSPL_20170424_RPCR: Validatierapporten real-time PCR beschikbaar: 2009.molbio.013, 2010.molbio.015 en 2013.molbio.006.04 POSPL_20170424_SEQ: Validatie volgens 2013.molbio.005 De onderzoeksmethode PCR-Sequencing is voor meerdere vakgebieden (oa Entomologie, invasieve planten, Virologie, CMV en Mycologie) tegelijk gevalideerd tijdens onderzoek 2013molbio005.		

*Noot: voor het toevoegen van deze passiviroïden zijn geen nieuwe validatierapporten toegevoegd t.o.v. de vorige aanvraag voor Potato spindle tuber viroid en Tomato chlorotic dwarf viroid in 2015. Deze rapporten zijn al een keer beoordeeld.*

B) (Meerjaren)borgingsplan:

Is (Meerjaren)borgingsplan aangepast?:  ja  nee

Korte motivatie over borging door aanvrager:

Op het gebied van interne borging (2e lijns) en proficiency testing (3e lijns) wordt binnen de flexscope gewerkt op het niveau van onderzoeksmethode. Door het generieke karakter van de onderzoeksmethoden en het feit dat de borgingswijzen gericht zijn op prestatie van het laboratorium en de medewerkers kan borging op het niveau van de onderzoeksmethode volstaan.

Per vakgebied worden de belangrijkste organismegroepen meegenomen in de 2<sup>e</sup> lijns en 3<sup>e</sup> lijns borging. Het borgingsplan is aangepast, maar de organismegroep viroïden was al voldoende gedekt in het meerjarenborgingsplan. Dus hiervoor zijn geen aanpassingen doorgevoerd.

C) Werkinstructie

Relevante werkinstructie(s):

I-MOL-061 RNA extractie met behulp van de RNeasy plant mini kit (Qiagen)

I-MOL-071 Moleculaire detectie en identificatie van viroïden

Eventuele opmerking bij werkinstructies door aanvrager:

Nieuw overzicht 'Organismen onder accreditatie'

Goed te keuren versie:

De nieuwe versie is toegevoegd aan dit formulier

Akkoord aanvrager:

Datum beoordeling: 24-4-2017



Bron: *NVWA. Zonder stempel is dit een ongeregistreerde kopie. Een actuele versie is digitaal beschikbaar.*

titel <b>Aanvragen aanpassing overzicht organismen onder accreditatie</b>		
code	F-302-000-001	versie 03   ingangsdatum 26-09-2016   pag. 3 van 3

Akkoord reviewer

Datum beoordeling: *25-4-17*

Paraf:

Goedkeuring door afdelingshoofd of teamleider

Datum: *25-4-17*

Paraf:

Controle door kwaliteitsmedewerker:

Interne audit

niet van toepassing

uitgevoerd

Melding aan RvA

niet van toepassing

uitgevoerd

Publicatie op werkwijzer:

uitgevoerd

Datum: *3-7-17*

Versie register: *5*

Afgerond

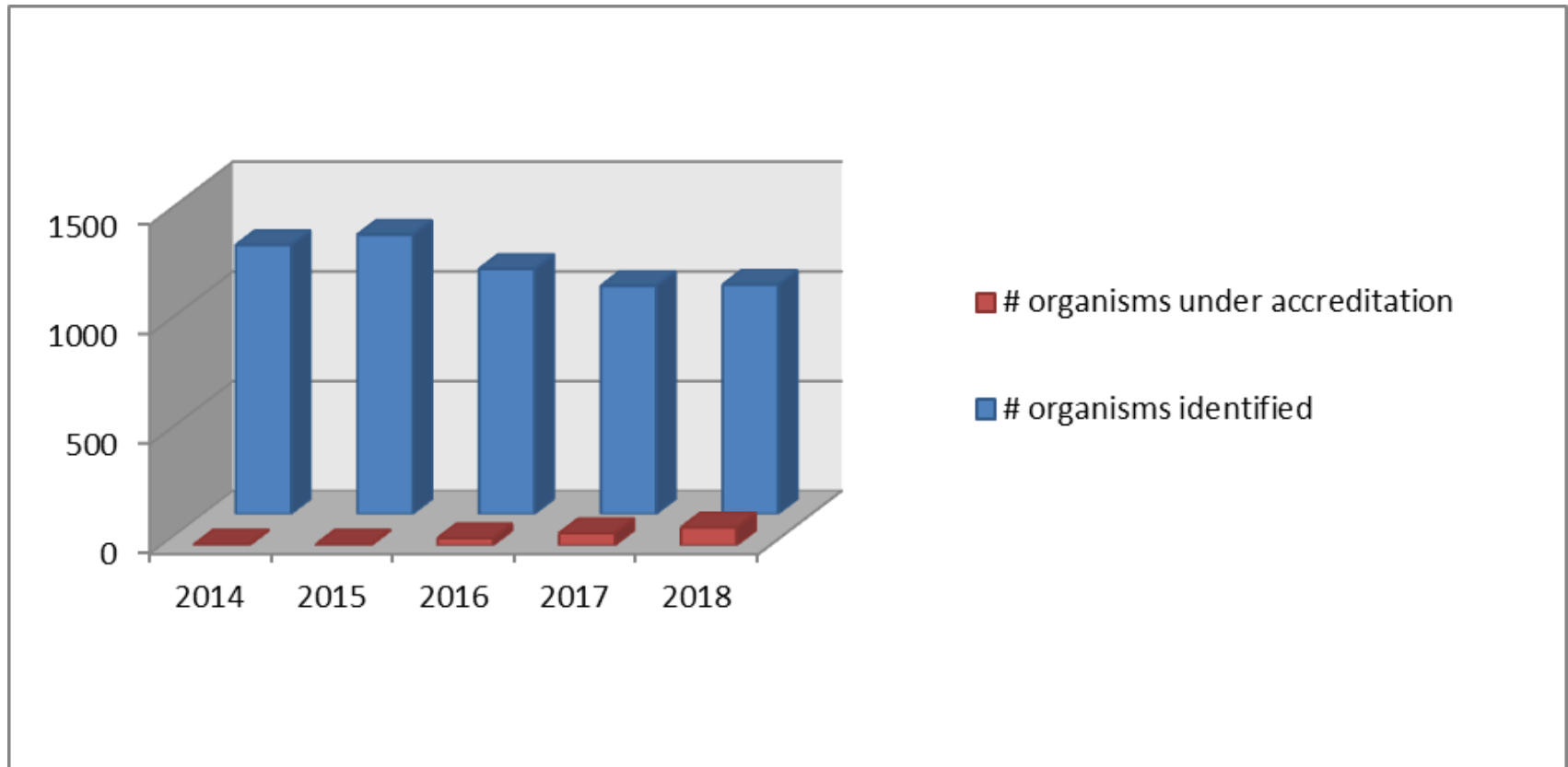
Datum: *25-7-17*

Paraf kwaliteitsmedewerker:





## Organisms identified at NRC (2014 – 2018)





## The PhytoFlex potentially

- Enables accreditation of unlimited number of organism – matrix (host) combinations by risk-based validation supported by expertise and quality assurance
- Fits within risk-based approach of ISO 17025 (2017) - expected to be accepted by the Dutch Accreditation Board this year
- Allows meeting the demands of the new phytosanitary rules that apply from 14 December 2019



## Phyto-flex scope: experiences and challenges

- Experiences:
  - Concept is complex – understanding difficult
  - Alertness on ‘correct use’ of tests required
  - Development of concept is ongoing process
- Challenges
  - Validation is still timely
  - Lack of reference materials
  - Focus further development: ‘fit for purpose’