



Direzione Agricoltura e Sviluppo Rurale

**Settore Servizio Fitosanitario Regionale e di Vigilanza e Controllo
Agroforestale.**

**Linee guida 2020 per la realizzazione di campionamenti per
l'effettuazione della sorveglianza annuale nell'area
delimitata (zone infette e zona cuscinetto) del focolaio di
Xylella fastidiosa di Monte Argentario (GR) (Reg. UE
1201/2020)**

Versione 1.0 del 18/9/2020

Indice

Indice generale

Introduzione.....	3
1 Delimitazioni.....	3
2 Obiettivi del campionamento.....	3
3 Oggetto del campionamento.....	4
4 Metodologie di campionamento da adottare nella zona infetta.....	4
4.1 Campionamento durante la rimozione delle piante infette.....	4
4.2 Indagini nelle zone infette.....	4
4.2.1 Ambito territoriale delle indagini.....	4
4.2.2 Specie da indagare.....	5
4.2.3 Quantificazione del numero di campioni da prelevare.....	5
4.2.4 Organizzazione delle indagini.....	6
4.2.5 Preparazione delle ispezioni.....	6
4.2.6 Definizione delle sub unità da ispezionare.....	6
4.2.7 Modalità operative per la realizzazione del campionamento.....	7
5 Metodologie di campionamento da adottare nella zona cuscinetto.....	9
5.1 Impostazione delle attività.....	9
5.2 Modalità operative per la realizzazione del campionamento nella zona cuscinetto.....	10
6 Modalità operative generali.....	11
6.1 Modalità di individuazione delle piante da campionare.....	11
6.2 Modalità di prelievo dei campioni vegetali.....	12
6.3 Misure di profilassi.....	15
6.4 Analisi di laboratorio.....	15
6.5 Misure di sicurezza sul lavoro.....	16

Introduzione

Le presenti Linee Guida, a cura del Servizio fitosanitario regionale della Toscana (SFR) hanno la finalità di definire le modalità operative per le attività di ispezione e campionamento nelle aree delimitate del focolaio di *Xylella fastidiosa* di Monte Argentario (GR). L'attività si svolge ai sensi del Reg (UE) di esecuzione 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*, tenendo conto anche di quanto riportato nell'allegato 4 al DM 13/2/2018 "Linee guida sul monitoraggio e campionamento di specie vegetali ai fini dell'identificazione di *Xylella fastidiosa* in zone indenni", della "Guideline for the survey of *Xylella fastidiosa* in the Union territory" pubblicate sul sito https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_guidelines_xylella-survey.pdf, delle 'Guidelines for statistically sound and risk-based surveys of *Xylella fastidiosa*' e della 'Pest Survey card on *Xylella fastidiosa*' pubblicati da EFSA nel 2019 e nel 2020.

Nella predisposizione delle presenti LG si è tenuto conto dei dati tecnici e scientifici disponibili, della biologia dell'organismo specificato e dei suoi vettori, della presenza e della biologia delle piante specificate o di piante verosimilmente ospiti dell'organismo specificato. Sono state inoltre considerate tutte le informazioni pertinenti per quanto riguarda la presenza di *Xylella fastidiosa* rilevate nella zona delimitata di Monte Argentario nel corso della campagna di monitoraggio 2019 e nella prima fase di rimozione delle piante infette conclusasi nel mese di maggio 2020.

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1873>

1 Delimitazioni

Ai sensi dell'art 4 comma 2 Reg (UE) 2020/1201 le zone delimitate sono così definite:

L'area delimitata è costituita da una zona infetta e da una zona cuscinetto.

La zona infetta ha un raggio di almeno 50 m attorno alla pianta che è risultata infetta dall'organismo nocivo specificato.

La larghezza della zona cuscinetto è di almeno 2,5 km quando la zona infetta è stabilita ai fini dell'adozione delle misure di eradicazione di cui agli articoli da 7 a 11.

La nuova delimitazione delle zone infette e cuscinetto è stata definita con il decreto dirigenziale n. 15430 del 1/10/2020.

2 Obiettivi del campionamento

La realizzazione delle indagini annuali, da svolgersi nei periodi più adatti e conformemente a quanto disposto nell'articolo 10 del reg UE 2020\1201, ha per obiettivo la determinazione della presenza e distribuzione di *Xylella fastidiosa* nell'intera area delimitata e può portare all'eventuale ridefinizione della superficie della zona infetta ai fini della successiva tempestiva eradicazione dei focolai rinvenuti.

3 Oggetto del campionamento

Ai sensi dell'art 10 del Reg (UE)2020/1201, le piante oggetto di campionamento ed analisi sono le piante ospiti, comprese le piante specificate, come pure le altre piante che presentano sintomi indicativi della possibile infezione da parte di tale organismo nocivo o che si sospetta siano infette da tale organismo nocivo.

Di seguito si riportano le definizioni ai sensi dell'art. 2 del REG (UE) 2020/1201:

b) «piante ospiti»: tutte le piante da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato I al regolamento;

c) «piante specificate»: piante ospiti da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato II e notoriamente sensibili a sottospecie specifiche dell'organismo nocivo specificato

In base a quanto sopra, per quanto concerne il focolaio di Monte Argentario, sono da considerarsi piante specificate quelle relative alla sottospecie Multiplex, unica rinvenuta fino a questo momento, Sequence Tipe 87.

4 Metodologie di campionamento da adottare nella zona infetta

4.1 Campionamento durante la rimozione delle piante infette

Durante la rimozione delle piante infette rinvenute nel corso delle indagini svolte nel 2019, sono state ispezionate e campionate le piante sintomatiche e/o sospette, destinate alla rimozione, situate nei pressi di quelle già individuate infette. Ciò ha consentito di individuare ulteriori piante infette. I risultati di questa prima fase di indagine saranno presi in considerazione nei risultati delle attività 2020.

4.2 Indagini nelle zone infette

4.2.1 Ambito territoriale delle indagini

Il [Reg \(UE\) 2020/1201](#), all'art 4 comma 2 definisce come zona infetta la superficie di territorio circondata da un raggio di almeno 50 m attorno alla pianta che è risultata infetta dall'organismo nocivo specificato.

Nel caso del focolaio di Monte Argentario, la delimitazione delle zone infette è stata definita in ultimo dal Decreto Dirigenziale n. 15430 del 1/10/2020.

Nel corso dei monitoraggi precedenti sono state individuate 274 piante infette più o meno distanziate fra loro, applicando le modalità di individuazione delle zone infette indicate dall'art. 4 del reg UE 2020\1201, sono state delimitate 83 zone infette in cui ricadono una o più piante infette, per una superficie totale di circa 115 ha.

Le 83 zone infette sono state suddivise in 4 unità epidemiologiche sulla base della categoria di uso del suolo prevalente utilizzando la classificazione dell'uso del suolo del CORINE land cover:

UE 1	112 tessuto urbano discontinuo 121 aree industriali e commerciali 123 aree portuali 142 aree sportive e ricreative
UE 2	223 uliveti 242 sistemi colturali a particellari permanenti 243 aree prevalentemente occupate da colture agrarie con spazi naturali. Oliveti
UE 3	311 bosco di latifoglie 312 boschi di conifere
UE 4	323 territori boscati e ambienti seminaturali

4.2.2 Specie da indagare

Nel corso della campagna di indagine svolta nel 2019 è stato individuato un numero limitato di specie vegetali risultate positive al batterio (22 specie), la maggior parte delle quali con un ridotto numero di piante positive rispetto al numero di campioni prelevati. Ai fini di una migliore conoscenza della distribuzione del batterio, **si ritiene opportuno intensificare il prelievo di campioni dalle specie sensibili (piante ospiti) finora meno indagate e risultate non infette o risultate infette con una limitata frequenza.**

4.2.3 Quantificazione del numero di campioni da prelevare

Ciascuna unità epidemiologica (UE) è stata definita tenendo conto delle linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio relative alla *Xylella fastidiosa* pubblicate dall'EFSA. Ai sensi dell'art. 10 del reg UE 2020\1201, In ciascuna UE il piano dell'indagine e lo schema di campionamento devono permettere di rilevare un tasso di presenza di piante infette dello 0,5 % con un livello di confidenza almeno del 90 %. Per definire il numero di campioni da prelevare coerentemente a tali indicazioni, è stata utilizzata l'applicazione 'Ribess+' messa a punto dall'EFSA. Applicando il metodo di calcolo di 'RIBESS+', devono essere prelevati almeno 76 campioni per ciascuna UE, per un totale di almeno 304 campioni nelle quattro UE. Al fine di effettuare una ripartizione omogenea dei campioni sul territorio, la superficie di ciascuna area infetta è stata suddivisa in quadranti di 25 m. di lato con una superficie di 625 mq ciascuno. per un totale di 998 quadranti interamente compresi nel perimetro delle zone infette. Al fine di rendere ancora più significativi i risultati delle indagini si è deciso di prelevare almeno un campione per ciascun quadrante, per un totale di circa 1000 campioni previsti.

4.2.4 Organizzazione delle indagini

Le indagini nelle zone infette saranno effettuate da squadre di Ispettori, Agenti e Tecnici in collaborazione con personale del DAGRI dell'Università di Firenze nell'ambito degli accordi di collaborazione scientifica stipulati con tale Dipartimento.

Prima dell'inizio delle operazioni è prevista una riunione organizzativa fra i responsabili del DAGRI e del SFR, al fine di definire i termini della collaborazione, gli

obiettivi tecnici e la ripartizione dei compiti in modo di perseguire obiettivi tecnico scientifici di comune interesse.

Le squadre impegnate nel monitoraggio dovranno essere composte da almeno due operatori afferenti alle due strutture. Ogni squadra dovrà avere un referente delle operazioni per ciascuna zona infetta assegnata e avrà assegnato un certo numero di quadranti o zone infette.

Al fine di facilitare la composizione delle squadre, di ottimizzare le risorse e i mezzi, le squadre devono essere preferibilmente composte da Ispettori e Agenti assegnati alla stessa sede.

Dal punto di vista organizzativo, anche per la distanza di Monte Argentario dalle varie sedi del SFR (eccetto quella di Grosseto), si suggerisce che le squadre impegnate siano operative almeno 2 giorni consecutivi a settimana.

A seguito delle limitazioni operative dovute alle prescrizioni sanitarie imposte dal COVID 19 che hanno ritardato l'avvio delle operazioni di monitoraggio si stima di completare la realizzazione delle indagini nelle zone infette entro la fine del mese di novembre 2020.

4.2.5 Preparazione delle ispezioni

Innanzitutto si deve consultare l'atlante cartografico delle aree infette predisposto dal SFR e accedere alle mappe relative alle zone assegnate

Dotarsi della normativa essenziale: [Reg \(UE\) di esecuzione 2020/1201](#) della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della Xylella fastidiosa;

Scaricare la mappa catastale, la foto satellitare ed eventualmente il rilievo all'infrarosso della zona assegnata presente su Geoscopio.

Se necessario acquisire l'elenco dei proprietari, così come risultante dall'applicazione 'SISTER', per quella data zona infetta.

Ricordarsi di portare il tablet in dotazione a ciascun ispettore, verificare la carica della batteria, verificare l'aggiornamento del software sull'applicazione FitoSIRT. Per l'inserimento dei dati nell'applicazione seguire le istruzioni specifiche (manuale allegato).

Dotarsi degli strumenti necessari per il campionamento (Buste sigillo, fascette a strozzo, nastro segnaletico bicolore, forbici, disinfettante, ecc.).

4.2.6 Definizione delle sub unità da ispezionare

Al fine di uniformare la distribuzione dei campioni sul territorio e di facilitare le operazioni di campionamento, ciascuna zona infetta, singola o multipla, è stata suddivisa in quadranti della dimensione di m. 25 x 25 con una superficie di 625 mq. Ciascuno dei quadranti interamente ricompresi nella superficie di ogni area infetta, rappresenta la sub unità nella quale realizzare il campionamento. Il numero totale di quadranti come sopra descritti è di 998 per una superficie totale di circa 115 Ha. Tutti i quadranti sono numerati. I quadranti inaccessibili per motivi fisici o perché ricadenti in aree private non accessibili e quelli senza vegetazione non dovranno essere indagati.

4.2.7 Modalità operative per la realizzazione del campionamento

Per orientarsi meglio è opportuno iniziare le ispezioni dal quadrante dove ricade la pianta infetta già rimossa; sono da prendere in considerazione solo quelli ricadenti per intero nella area di indagine.

In caso di problemi per l'accesso nelle proprietà ricadenti nei quadranti da indagare, cercare di contattare i proprietari\conduttori, anche chiedendo informazioni ai proprietari/conduttori già noti.

Informare i proprietari\conduttori eventualmente presenti sulla Emergenza Xylella a Monte Argentario, sugli obblighi di legge e relative sanzioni (D.Lgs. 214/2005, art. 54, comma 3-bis¹, sulle prescrizioni specifiche già emesse nei confronti dei proprietari\ possessori delle superfici ricadenti in zona delimitata e sulle finalità delle indagini e della rimozione delle piante ricadenti in zona infetta.

Nel caso di diniego alle richieste di accesso NON insistere e comunicare che verrà emessa una specifica prescrizione di misura ufficiale per imporre l'accesso per le indagini e l'eventuale rimozione di altre piante.

In caso di ulteriore diniego, ricordare la possibilità di applicazione degli articoli 500 e 650 del codice penale e che l'ispezione sarà comunque realizzata congiuntamente alla forza pubblica (Carabinieri Forestali- CF). La richiesta di intervento dei CF sarà inviata a conclusione delle indagini, quando si avrà un quadro completo dei terreni con accesso problematico.

Procedere quindi con le ispezioni visive ed il campionamento delle piante specificate, effettuando possibilmente per ogni quadrante le seguenti operazioni:

- Definire un percorso, possibilmente seguendo i percorsi già presenti, che attraversi il quadrante e posizionarsi in un determinato punto del quadrante ritenuto rappresentativo della composizione vegetazionale presente all'interno del quadrante stesso. In assenza di percorsi percorribili, le piante da cui prelevare i campioni dovranno essere comunque individuate nella vegetazione presente nel quadrante;
- in ciascun quadrante prelevare almeno un campione (singolo o pool);
- Segnare sempre con una fascetta numerata ciascuna pianta campionata.

Nei punti in cui sono state rimosse piante infette verificare l'eventuale sviluppo di ricacci basali dalle ceppaie rimaste in loco. In caso di presenza di ricacci prelevare un campione al fine di verificarne l'eventuale infezione. Nel verbale redatto fare riferimento, se presente, alla fascetta che contraddistingueva la pianta rimossa.

Le piante devono essere riconosciute e registrate con genere e specie evitando in ogni caso di inserire specie generiche (sp.).

Registrare come segue le operazioni svolte su FitoSIRT (v. manuale):

¹ "Chiunque non consente agli incaricati del Servizio fitosanitario l'effettuazione dei controlli in attuazione del presente decreto e' punito con la sanzione amministrativa del pagamento di una somma da 1.000,00 euro a 6.000,00 euro"

- Per ciascun quadrante da ispezionare è necessario aprire un nuovo verbale. Indicare nel verbale il numero della zona infetta e del quadrante a cui fa riferimento il verbale.
- Nel corso dell'ispezione, creare un rilievo per ciascuna specie vegetale. Nel caso di campionamento di più specie vegetali nello stesso quadrante aprire un nuovo rilievo per ciascuna specie vegetale.
- Effettuare la registrazione di ciascun campione prelevato campione all'interno del rilievo della specie campionata.

5 Metodologie di campionamento da adottare nella zona cuscinetto

Ai sensi dell'art 4 comma 2 [Reg \(UE\) 2020/1201](#), la larghezza della zona cuscinetto stabilita ai fini dell'adozione delle misure di eradicazione deve essere di almeno 2,5 km a partire dal confine della zona infetta, nel caso del focolaio di Xf di Monte Argentario, si ritiene che questa dimensione sia sufficiente, dato che applicandola si comprende completamente tutto il territorio del promontorio e la parte dei tomboli di Giannella e Feniglia più prossima al focolaio.

In base a quanto riportato dalla 'Pest Survey card on *Xylella fastidiosa*', pubblicato da EFSA nel 2019, la superficie adiacente alla zona infetta, per un raggio di 400 m, rappresenta la parte della zona cuscinetto maggiormente a rischio di nuove infezioni e pertanto dovrà essere indagata più intensamente mediante un'intensità di campionamento almeno doppia rispetto alla restante parte della zona cuscinetto.

Al fine di garantire una sistematica distribuzione dei campioni sul territorio da indagare, la prima parte della zona cuscinetto compresa nei primi 400 m. di raggio è stata ripartita in quadranti di 100 m × 100 m di lato, della superficie di 1 ha. Il numero totale dei quadranti completamente compresi in questa prima parte della zona cuscinetto è di 2009

La restante parte della zona cuscinetto (ulteriori 2100 m.) è stata suddivisa in quadranti di 1 km × 1 km di lato. Il numero totale dei quadranti così definiti è di 94.

5.1 Impostazione delle attività

Nelle zone cuscinetto saranno sottoposte a campionamento e analisi le piante ospiti, così come definite dal reg UE 2020\1201, come pure le altre piante che presentano sintomi indicativi della possibile infezione da Xf o che si sospettano infette da tale organismo nocivo. A tal fine, e tenuto conto delle linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio relative alla *Xylella fastidiosa* pubblicate dall'EFSA, il piano dell'indagine e lo schema di campionamento dovranno permettere di rilevare un tasso di presenza di piante infette dell'1 % con un livello di confidenza almeno del 90 %, tenendo presente che i primi 400 m attorno alle zone infette presentano un livello di rischio più elevato.

Al fine di applicare validi principi statistici per la definizione del numero dei campioni da prelevare ed analizzare è stato utilizzato lo strumento di supporto statistico messo a punto da EFSA denominato 'Ribess +'.

Il territorio interessato dall'indagine è stato suddiviso in 4 unità epidemiologiche in base alla classificazione dell'uso del suolo CORINE land cover:

UE 1	112 tessuto urbano discontinuo 121 aree industriali e commerciali 123 aree portuali 142 aree sportive e ricreative
UE 2	223 uliveti 242 sistemi colturali a particellari permanenti 243 aree prevalentemente occupate da colture agrarie con spazi naturali. Oliveti
UE 3	311 bosco di latifoglie 312 boschi di conifere
UE 4	323 territori boscati e ambienti seminaturali

Tab 1: definizione delle unità epidemiologiche e dei codici CLC che le compongono

In caso di presenza di più di una classe di uso del suolo è stata individuata quella prevalente come riferimento per la singola Unità epidemiologica.

Al fine di definire il numero dei campioni da prelevare in ciascuna unità epidemiologica è stata realizzata una stima del numero di piante ospiti o sospette presenti in ciascuna di esse. La stima è stata effettuata per ciascuna classe di CLC a partire dai dati rilevati e dalla esperienza fatta nei campionamenti precedenti dagli ispettori del SFR. La stima del numero di piante ospiti presenti in ciascuna unità epidemiologica è stata fatta moltiplicando il numero delle piante/mq per il numero dei mq di ciascuna unità epidemiologica, detto numero è stato processato con l'applicazione Ribess + per la definizione del numero di campioni da prelevare.

In base a quanto sopra nella zona cuscinetto dovranno essere prelevati in totale 3000 campioni di cui 1600 nei primi 400 m.(0,8 campioni x quadrante) e 1400 nella restante parte della zona cuscinetto.(15 campioni x quadrante)

Nell'ambito di ciascun quadrante le piante ospiti o sospette da cui prelevare i campioni saranno individuate seguendo la sentieristica presente nei quadranti stessi e rilevabile dalle Ortofoto in IR riprese nel 2019 che sono disponibili on line su GEOSCOPIO.

5.2 Modalità operative per la realizzazione del campionamento nella zona cuscinetto

Procedere con l'individuazione delle piante ospiti o sospette ed il campionamento effettuando possibilmente le seguenti operazioni:

- Individuare all'interno delle unità epidemiologiche indicate sulle mappe del sito predisposte dal SFR i quadranti come sopra definiti
- Seguire la viabilità presente nei singoli quadranti e percorrerla individuando le piante ospiti o sospette. Nel caso in cui non sia presente viabilità, posizionarsi possibilmente al centro di ciascun quadrante o comunque in un punto ritenuto rappresentativo della situazione presente all'interno dell'area di indagine; Prelevare il numero di campioni (singoli o pool) previsto per ciascun quadrante

da piante preferibilmente sintomatiche o sospette, in assenza di queste, prelevare un campione da piante asintomatiche appartenenti preferibilmente a piante ad alto rischio di infezione dagli esiti dei precedenti rilievi, cercando in ogni caso di distribuire il prelievo dei campioni nel modo più uniforme possibile.

- Applicare a ciascuna pianta campionata una fascetta numerata.

6 Modalità operative generali

Le piante campionate devono essere riconosciute e registrate con genere e specie evitando assolutamente di inserire specie generiche (sp.).

Il prelievo dei campioni dovrà essere registrato mediante tablet sull'Applicazione 'FitoSIRT' come segue:

- Per ciascun quadrante da ispezionare è necessario aprire un nuovo verbale. Indicare nel verbale il numero della unità epidemiologica e del quadrante a cui fa riferimento il verbale.
- Nel corso dell'ispezione, creare un rilievo per ciascuna specie vegetale. Nel caso di campionamento di più specie vegetali nello stesso quadrante aprire un nuovo rilievo per ciascuna specie vegetale.
- Effettuare la registrazione di ciascun campione prelevato all'interno del rilievo della specie campionata, in caso di campioni pool, indicare 'pool' nelle note .

In caso di quadranti inaccessibili aprire un verbale, registrare il quadrante e nella tendina 'accesso' indicare la voce "inaccessibile". Se il quadrante è parzialmente inaccessibile, individuare le piante da campionare nella parte accessibile.

A fine giornata i campioni prelevati dovranno essere portati al laboratorio di Orbetello, Via Guerrazzi, 8. La consegna in laboratorio dovrà essere sempre concordata con il Responsabile del laboratorio SFR. I campioni (dal prelievo fino alla consegna) dovranno essere conservati a una temperatura non superiore ai 5 gradi centigradi

6.1 Modalità di individuazione delle piante da campionare

L'individuazione delle piante da cui prelevare campioni dovrà tenere conto della presenza/assenza di sintomi sulle piante ospiti ed eventualmente su altre piante sintomatiche presenti in ciascuna unità minima di territorio.

L'unità di base per il controllo visivo e per il campionamento è la pianta singola.

La concentrazione batterica nella pianta dipende da vari fattori ambientali e biologici, poiché il batterio è confinato nei tessuti dello xilema, normalmente i tessuti legnosi, i piccioli e le nervature centrali delle foglie sono le parti con le più alte concentrazioni batteriche. A tale proposito le osservazioni dovranno essere rivolte in particolare sulle foglie "formate" (non più erbacee) presenti su rametti lignificati.

Negli arbusti e nelle piante erbacee la ricerca della eventuale presenza di sintomi dovrà essere rivolta su tutta la chioma delle piante ispezionate.

Nel caso di piante arboree le osservazioni dovranno essere rivolte alla parte alta della chioma.

Nel caso di specie a foglia caduca l'ispezione visiva e l'eventuale campionamento dovranno essere realizzati solo in presenza di fogliame dell'anno sviluppatosi su rametti lignificati con accrescimento definitivo.

Al fine di individuare le piante da campionare dovranno essere cercate le sintomatologie aspecifiche di solito assimilabili a bruscatura fogliare (leaf scorch) che in genere caratterizzano precocemente la presenza di infezioni di *Xylella fastidiosa*. Le foglie infette di solito presentano disseccamento della parte apicale o marginale della lamina, disseccamenti che in tempi più o meno rapidi vanno ad interessare le foglie dell'intero rametto, uno o più rametti di una branca, l'intera branca, parte della chioma fino al completo interessamento della chioma e al disseccamento parziale o totale della pianta infetta. In base ai campionamenti realizzati nel focolaio di Monte Argentario la sintomatologia iniziale sopra descritta è stata riscontrata in particolare su *Polygala myrtifolia*, *Prunus dulcis*, *Ficus carica*, *Cercis siliquastrum*, *Eleagnus angustifolia*. Su alcune delle specie vegetali riscontrate infette con maggiore frequenza sono invece state riscontrate alcune differenze significative rispetto alla sintomatologia riportata in bibliografia. In particolare su *Rhamnus alaternus* l'infezione si manifesta inizialmente con ingiallimento fogliare prima localizzato su alcune foglie e poi diffuso su parte della chioma. Talvolta sono state ritrovate piante asintomatiche positive al batterio. *Spartium junceum* presenta ingiallimento o imbrunimento delle parti apicali di uno o più rametti. La sintomatologia si evolve in disseccamento dei rametti e successivamente di parte della chioma. *Calicotome spinosa* presenta ingiallimento delle foglioline su limitate porzioni di rametti che successivamente si espandono e portano al disseccamento dei rametti interessati. I sospetti maggiori comunque sono dati da disseccamenti parziali o totali della chioma. *Cistus salvifolius* e *Cistus monspeliensis* presentano ingiallimenti o arrossamenti fogliari, disseccamento parziale o totale delle foglie, disseccamento di rametti singoli o di parti della chioma. *Rosmarinus officinalis* e *Lavandula angustifolia* di solito presentano avvizzimento parziale delle foglioline aghiformi di alcuni rametti che si evolvono in disseccamento parziale o totale dei rametti interessati fino al disseccamento parziale o totale dell'arbusto.

6.2 Modalità di prelievo dei campioni vegetali

Il campione deve essere prelevato da rami/branche situati in prossimità delle parti sintomatiche e composto da porzioni di tessuto xilematico. Il campione da prelevare dovrebbe contenere rametti o foglie singole nella ragione di 5 a 25 foglie (a seconda delle dimensioni). È necessario che il laboratorio abbia almeno 0.5 - 1 g di piccioli e/o nervature centrali. Al riguardo vedasi la seguente tabella:

Tipologia del campione	Host plants/tipologia di tessuto	Numero minimo di foglie per campione di laboratorio	Peso approssimativo del campione di laboratorio
	Parti basali delle foglie a lamina larga (<i>Coffea</i> , <i>Ficus</i> , <i>Vitis</i> , <i>Nerium</i>)	5	0.5-1 grammo

Campioni da piante con foglie (sintomatiche o asintomatiche)	<i>oleander</i>) con picciolo		
	Piccioli, parti basali di foglie di piccola taglia e sezioni di intersezioni di rametti legnosi (<i>Polygala myrtifolia</i> , <i>Olea sp</i> ,	25	0.5-1 grammo
	Parti basali di foglie di piccola taglia e con poco picciolo. Sezioni di intersezioni di rametti legnosi (<i>Prunus dulcis</i>)	25	0.5-1 grammo
Piante dormienti o talee dormienti	Tessuto xylematico	-	1 grammo

Il prelievo dei campioni si effettua sulle piante sintomatiche o asintomatiche. Le caratteristiche del campione e la tipologia delle matrici vegetali da prelevare possono variare a seconda delle caratteristiche della specie vegetale campionata:

- Specie arboree a foglia caduca: preferibilmente 8 rametti di 15-20 cm con foglie, in alternativa, da settembre in poi, 10-12 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati;
- Specie arboree sempreverdi: preferibilmente 8 rametti di 15-20 cm con foglie in alternativa 10-12 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati;
- Piante erbacee e specie a ciclo annuale: porzioni di fusto/cauli con foglie basali; laddove possibile prelevare l'intera pianta, compresa eventualmente la/e radice/i principale/i.
- Piante arbustive: rametti di 15-20 cm con foglie, ovvero fino a 25 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati;

I risultati dei test analitici sono fortemente dipendenti dalla qualità e tipologia del materiale vegetale oggetto di indagine. Per cui occorre che i prelievi dei campioni vegetali siano fatti in modo omogeneo e puntuale. Di seguito vengono definiti i parametri minimi legati al tipo di campioni prelevati per il laboratorio per le analisi di verifica.

Le analisi su piante asintomatiche sono raccomandate soprattutto per le piante ospiti della sottospecie (allegato 2 Reg. (UE) 2020/1201: *Host plants found to be susceptible to Xylella fastidiosa subsp. Multiplex*), in questo caso il campione deve essere rappresentativo dell'intera parte aerea della pianta. Recenti studi hanno dimostrato che la raccolta dei campioni dovrebbe avvenire preferibilmente nelle parti medio - alte della chioma, in modalità incrociata lungo i quattro punti cardinali, per aumentare la probabilità di rilevamento dei batteri.

Nel caso di piante arboree i campioni non dovrebbero essere prelevati da giovani germogli perché in tali matrici le colonie batteriche sono tendenzialmente basse. Il campione dovrebbe contenere almeno da 4 a 10 rami/ramoscelli a seconda delle dimensioni della pianta.

Le piante oggetto di campionamento dovranno essere contrassegnate con una fascetta numerata per poterle ritrovare con certezza in caso di positività, in caso di campioni pool è sufficiente segnare una pianta campionata posta centralmente rispetto alle altre campionate.

A titolo di esempio si riportano le caratteristiche dei campioni da prelevare in funzione della tipologia delle piante

Piante arboree: (*Olea europea*, *Prunus dulcis*, *Cercis siliquastrum*, *Ficus carica*, ecc..)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	N. di aliquote in caso di campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
3-5 rametti/pianta di 10-15 cm con foglie oppure 5-8 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati. È preferibile prelevare parti legnose immediatamente sottostanti i rametti sintomatici.	Max 5	1 - 2 g (piccioli/nervature centrali/parti apicali germogli/sezioni legnose)	

Piante arbustive: (*Nerium oleander*, *Calicotome spinosa*, *Rhamnus alaternus*, *Spartium junceum*, *Cytisus scoparius*, ecc.)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Numero di aliquote in caso di campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
5-8 foglie mature con picciolo/pianta	Max 8	1 - 2 g (piccioli/nervature centrali)	

Polygala myrtifolia

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Numero di aliquote in caso di campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
3-5 rametti/pianta	Max 8	1 - 2 g (piccioli/parti apicali germogli/sezioni legnose)	

Piccoli arbusti e piante erbacee: (*Lavandula sp.*, *Cistus sp.*, *Rosmarinus officinalis*, *Elichrisum italicum*, *Asparagus* ecc.)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Numero di aliquote In caso di campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio
3-5 parti di pianta	Max 8	1 - 2 g (parti di pianta)

6.3 Misure di profilassi

Al fine di prevenire qualsiasi diffusione dei batteri ad altre piante, è necessario che forbici coltelli o altri attrezzi da taglio vengano disinfettati dopo ogni prelievo di campioni. Tale disinfezione può avvenire con etanolo assoluto o con altri disinfettanti di comprovata efficacia e seguita da successiva asciugatura con carta assorbente. È importante scuotere il campione prima di inserirlo nelle buste con nastro sigillo del SFR per garantire l'assenza di vettori.

Sempre al fine di scongiurare il rischio di trasporto passivo dei vettori è assolutamente necessario che gli operatori impegnati nelle operazioni di ispezione e campionamento prima di uscire dalle zone delimitate di intervento scuotano gli abiti da lavoro, le scarpe, le borse da lavoro e quelle per il trasporto dei campioni al fine di eliminare gli eventuali insetti presenti. Stessa operazione di bonifica dovrà essere realizzata anche all'interno dei mezzi di trasporto spesso utilizzati come rifugio da numerosi insetti fra cui i vettori di *Xylella fastidiosa*.

6.4 Analisi di laboratorio

I campioni prelevati durante le varie fasi operative di eradicazione/monitoraggio dovranno pervenire il giorno stesso del prelievo al laboratorio di Orbetello dove saranno stoccati nei frigoriferi in attesa di essere processati. In tali locali verranno predisposte le aliquote di lavoro di circa 1 grammo di materiale vegetale in apposite

buste tipo bioreba sigillate. Tali buste verranno inserite in buste sigillate del SFR e inviate in sicurezza al laboratorio del SFR di Pistoia ufficialmente delegato alle attività analitiche. Le analisi di laboratorio sono realizzate secondo quanto previsto dall'allegato 4 del Regolamento (UE) 2020/1201, dalle linee guida EPPO (cfr PM7-24 EPPO). La tracciabilità dei campioni avviene in tempo reale al momento del prelievo del campione.

6.5 Misure di sicurezza sul lavoro

I componenti delle squadre di rilevamento dovranno disporre dell'attrezzatura, della strumentazione e delle dotazioni che gli consentano lo svolgimento delle attività secondo i migliori standard qualitativi e di sicurezza in conformità alla normativa vigente e alle disposizioni di sicurezza straordinarie correlate all'attuale fase di emergenza COVID-19.

L'area delimitata è caratterizzata da varie tipologie di zone da ispezionare, ciascuna con asperità e fattori di pericolo differenti che comunque possono rappresentare un rischio per la incolumità degli operatori. A tale proposito è assolutamente necessario prevenire gli eventuali incidenti che possano causare infortuni nel corso delle operazioni di ispezione e campionamento pertanto tutti gli operatori coinvolti sono tenuti a rispettare tutte le norme di prevenzione degli infortuni sul lavoro.

Le aree da ispezionare sono particolarmente eterogenee: giardini pubblici e privati, aree prossime a strade di scorrimento trafficate, aree lungo strade sterrate che si inerpicano sulla montagna, aree di macchia mediterranea più o meno fitta nelle quali sono presenti specie vegetali arboree e arbustive allo stato naturale di cui alcune dotate di lunghe spine appuntite, aree caratterizzate da suoli instabili e da fortissime pendenze anche a picco sul mare, aree retrodunali con vegetazione particolarmente fitta, ecc. Ciascuna delle aree sopra descritte può presentare differenti fattori di rischio pertanto è raccomandata la massima attenzione nella realizzazione delle ispezioni che dovranno essere svolte nella massima sicurezza. Infine non è da sottovalutare la presenza di animali selvatici anche di grosse dimensioni.

Si ricorda che è obbligatorio utilizzare scarpe antinfortunistiche, guanti di pelle o rinforzati, occhiali infrangibili, e nella zone a maggior rischio o nelle operazioni su piante arboree è necessario l'uso del casco protettivo. Poiché le operazioni si svolgono nel periodo primaverile/estivo/autunnale è necessario utilizzare abbigliamento che copra la pelle (gambe e braccia coperte). A protezione della testa e del viso dai raggi solari, quando non è necessario l'uso del casco, è consigliato l'uso di un cappello con tesa. A protezione dalle eventuali punture di insetti è opportuno dotarsi di *stick* anti-insetti, a prevenzione di colpi di calore è opportuno portare sempre almeno una bottiglia di acqua e una crema solare contro le scottature.