



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

Introduzione

Nel corso del 2021 il laboratorio fitopatologico del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana (di seguito Lab) con sede a Pistoia in via Ciliegiole 99 c/o GEA, nonostante la pandemia da COVID19 che ha continuato ad imperversare a livello nazionale e mondiale, ha effettuato le analisi, prove e diagnosi ordinarie previste nel piano annuale di attività del Servizio oltre a dover gestire un considerevole numero aggiuntivo di campioni relativamente alle attività di indagine in aree indenni e in area delimitata per *Xylella fastidiosa* (a seguito del ritrovamento avvenuto nel mese di novembre 2018). Nel corso del 2021 il laboratorio ha subito una interruzione delle sue attività per circa tre mesi: da aprile a inizio luglio 2021, a causa dei lavori di ristrutturazione dei locali di proprietà di GEA a destinati al laboratorio SFR in affitto. Anche quest'anno vi è stato un notevole carico di lavoro appesantito ulteriormente da tutte le attività correlate alla preparazione del laboratorio alla richiesta di accreditamento ISO/IEC 17025, resa obbligatoria dalla normativa comunitaria vigente (Reg. UE 2017/625). Ulteriore difficoltà si sono originate a fine anno (inizio novembre) in quanto è venuto a mancare nell'aiuto materiale e operativo un borsista dell'Università di Pisa che ha vinto un concorso in Regione Toscana ed è stato assegnato ad altra Direzione. Contestualmente a ciò una collega è risultata in stato interessante per cui il suo accesso ai locali di laboratorio è stato interdetto per ovvi problemi di sicurezza sanitaria. Alla luce di tutto ciò l'ultima parte dell'anno, che è di solito quella maggiormente pesante dal punto di vista del carico di lavoro del laboratorio, ha visto come unica figura operativa il responsabile di laboratorio, ovvero lo scrivente. Questo ha determinato una doppia difficoltà: da una parte far fronte e rispondere secondo delle tempistiche accettabili alla conclusione delle attività analitiche e relativa refertazione, dall'altra a concludere la parte di validazione delle prove di cui si vuole chiedere l'accreditamento. Nonostante queste difficoltà il laboratorio è riuscito a completare sia le une sia le altre entro la fine dell'anno, lasciando solo dei residui da completare entro il mese di gennaio 2022. Ricordiamo che l'emergenza *Xylella fastidiosa* del Monte Argentario (GR), anche quest'anno l'ha fatta da padrone per i numeri complessivi coinvolti nelle attività di laboratorio.

Nel corso del 2022 non è venuta meno la collaborazione e la sinergia di tutto il personale del Servizio Fitosanitario Regionale, oltre all'attivazione di collaborazioni con personale esterno che ha provveduto ad ottimizzare parte delle lavorazioni propedeutiche alle analisi (preparazione delle aliquote dai campioni vegetali).

La LIMS, ovvero il software gestionale delle attività del laboratorio e all'ottimizzazione dei processi estrattivi, è stato ulteriormente implementato, sfruttando al massimo le potenzialità delle attrezzature del laboratorio.

Attività complessive svolte dal laboratorio SFR nel corso del 2021

Andando ad esaminare le diverse attività del laboratorio SFR nel corso del 2021, possiamo fare una serie di distinzioni, al fine di comprendere meglio le differenziazioni che vanno a caratterizzare una attività complessa come quella di un laboratorio in ambito fitosanitario.



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

Una prima caratterizzazione può essere evidenziata considerando il numero/tipologia di richieste/verbali di prelievo con il relativo numero di campioni e analisi effettuate complessivamente nel corso del 2021.

Parametro	Generale	% Totale
Richieste	3.668	
Campioni	11.627	
Patogeni	155	
Metodi	187	
Specie	209	
Prove di amplificabilità	12.265	43,1
Analisi	16.200	56,9
Analisi totali	28.465	

A fronte di 3.668 richieste o verbali di campionamento/prelievo, sono stati prelevati 11.627 campioni per un numero complessivo di 16.200 analisi effettuate. A tali analisi vanno aggiunte le verifiche di amplificabilità o prove di amplificabilità sugli estratti di acidi nucleici (DNA) o cDNA (RNA) per la valutazione della integrità e qualità degli acidi nucleici estratti al fine delle analisi biomolecolari successive specifiche per i vari target (ON). Si tratta di analisi di tipo tecnico che vanno comunque conteggiate al fine di una valutazione complessiva delle attività svolte dal Lab.

Per cui, considerando anche quest'ultimo tipo di attività analitica, complessivamente sono state effettuate 28.465 analisi nel corso del 2021 da parte del Lab.

Altri aspetti importanti da prendere in considerazione sono il numero di ON che sono stati indagati nel corso del 2021, pari a 155 oltre che le tecniche/protocolli biomolecolari utilizzate/i risultanti 187 su una tipologia di campioni vegetali riassumibili in 209 specie vegetali complessivamente oggetto di indagine.

La tipologia di utenza relativa alle attività analitiche svolte.

Con utenza, in questo caso si intende il destinatario del campionamento effettuato, ovvero se si tratta di campioni prelevati in vivai, garden, importatori, a livello territoriale, ecc.

Tipo Utente	Generale	% Totale
Autorizzati	927	81,7
Non Autorizzati	85	7,5
Importatori	3	0,3
Altri Soggetti	1	0,1
Territorio	118	10,4

Come si può denotare, la maggior parte delle attività ha riguardato il mondo vivaistico (autorizzati). A livello di risultati analitici ottenuti, vedasi i dati in tabella. Più del 5% dei campioni pervenuti in lab è risultato positivo al target richiesto e oggetto di indagine.

Risultati	Generale	% Totale
Risultati Positivi	825	5,1
Risultati Negativi	15172	93,7
Risultati Indeterminati	203	1,3



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

Quest'anno, in una ottica di qualità/miglioramento continuo, sono stati presi in considerazione anche tutti i risultati indeterminati o "nd" (non determinabili). Si tratta di tutte quelle non conformità relative alla matrice di partenza (deteriorata, secca, ecc.), oppure a difficoltà estrattive con verifiche di amplificabilità che non hanno dato esito valido, o ancora ad errori in sede di prelievo campioni e relativa assegnazione dei target (ON) di cui richiedere le verifiche analitiche.

Per fortuna si tratta di valori residuali rispetto ai totali. Costituiscono, comunque degli indicatori a livello qualitativo del servizio svolto sia livello di analisi sia a livello di prelievo in campo.

Volendo fare una differenziazione, anche in funzione del tipo di tecnica/ metodologia/protocollo utilizzata/o nel corso dell'anno per far fronte alla complessità delle analisi richieste si evince che:

Tecnica Analisi			
Parametro	Generale	% Totale	
PCR real-time SYBR Green	1952	13,3	
PCR real-time Probe	12451	84,5	
Amplificazione isotermica LAMP	87	0,6	
PCR end point	223	1,5	
Barcoding	14	0,1	
Analisi sierologiche (ELISA)	0	0	

Da tali dati si denota che quasi l'85% di tutte le attività sono svolte tramite tecniche di Real Time PCR o qPCR con sonde TaqMan o in SybrGreen. Si tratta di tecniche complesse ma, allo stesso tempo, sensibili, specifiche e accurate per garantire un risultato analitico affidabile.

Analizzando i campioni pervenuti in lab in relazione alla specie vegetale oltre che per i vari ON di cui è stata richiesta o effettuata la verifica analitica si possono avere le seguenti rappresentazioni grafiche che danno un quadro di insieme esaustivo.

L'olivo e la vite sono le specie maggiormente rappresentate, anche in considerazione della peculiarità che tali specie assumono a livello regionale, con prodotti di eccellenza in tal senso. I numeri così alti sono legati alle attività di monitoraggio territoriale e vivaistico ai sensi della normativa specifica per la "Flavescenza Dorata" (*Phytoplasma vitis*_EPPO), della certificazione vivaistica della vite a livello di vivai viticoli e per quanto riguarda l'olivo, l'intenso campionamento effettuato per il monitoraggio *Xylella fastidiosa* in aree indenni ed in area delimitata.

Le attività che hanno monopolizzato l'attenzione ed il carico di lavoro nel corso del 2021, come si vede dal grafico corrispondente hanno riguardato il monitoraggio della *Xylella fastidiosa* sia in aree indenni sia in area delimitata.

Tipologia	Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
batteri	<i>Xylella fastidiosa</i>	8200	8084	114	2
fitoplasmi	<i>Candidatus phytoplasma vitis</i>	1700	1274	426	0
virus	Plum pox virus (PPV)	594	571	23	0
virus	Arabis Mosaic virus (ArMV)	410	410	0	0
virus	Grapevine fan leaf virus (GFLV)	301	301	0	0
virus	Grapevine leaf roll associated virus - 1 (GLRaV-1)	301	299	2	0
virus	Grapevine leaf roll associated virus - 3 (GLRaV-3)	301	282	19	0



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

Tipologia	Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
virus	Grapveine virus A (GVA)	301	290	11	0
fitoplasm	Candidatus phytoplasma solani	289	263	26	0
virus	Grapevine fleck virus (GFkV)	211	211	0	0
batteri	Erwinia amylovora	196	133	57	6
virus	Citrus Tristeza Virus (CTV)	171	140	31	0
batteri	Candidatus liberibacter americanum	126	126	0	0
batteri	Candidatus liberibacter africanus	123	123	0	0
batteri	Candidatus liberibacter asiaticus	123	123	0	0
virus	Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)	107	105	0	2
virus	Olive latent Virus - 1 (OLV-1)	106	106	0	0
virus	Olive latent Virus - 2 (OLV-2)	106	106	0	0
virus	Olive ring spot virus (OLRSV)	106	106	0	0
virus	Cherry leaf roll virus (CLRV)	104	104	0	0
virus	Cucumber Mosaic Virus (CMV)	104	104	0	0
virus	Strawberry latent ring spot virus (SLRSV)	104	103	1	0
virus	Tobacco necrosis virus (TNV)	104	104	0	0
virus	Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	104	96	8	0
funghi	Verticillium spp	104	104	0	0
virus	Tomato ring spot virus (ToRSV)	86	86	0	0
batteri	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	81	81	0	0
virus	American plum line pattern virus (APLPV)	81	81	0	0
virus	Peach rosette mosaic virus (PRMV)	79	79	0	0
virus	Cherry rasp leaf virus	78	29	0	49
virus	Tomato leaf curl New Daehli Virus (ToLNDV)	69	66	0	3
virus	Peach mosaic virus	67	29	0	38
virus	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	57	57	0	0
virus	Tobacco ringspot virus	56	56	0	0
batteri	Ralstonia pseudosolanacearum	55	55	0	0
funghi	Plenodomus tracheiphilus	52	30	22	0
viroidi	Potato spindle tuber viroid (PSTVd)	50	35	15	0
batteri	Xanthomonas euvesicatoria	47	42	5	0
batteri	Xylophilus ampelinus	42	42	0	0
insetti	Daktulosphaira vitifoliae	42	18	0	24
funghi	Elsinoe australis	40	40	0	0
funghi	Elsinoe fawcettii	38	38	0	0
funghi	Ceratocystis platani	37	27	8	2

La distinzione delle analisi in funzione degli ON indagati evidenzia come le analisi per *Xylella fastidiosa* abbiano inciso profondamente sulla totalità delle attività del lab.

Si tratta di numeri notevoli al pari dello scorso anno anche se con intensità minore a causa della pandemia, dei blocchi lavorativi imposti per la salvaguardia della salute pubblica e dai lavori di ristrutturazione del laboratorio che ne ha determinato la chiusura per tre mesi.

È da notare anche quest'anno il considerevole lavoro svolto da parte di tutti coloro che, partecipando alle attività di laboratorio (anche parzialmente) hanno contribuito a tale raggiungimento.

Il numero e la tipologia dei campioni il cui esito è "indeterminato" è legato sia alla tipologia di campione non conforme per specie, organismo nocivo, degradazione/marciumi/seccumi et c.; sia alla indeterminatezza vera e propria delle attività analitiche con risultati non pienamente univoci o



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

border line. Si è potuto notare come la maggior parte dei campioni classificato come indeterminati o “nd” è stato ritenuto tale a causa di errori di assegnazione di analisi per organismi nocivi di cui il laboratorio non era in grado di poter effettuare le analisi.

La denominazione sia degli ON sia delle specie vegetali avviene a livello di software gestionale del lab con i codici EPPO, di cui si riportano. In allegato 1 – tabelle 1 e 2 sono riportati tutte le denominazioni ufficiali con i relativi codici EPPO.

Graficamente, nel complesso, i prelievi relativi alla totalità dei campioni pervenuti in laboratorio nel corso del 2021, hanno avuto, graficamente, la seguente distribuzione territoriale.

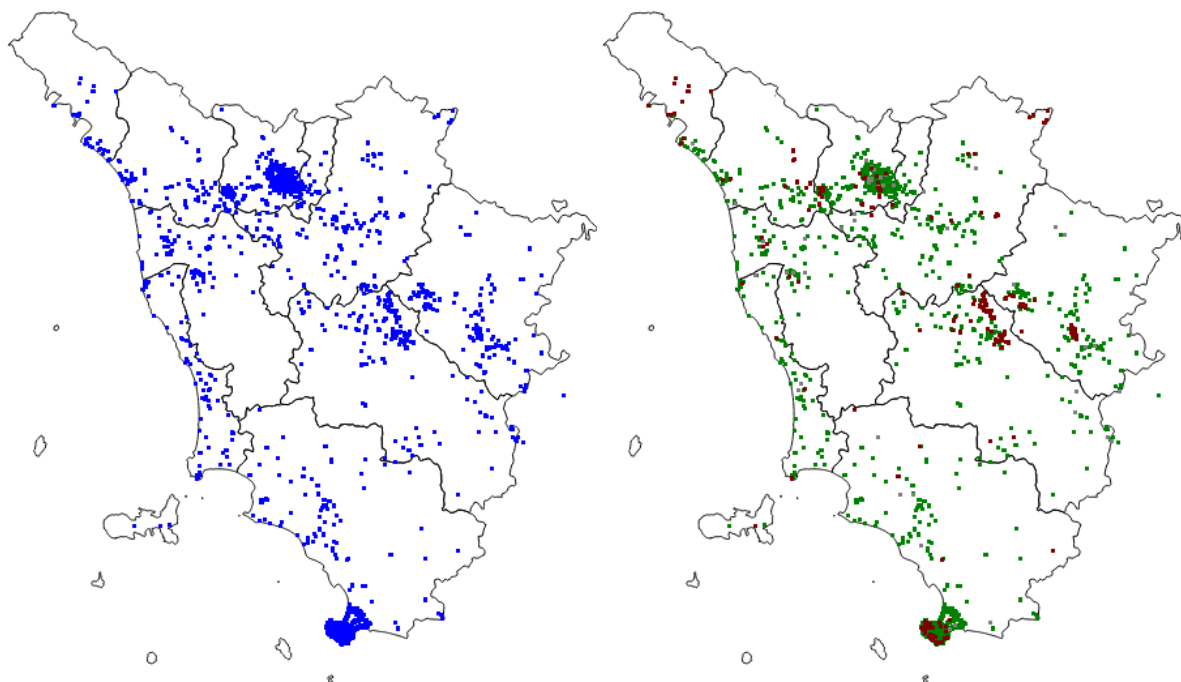


Fig. 7 - distribuzione territoriale dei campioni prelevati (blu) e dei relativi risultati (verde = negativo, rosso = positivo). Come si può osservare dalla distribuzione dei campioni prelevati, sia a livello territoriale, sia a livello di risultati, le aree maggiormente rappresentate sono costituite dal polo vivaistico della provincia di Pistoia e dalla zona del focolaio di *Xylella fastidiosa* del Monte Argentario (GR). Analizzando il carico di lavoro mensile possiamo schematizzare in questo modo la distribuzione del carico e intensità lavorativa del laboratorio SFR nel corso del 2021.

Mese	Richieste	Rapporti	Campioni	Analisi	Analisi Totali
Gennaio	64	524	603	1395	1998
Febbraio	21	15	141	181	322
Marzo	36	68	194	1861	2055
Aprile	17	30	130	104	234
Maggio	78	61	344	266	610
Giugno	367	143	1508	648	2156
Luglio	222	362	1076	1674	2750
Agosto	100	120	649	1386	2035
Settembre	499	244	2558	2337	4895
Ottobre	413	332	1681	2043	3724
Novembre	1143	700	1347	2585	3932



Laboratorio fitopatologico – Servizio Fitosanitario Regione Toscana

Dicembre	708	1069	1396	1720	3116
----------	-----	------	------	------	------

Dalla tabella si desume che, mediamente, per il 50% di tutte le analisi effettuate viene emesso il relativo referto diagnostico entro 22 giorni. Per il 60% delle analisi entro 27 giorni e così via, fino ad arrivare al valore medio di 150 giorni per emettere il referto analitico per il 100% delle analisi.

Si tratta di dati importanti che denotano una notevole velocità media di risposta per il 50% delle analisi ma con tempi molto lunghi per un 10% di analisi da parte del lab. Tali valori si spiegano dal fatto che alcune richieste hanno riguardato monitoraggi che hanno avuto un lungo decorso (anche 2-3 mesi) con relativa refertazione cumulata in fondo all'anno. Facendo la media, allora, i valori tendono ad allungarsi.

Conclusioni

In considerazione di quanto esposto, è evidente che il carico di lavoro dell'anno appena trascorso per il laboratorio è stato notevole anche alla luce della continuazione dell'emergenza sanitaria venutasi ad originare (COVID19), oltre che dei lavori di ristrutturazione del laboratorio che hanno fatto slittare la maggior parte dei controlli e monitoraggi sul territorio nella seconda parte dell'anno. Il lavoro legato all'adeguamento del laboratorio ai requisiti richiesti dalla norma ISO/IEC 17025 ha determinato un ulteriore appesantimento delle attività di laboratorio.

Nel complesso, è da considerare che le attività del laboratorio risultano a consuntivo in diminuzione nella maggior parte degli ambiti di competenza.

I risultati emersi, anche in relazione al carico di lavoro di cui sopra, sono stati possibili grazie alla collaborazione e alla sinergia di tutto il personale SFR, all'attivazione di collaborazioni con personale esterno che ha provveduto ad ottimizzare di parte delle lavorazioni propedeutiche alle analisi (preparazione delle aliquote dai campioni vegetali), all'implementazione del software gestionale delle attività del laboratorio, all'ottimizzazione dei processi estrattivi sfruttando al massimo le potenzialità delle attrezzature del laboratorio.

L'anno appena trascorso ha comunque fatto emergere alcune criticità per il laboratorio che sarà opportuno prevedere di affrontare nel corso dei prossimi anni investendo risorse in particolare per il miglioramento dei processi di analisi, delle attrezzature, delle infrastrutture e del personale per eseguire tali compiti nel rispetto degli standard sempre più elevati richiesti dal Reg. 625/2017.