

# La gestione della qualità fitosanitaria delle produzioni vegetali con le tecniche diagnostiche rapide da campo

**Kit diagnostici rapidi, pur non essendo un'alternativa ai test di laboratorio, permettono di agire tempestivamente in campo e di offrire maggiore competitività alle imprese agricole**

ENRICO ROVERE

## INTRODUZIONE

L'agricoltura nel volgere di pochi anni è stata partecipe di trasformazioni, dibattiti, contestazioni ed evoluzioni tali da stravolgere la stessa "missione" delle aziende. L'incredibile sogno delle biotecnologie applicate alle produzioni vegetali, tecnologia controversa, politicamente discussa e perciò confinata nel mondo della ricerca almeno in Europa, l'apertura della Comunità Europea a nuovi Stati membri all'Est, la globalizzazione dei commerci e degli scambi, l'ingresso di tanti e nuovi potenti concorrenti sul mercato, i nuovi vincoli sugli aiuti tradizionali all'agricoltura e la necessità di ridurre scarti e residui in produzione secondo il fine di ridurre l'impatto ambientale anche delle produzioni vegetali per uno sviluppo sostenibile obbligano i produttori a riflettere sulle scelte future. Il tema fondamentale è che tipo di evoluzione l'azienda agricola dovrà assumere per continuare a produrre. La lamentela corrente della capacità degli altri concorrenti di produrre a prezzi più bassi non può che trovare

Micropoli, Via Magellano, 4/6 20090 Cesano Boscone (Mi)

**Tabella 1 - Sintesi della filosofia di controllo dei punti critici di processo HACCP.**  
*Table 1 - Concepts of the philosophy HACCP.*

Il sistema HACCP	conduce ad un approccio sistematico di valutazione del rischio nel processo produttivo
	aumenta l'efficienza del controllo della contaminazione microbica
L'ispezione microbiologica tradizionale richiede tempi lunghi, spesso non è sufficiente per identificare le cause	

da noi una risposta in un diverso modo di produrre: parificarsi nelle condizioni e negli standard dei Paesi in via di sviluppo non è una politica saggia. Uno schema di risposta a questa serie di problematiche è rappresentato nella fraseologia corrente dalla ricerca della "qualità", termine che è diventato come un totem che risolve tutte le situazioni. Ma la risposta è più articolata dato che "qualità" delle produzioni vegetali è sinonimo di un risultato collegato ad un miglioramento delle procedure operative attuate nel processo produttivo. In tale contesto è necessario stabilire quanto la diagnostica vegetale possa, al di là del ruolo di certificazione sanitaria ed analisi delle malattie, essere d'aiuto agli imprenditori agricoli affinché raggiungano degli obiettivi di qualità prefissati.

## LA DIAGNOSTICA VEGETALE NELL'IMPRESA AGRICOLA

I fenomeni di mancata conformità di alcuni fattori della produzione causano all'imprenditore agricolo un danno economico diretto ed indiretto di immagine: le quarantene, le distruzioni di piante infette, i fermi produttivi, le disinfezioni rappresentano solo dei costi. All'opposto prevenire le infezioni, mettere in coltivazione solo piante sane, evitare la distruzione di piante pronte da vendere, evitare situazioni che compromettano l'immagine aziendale, produrre con margini maggiori, sono fattori che permettono all'impresa agricola una maggiore remunerazione. Un intervento diagnostico rapido permetterebbe di evitare di mettere in produzione del materiale infetto, di cogliere sul nascere un'infezione e consentire

**Tabella 2 - Guida operativa del sistema HACCP.**  
*Table 2 - Guidelines of the HACCP system.*

Applicazione del sistema HACCP
Identificazione dei rischi microbiologici
Fissazione dei punti critici di controllo
Definizione delle procedure di monitoraggio
Linee di intervento
Verifica del sistema
Definizione dei criteri relativi ai punti di controllo

di porre in atto le procedure per bloccarla o ridurne l'impatto. La diagnostica vegetale rapida diventerebbe uno strumento operativo tale da consentire una riduzione del numero di trattamenti chimici fitosanitari; potrebbe cioè concorrere a produzioni di qualità superiore in termini di presenza di minori residui di fitofarmaci sul prodotto finito. Il prodotto con minori residui è ottenuto con minori trattamenti e con minori spese; l'imprenditore agricolo riuscirà a mettere in commercio un prodotto più salubre e anche competitivo in termini di prezzo; dal punto di vista ambientale la produzione sarebbe più rispondente alle necessità di ridurre i consumi energetici e chimici anche se non si fregia del termine di "biologica". Si tratta di una ipotesi di lavoro allo stato attuale ma sarebbe interessante da investigare in termini di fattibilità sul campo.

La sollecitazione verso questo tipo di analisi e di verifica di quanto la fitodiagnostica rapida possa contribuire ad elaborare strumenti operativi utili per le imprese agricole, arriverà sia dalle imprese che dalle normative Comunitarie. Un processo di evoluzione del processo di indagine delle contaminazioni microbiche è avvenuto nel comparto delle industrie alimentari. Le tecniche di analisi microbiologica hanno avuto un forte impulso con le prime legislazioni sugli alimenti. A partire dagli anni 1960 e 1970 sono sorti numerosi i laboratori microbiologici nelle industrie alimentari. Le tecniche ispettive si sono evolute

e perfezionate. Tuttavia il controllo di qualità ispettivo tradizionale si è rilevato non sempre sufficiente a svolgere un'azione sanitaria preventiva utile sia ai fini dell'impresa che del consumatore. La filosofia HACCP ha preso forma a partire sul finire degli anni 1980 e nel corso degli anni 1990 del secolo scorso (Tabb. 1 e 2); le imprese l'hanno realizzata in procedure operative con rispetto alle leggi nazionali in materia (155/1997). Per attuare le procedure occorrono naturalmente dei mezzi, degli strumenti idonei a

fornire risposte analitiche sufficientemente rapide e precise. Nelle figure 1 e 2 sono rappresentati alcuni test diagnostici utili per evidenziare in tempi rapidi microrganismi patogeni degli alimenti. L'azienda agricola opera, diversamente dall'industria alimentare, in un contesto "aperto", cioè i patogeni virali, funghi e batterici, si spostano nell'ambiente con i più svariati vettori (insetti, vento, acqua, animali, ecc.). Le possibilità di aggressione alla produzione vegetale sono molteplici. Le esigenze fitodiagnostiche riguardano funghi, virus, batteri, fitoplasmi. Le tecniche dei laboratori fitopatologici sono assai perfezionate e precise nell'identificare accuratamente il fitopatogeno che causa il sintomo (Martelli e Gallitelli, 2001). Le tecniche tuttavia non sono sempre rapide, economiche e al limite adattabili alla realtà delle aziende. È un fatto che il laboratorio di patologia vegetale non è parte integrante delle imprese agricole, salvo rare eccezioni nell'ambito di alcuni importanti realtà florovivaistiche. È più comune che il promotore di fitofarmaci svolga il ruolo di consulente fitopatologico ma questa non è la procedura più corretta.

L'imprenditore agricolo dovrà avere degli strumenti da usare in campo, capaci di dare risposte in tempo reale. Le esigenze sono: versatilità, cioè dovranno essere capaci di individuare alcuni dei fitopatogeni che maggiormente potrebbero danneggiare le colture, rapidità di risposta perché egli possa agire di fronte al problema, facilità d'uso



**Fig. 1 - Strips per l'identificazione di Salmonella spp.**  
*Figure 1 - Strips for quick identification of Salmonella spp. in foods.*



**Fig. 2 - Minikit™ - test per la valutazione del livello igienico delle superfici (gentile concessione di Neomed srl).**  
*Figure 2 - Minikit™ - test for the evaluation of hygiene quality of surfaces (courtesy of Neomed srl).*

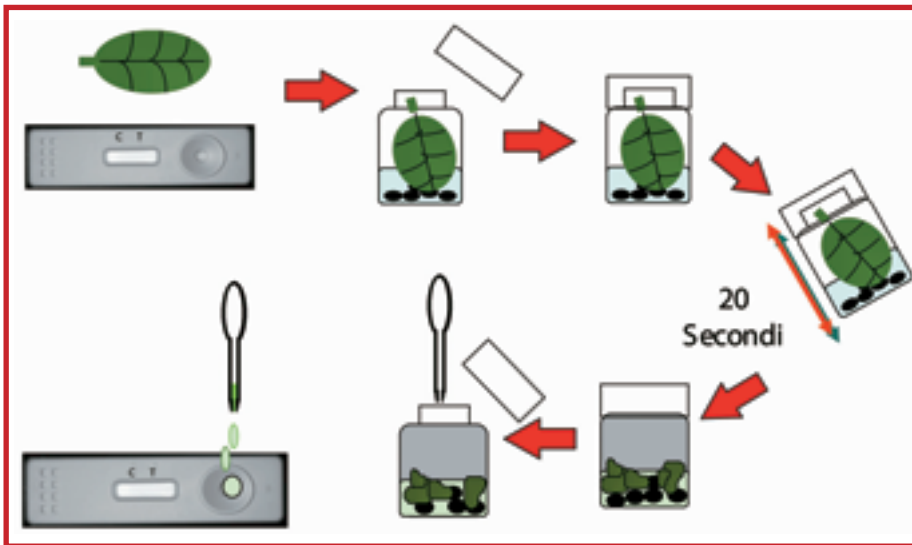


Fig. 3 - Lo schema di funzionamento dei test LF "Lateral flow".  
Figure 3 - Mechanism of action of lateral flow tests.

e di lettura del risultato perché non è un tecnico di laboratorio, economicità, sensibilità, accettabilità del metodo sia a livello nazionale che internazionale.

### LA TECNICA "LATERAL FLOW"

La diagnosi sierologia delle malattie delle piante causati da patogeni vegetali, largamente adottata a partire dagli anni 1950, dal 2000 ha subito un'evoluzione tecnica tale da poter concretamente portare l'analisi sul campo. In quell'anno infatti è stato messo a punto il sistema "Lateral flow test" (Dans e Barker, 2000); il test consente di eseguire un'analisi in pochi minuti e non necessita di attrezzature di laboratorio. Il principio del metodo è simile a quello del test ELISA tradizionale, solo che gli anticorpi sono adesi a dei granuli di lattice invece che essere coniugati ad un enzima. Il test (Fig. 3) è costituito da una lastrina di materiale assorbente su cui sono state poste due barriere trasversali di anticorpi; la prima barriera è costituita da anticorpi specifici per il patogeno e la seconda da anticorpi specifici per gli anticorpi adesi al lattice. Il campione liquido viene posto nel pozzetto ed assorbito dalla membrana. Il liquido si muove per capillarità verso il lato opposto della piastrina mobilizzan-

do gli anticorpi adesi ai granuli di lattice. Gli anticorpi, se trovano il patogeno target, restano bloccati nella prima linea, che funge perciò da linea di test: la concentrazione dei complessi antigeni-anticorpi darà luogo ad una colorazione blu. Gli altri anticorpi sono bloccati dalla seconda linea, che si dovrà visualizzare sempre pena la non validità del test, e che rappresenta la linea di controllo (Fig. 4).

Il metodo "lateral flow" risponde positivamente a tanti dei requisiti perché possa essere adottata nelle aziende. La tecnica è versatile: in tabella 3 sono elencati i patogeni target per cui il metodo è disponibile. La gamma è ampia ed interessa virus, batteri e generi fungini. Il tempo di risposta è dell'ordine dei 2 minuti. La preparazione del campione e l'esecuzione del test sono semplici ed alla portata di normali operatori. Il test è economico perché non richiede né strumentazione né reagenti né un laboratorio attrezzato. I campioni sospetti da analizzare sono saggati subito anziché essere spediti in un laboratorio; i campioni

sospetti positivi potranno essere poi spediti al laboratorio per una conferma diagnostica ufficiale. Il metodo ha anche delle applicazioni riconosciute a livello internazionale [vedere USA – APHIS 12/2004 "Ralstonia solanacearum in geranium (*Pelargonium* spp.): testing and sampling plan"].

Il metodo "Lateral flow" è in costante e rapida evoluzione ed è sfruttato per un numero crescente di applicazioni: micotossine, OGM, allergeni, ecc. I test "lateral flow" sono entrati in commercio dal 2000 e ad oggi si possono riscontrare diverse possibilità applicative sfruttate con successo ed interesse crescente. Nel 2004 sono divenuti disponibili i test Alert LF™ per i seguenti generi fungini: *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. e *Rhizoctonia* spp. I test per funghi rappresentano l'evoluzione del test ELISA "Alert" (Miller *et al.*, 1988; Lorito *et al.*, 2001).

Ulteriori progressi nella ricerca di anticorpi specifici potranno permettere un miglioramento della sensibilità del metodo ed un ampliamento della gamma dei patogeni target. Nella tabella 4 sono riportate in percentuali le classi di utilizzatori e i tipi di test più richiesti per gli anni 2004, 2005 e 2006.

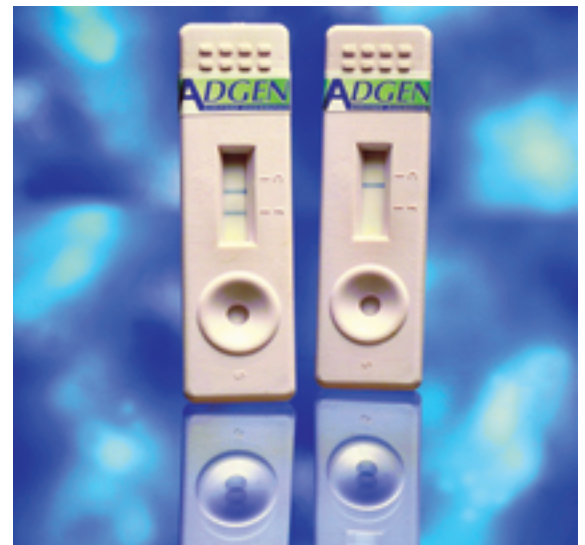


Fig. 4 - Lettura dei risultati del test LF "Lateral flow".  
Figure 4 - Reading and interpretation of results of "lateral flow" tests.

L'analisi dei dati evidenzia immediatamente l'interesse dei servizi fitosanitari verso questi test, adottati dagli ispettori per rispondere ad una esigenza emersa con forza in questi anni di prepotente apertura del mercato e degli scambi commerciali di piante: il controllo dei patogeni di temuta introduzione. Il test rapido sul campo, alle dogane e nelle piazzole di sosta dei TIR, nei vivaisti importatori, funziona come un campanello d'allarme per la ricerca dei patogeni, in special modo di quelli da quarantena. Il test è presuntivo; i casi sospetti saranno confermati dal laboratorio ufficiale, secondo le metodiche ufficiali ma nel frattempo la pronta segnalazione di un caso sospetto permette la messa in atto delle procedure di prevenzione in tempi estremamente più rapidi.

A partire dal 2004, con l'introduzione dei test "lateral flow" per i generi fungini prima citati, cresce l'interesse, l'attenzione dei laboratori e dei vivaisti verso questi test. La corretta diagnosi rapida di una infezione fungina consente di effettuare interventi fitosanitari in tempo reale, oppure di escludere che una certa fitopatologia sia da ascrivere a funghi o ad altre cause, quali gli stress idrici, carenze o eccessi di sali minerali, ecc., non sempre facilmente identificabili: ciò comporta un immediato riscontro economico in azienda. I test per la ricerca dei virus sono più numerosi e quindi occupano una buona porzione del mercato; la diagnosi virale permette di verificare casi specifici, che si presentano nel corso della stagione su determinate colture. La richiesta di questi test è per ora quindi collegata a fenomeni specifici e stagionali; gli operatori richiedono il test in presenza del problema, non per prevenirlo. Il virus, una volta che si è manifestato in azienda, non lascia spazio a procedure di cura: il materiale infetto dovrà essere comunque distrutto al più presto per prevenire danni maggiori.

I laboratori privati costituiscono un insieme di utilizzatori di test "lateral flow" interessati per due ragioni di fondo: possono effettuare lo screening di campioni da sottoporre ad analisi suc-

cessive più approfondite e di maggiore costo; possono offrire un servizio rapido di analisi per richieste a spot poco frequenti.

### CONSIDERAZIONI FINALI

Le aziende agricole, florovivaistiche dovranno studiare con sempre maggiore attenzione, data la rapida evoluzione degli scambi commerciali e la forte competitività delle produzioni europee ed extraeuropee, strategie produttive nuove, più conformi agli obiettivi di sostenibilità del reddito senza diminuire la qualità, la economicità del prodotto finito. La diagnostica vegetale dovrà assumere un ruolo più accentuato perché queste strategie possano realizzarsi nelle imprese.

Le tecniche diagnostiche rapide potranno avere un notevole impulso grazie alla messa a punto di metodi di campionamento ed analisi applicati alle produzioni vegetali suscettibili verso determinati microrganismi fitopatogeni e per i quali i test rapidi sono disponibili. Il tema della "qualità", vista come riferimento sanitario ed igienico della produzione vegetale, potrà svilupparsi quando si potranno costruire degli schemi operativi a flusso, sul modello di quanto si è già fatto nelle industrie alimentari. Progetti operativi in tal senso sono stati già condotti per il comparto florovivaistico (Progetto

POM A32). Il trasferimento delle procedure necessita di strumenti di controllo rapidi e semplici perché siano applicate nella realtà agricola. I test rapidi "lateral flow" dopo alcuni anni di esperienza sul campo, hanno trovato

**Tabella 3 - Elenco dei fitopatogeni rilevabili mediante i test rapidi "lateral flow".**

Table 3 - List of phytopathogens which can be identified by "lateral flow" devices.

Patogeni	Codice
Potato Virus Y (PVY)	14-750
Potato Virus X (PVX)	14-752
Potato Virus V (PVV)	14-754
Potato Virus A (PVA)	14-756
Potato Virus S (PVS)	14-758
Plum Pox Virus (PPV)	14-760
Pepino Mosaic Virus (PepMV)	14-762
Tomato Mosaic Virus (ToMV)	14-764
Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	14-766
Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV)	14-768
Cucumber Mosaic Virus (CMV)	14-770
Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)	14-772
Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV)	14-774
Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV)	14-776
Beet Yellow Virus (BYV)	14-778
Tobacco Mosaic Virus (TMV)	14-780
<i>Ralstonia solanacearum</i>	14-850
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>pelargonii</i>	14-852
<i>Erwinia amylovora</i>	14-863
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	14-865
Alert LF <i>Phytophthora</i> spp.	14-857
Alert LF <i>Pythium</i> spp.	14-859
Alert LF <i>Rhizoctonia</i> spp.	14-861

## RIASSUNTO

L'era del commercio globale costringe le imprese agrarie italiane ad agire in un contesto internazionale di forte competitività. La riduzione dei costi e la buona qualità fitosanitaria delle produzioni vegetali sono due obiettivi su cui insistere. Può la diagnostica vegetale rapida contribuire a raggiungere tali obiettivi? La tecnica di diagnostica vegetale rapida "lateral flow" si è sviluppata a partire dal 2000. Alcuni anni di esperienza applicativa dei kit diagnostici sono stati analizzati e i dati forniscono alcune prime indicazioni sugli impieghi riscontrati. Una importante riflessione è che i test rapidi siano da sfruttare in un piano di controllo dei punti critici della produzione vegetale, come avviene nell'industria alimentare. Il beneficio delle tecnologia "lateral flow" si misurerà nella possibilità di agire tempestivamente sul campo per tutelare la produzione. Le malattie per le quali è possibile impiegare i test rapidi "lateral flow" sono numerose; la verifica dell'efficacia economica del metodo nel consentire un intervento fitosanitario rapido e mirato richiede una validazione specifica sul campo. I test rapidi non sono un'alternativa ai test di laboratorio. Essi rispondono in maniera chiusa, sì/no, quando un potenziale fitopatogeno sia presente su una certa coltura o per verificare che esso non sia presente su materiale vegetale che entrerà nella fase produttiva in azienda.

## Parole chiave

Lateral flow, kit diagnostici, test rapidi.

## SUMMARY

**Management of phytosanitary quality of food products by rapid diagnostic techniques at field level**

The global trade era is forcing Italian farms to work in a quite hard and competitive environment. Good phytosanitary quality of food products and reduction of costs are targets to achieve. Could rapid plant diagnosis help to reach the targets? Since 2000 the lateral flow technology applied to plant diagnosis spread. Some year of application of lateral flow test are analysed and some suggestions are obtained. The rapid test can be exploited in an hazard critical control point plan of the production, like it works in food industry. The benefit of the rapid lateral flow test is given by the chance to quickly operate in the field, to prevent problems to the production before the disease increases. Many plant diseases can be subject to this type of diagnosis; a validation on the field results should be studied to verify the proficiency of the method. The rapid lateral flow tests are not alternative to the laboratory tests. Their goal is to give a rapid close answer, yes/no, when a potential phytopathogen could be present on a crop or to verify the healthy of vegetable material before using it in the production.

## Key words

Lateral flow, diagnostic kits, rapid test.

degli sbocchi applicativi interessanti. Essi sono disponibili per verificare sul campo la presenza di molti fitopatogeni con accuratezza e semplicità. L'associazione di questi test a schemi di controllo in campo ne migliorerà il valore d'uso. Un uso sistematico dei test permetterà infatti di ridurre le possibilità di introdurre materiale vegetale infetto in azienda, di segnalare tempestivamente determinate infezioni di funghi, virus, batteri. La risposta in tempo reale permette ai produttori di intervenire pronta-

**Tabella 4 - Distribuzione degli acquirenti di test "Lateral flow" e distribuzione dei tipi di test (Fonte: Micropoli, 2004-2005-2006).**

Table 4 - Distribution of users of "Lateral flow" devices and distribution of the tests (Source: Micropoli, 2004-2005-2006).

Acquirenti	Percentuale di vendite		
	2004	2005	2006
Servizi fitosanitari	44%	29%	34%
Università	6%	21%	11%
Laboratori privati	32%	29%	22%
Azienda agrarie/semienti	18%	14%	33%
Scuole superiori	-	7%	-
Tipo di test venduti	2004	2005	2006
Test LF per batteri	47%	30%	26%
Test LF per virus	42%	36%	35%
Test LF per funghi	11%	34%	39%

mente per contrastare fenomeni negativi. Questa azione di contrasto rapida costituisce il vero fattore di risparmio sui costi d'impresa. Il controllo dei rischi fitosanitari e la riduzione dei costi operativi ed ambientali (limitazione negli sprechi di fitofarmaci, di energia, di manodopera) rappresentano una esperienza positiva verso cui si avvieranno le imprese agricole, sul modello dell'industria agroalimentare, dove tale esperienza è ufficialmente normata da anni (legge 155/97 e Reg. CEE 852 ed 853/2004).

L'auspicio è che il mondo della ricerca si affianchi ai produttori per lo studio e le analisi di fattibilità di tali schemi di intervento, finora studiati più approfonditamente per il settore florovivaistico. Lo studio dei piani di campionamento, le modalità di preparazione dei campioni, le modalità di analisi, le procedure di messa in sicurezza del processo in presenza di un determinato fitopatogeno sono delle esperienze conoscitive che dovranno diventare patrimonio culturale delle imprese. L'obiettivo di sostenibilità del reddito delle imprese agricole negli anni a venire potrà essere raggiunto anche con l'ausilio di strumenti fitodia-

gnostici rapidi, nel momento in cui la loro efficacia sarà stata validata sul campo.

## LAVORI CITATI

- Ali-Shtayah M.S., Mac Donald J.D., Kabashima J. (1991) - A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water. *Plant Disease*, 75, 305-311.
- Danks C., Barker I. (2000) - On site detection of plant pathogens using lateral flow devices. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30, 421-426.
- Lorito M., Del Sorbo G., Scala F. (2001) - La diagnosi immunologica delle malattie fungine. *Informatore Fitopatologico - La Difesa delle Piante*, 51 (3), 23-29.
- Mac Donald J.D., Sites J., Kabashima J. (1990) - Comparison of serological and culture plate methods for detecting species of *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizoctonia* in ornamental plants. *Plant Disease*, 74, 655-659.
- Mac Donald J.D., Ali-Shtayah M.S., Kabashima J., Sites J. (1994) - Occurrence of *Phytophthora* species in recirculated nursery irrigation effluents. *Plant Disease*, 78, 607-611.
- Martelli G.P., Gallitelli D. (2001) - Il ruolo delle biotecnologie applicate alla difesa delle colture. *Informatore Fitopatologico - La Difesa delle Piante*, 51 (12), 55-64.
- Miller S.A., Rittenburg J.H., Petersen F.B., Grothaus G.D. (1988) - Application of rapid field-usable immunoassays for the diagnosis and monitoring of fungal pathogens in plants. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases*, 2, 795-803.
- Progetto POM A32 (2001) - *Incontro divulgativo, i risultati di due anni di attività*. Termoli 1 e 2 marzo 2001.