

D.M. 10 settembre 1999, n. 356 (1)
Regolamento recante misure per la lotta obbligatoria contro il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*), nel territorio della Repubblica

(1) Pubblicato nella G. U. 15 ottobre 1999, n. 243.

IL MINISTRO PER LE POLITICHE AGRICOLE

Vista la legge 18 giugno 1931, n. 987, e successive modificazioni ed integrazioni, recante disposizioni per la difesa delle piante coltivate e dei prodotti agrari dalle cause nemiche e sui relativi servizi e successive modificazioni;

Visto il regolamento per l'applicazione della predetta legge, approvato con regio decreto 12 ottobre 1933, n. 1700, e modificato con regio decreto 2 dicembre 1937, n. 2504;

Vista la direttiva n. 77/93/CEE Consiglio del 21 dicembre 1976, concernente le misure di protezione contro l'introduzione negli Stati membri di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e successive modificazioni;

Visto il decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, recante «Conferimento alle regioni delle funzioni amministrative in materia di agricoltura e pesca e riorganizzazione dell'amministrazione centrale»;

Visto il decreto legislativo n. 536 del 30 dicembre 1992 che, in attuazione della direttiva n. 91/683/CEE, istituisce il Servizio fitosanitario nazionale;

Visto il decreto ministeriale 31 gennaio 1996, pubblicato nel supplemento ordinario n. 33 alla Gazzetta Ufficiale n. 41 del 19 febbraio 1996, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nel territorio della Repubblica italiana di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali;

Visto il decreto ministeriale 27 marzo 1996, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 81 del 5 aprile 1996, concernente la lotta obbligatoria contro il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*), nel territorio della Repubblica e successive modifiche;

Considerata la necessità di aggiornare il decreto ministeriale 27 marzo 1996 succitato, alla luce delle nuove acquisizioni tecnico-scientifiche;

Udito il parere n. 58/98 espresso nell'adunanza dell'8 ottobre 1998 dal Consiglio superiore dell'agricoltura e delle foreste sullo schema di decreto ministeriale concernente la lotta obbligatoria contro il «colpo di fuoco batterico» (*Erwinia amylovora*);

Visto l'articolo 17, commi 3 e 4, della legge 23 agosto 1988, n. 400;

Udito il parere del Consiglio di Stato n. 52/99 espresso dalla sezione consultiva per gli atti normativi nell'adunanza del 22 marzo 1999;

Vista la comunicazione al Presidente del Consiglio dei Ministri ai sensi dell'articolo 17, comma 3, della legge 23 agosto 1988, n. 400, effettuata con nota n. 7748 del 24 agosto 1999;

Acquisito il parere della conferenza Stato-regioni reso nella seduta del 27 maggio 1999;

Adotta il seguente regolamento:

1. Scopo generale

1. La lotta contro il batterio *Erwinia amylovora*, agente del colpo di fuoco delle pomacee, è obbligatoria nel territorio della Repubblica italiana al fine di prevenirne la introduzione e la diffusione.

2. Ispezioni sistematiche

1. I servizi fitosanitari regionali devono effettuare ogni anno indagini sistematiche mirate ad accertare la presenza del batterio sulle specie di rosacee ospiti, coltivate e spontanee dei generi *Amelanchier*, *Chaenomeles*, *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Sorbus* e *Stranvaesia*, con particolare attenzione ai vivai.

2. Le indagini devono consistere in ispezioni visive delle piante ospiti, per accertare la presenza dei sintomi di colpo di fuoco, e, se del caso, in appropriate analisi batteriologiche conformi ai metodi specificati nell'allegato I.

3. Le ispezioni ufficiali devono essere effettuate, oltre che nei punti della rete di monitoraggio descritta nell'allegato II, nei vivai, nei frutteti, nei giardini, nei parchi pubblici e privati e tra la flora spontanea.
4. I risultati di dette indagini devono essere comunicati al Servizio fitosanitario centrale entro il 30 dicembre di ogni anno.
5. Gli allegati I e II di cui ai precedenti commi 2 e 3, potranno essere modificati ed integrati dal Ministero per le politiche agricole con apposito provvedimento.

3. Denuncia dei casi sospetti

1. È fatto obbligo a chiunque denunciare ogni caso sospetto di colpo di fuoco al Servizio fitosanitario regionale che provvederà ad effettuare ispezioni visive ed eventuali analisi batteriologiche ufficiali.
2. Le regioni devono dare massima divulgazione alla conoscenza dei sintomi e della pericolosità del colpo di fuoco sulle pomacee.
3. In attesa di conferma o smentita di ogni caso sospetto il Servizio fitosanitario regionale al fine di scongiurare la disseminazione di *Erwinia amylovora* può attuare interventi cautelativi, commisurati al rischio stimato, incluso il divieto di trasportare in altro luogo materiali vegetali, contenitori, utensili e macchine dalla azienda, dal vivaio o dall'area in cui si è avuta la manifestazione sospetta. La pianta o le piante sospette devono essere contrassegnate, con divieto di contatto e rimozione.

4. Accertamento ufficiale di un caso

1. Qualora le analisi batteriologiche ufficiali confermino la presenza di *Erwinia amylovora* in un campione di materiale vegetale, il Servizio fitosanitario regionale deve dichiarare contaminata l'area od il campo da cui è stato raccolto il campione e provvedere a far estirpare e distruggere immediatamente ogni pianta visibilmente infetta. In caso di infezioni o focolai primari in zona precedentemente indenne i servizi fitosanitari devono far estirpare e distruggere, in considerazione del rischio fitosanitario, anche le piante ospiti asintomatiche attorno alle piante visibilmente infette fino ad un raggio di 10 metri.
2. In caso di vivai, il Servizio fitosanitario regionale può disporre l'estirpazione e la distruzione delle piante ospiti asintomatiche per un raggio superiore a 10 metri.
3. Il servizio fitosanitario regionale deve altresì istituire una zona di sicurezza, effettuare una indagine tecnico-amministrativa per conoscere l'origine delle piante infette e denunciare immediatamente ogni caso accertato di colpo di fuoco al Servizio fitosanitario centrale.

5. Zona di sicurezza

1. La zona di sicurezza, comprendente un'area di almeno 3,5 km² (raggio di almeno 1 km) attorno al punto del focolaio accertato, deve essere ispezionata con cura e frequentemente per accertare la presenza di sintomi visivi di colpo di fuoco nel resto della stagione vegetativa in cui è avvenuto l'accertamento e per quella successiva; alla terza stagione vegetativa dalla scoperta, la zona di sicurezza può essere tolta se non siano stati accertati ulteriori casi; la stessa area deve essere ispezionata due volte all'anno nei periodi di giugno-luglio e settembre-ottobre.
2. La scoperta di altri casi di colpo di fuoco in una zona di sicurezza deve comportare l'allargamento della stessa zona per almeno 1 km di raggio dal punto di accertamento.

6. Trattamento del focolaio

1. Il Servizio fitosanitario regionale deve ispezionare, per il resto della stagione vegetativa in cui è avvenuto l'accertamento, tutte le piante ospiti dell'area o del campo dichiarato contaminato, controllando anche frequentemente le aree limitrofe.
2. Ogni pianta o parte di pianta con sintomi sospetti di colpo di fuoco deve essere immediatamente estirpata od asportata e distrutta, senza la necessità di analisi batteriologiche di conferma. L'asportazione di parti sintomatiche di fusto deve essere effettuata con taglio ad almeno cinquanta cm dal limite prossimale visibile della lesione.
3. I servizi fitosanitari regionali devono predisporre specifici interventi volti alla eradicazione.

7. Trasporti vietati

1. Per i 12 mesi successivi alla scoperta dell'ultimo caso accertato è vietato trasportare fuori dalla zona di sicurezza o mettervi a dimora piante ospiti di *Erwinia amylovora* o loro parti senza preventiva autorizzazione del servizio fitosanitario regionale.
2. Per i 12 mesi successivi alla scoperta dell'ultimo caso accertato è vietato trasportare fuori dall'area o dal campo dichiarato contaminato materiale vegetale di piante ospiti di *Erwinia amylovora* (inclusi legname, polline, frutti e semi) senza preventiva autorizzazione del servizio fitosanitario regionale.
3. In deroga al primo comma, il servizio fitosanitario regionale può autorizzare la commercializzazione di piante ospiti di *Erwinia amylovora* o loro parti verso zone non protette dell'Unione europea o verso Paesi terzi.

8. Movimentazione alveari

1. È vietato lo spostamento di alveari, nei periodi a rischio, da aree o campi contaminati verso aree indenni.
2. I servizi fitosanitari regionali determineranno annualmente i periodi a rischio e le aree interessate al divieto di movimentazione.

9. Distruzione dalle piante infette

1. L'estirpazione di piante, l'asportazione di parti di piante e la loro distruzione devono essere effettuate a spese del proprietario o del conduttore sotto il controllo del servizio fitosanitario regionale. Le parti di piante devono essere accatastate nel punto di estirpazione delle piante infette o in area limitrofa, e bruciate fino all'incenerimento.
2. Le piante infette o loro parti non possono essere trasportate fuori dall'area o dal campo dichiarato contaminato.
3. Al termine delle operazioni tutti gli strumenti di taglio devono essere sterilizzati in loco per via chimica o fisica.

10. Indagine epidemiologica

1. Il servizio fitosanitario regionale, immediatamente dopo l'accertamento ufficiale di un focolaio primario su vegetali messi a dimora nei due anni prima in un territorio precedentemente indenne, deve effettuare un'ispezione presso i vivai delle ditte da cui provengono le piante infette trovate nell'area o nel campo dichiarato contaminato, estendendola anche al territorio circostante per un raggio di 2 km.
2. Fino al termine della stagione vegetativa dell'anno di accertamento del caso, il servizio fitosanitario regionale deve effettuare altre due ispezioni nonché due nell'anno seguente, nei periodi maggio-luglio e settembre-ottobre. Qualora i vivai della ditta si trovino in altra regione, deve essere avvertito il servizio fitosanitario regionale competente per territorio che effettuerà le dovute ispezioni.
3. I servizi fitosanitari regionali devono trasmettere al servizio fitosanitario centrale i risultati della indagine epidemiologica.
4. Il servizio fitosanitario regionale competente per territorio deve rilevare le destinazioni delle altre spedizioni effettuate, a partire dal mese di settembre dell'anno precedente l'accertamento del focolaio, dalle ditte di cui al primo comma, dandone comunicazione ai servizi fitosanitari delle regioni di destinazione.

11. Detenzione di colture

1. È vietata la detenzione e la manipolazione di colture di *Erwinia amylovora*.
2. Chiunque per mezzo di analisi batteriologiche effettuate in Italia od all'estero identifichi come *Erwinia amylovora* un batterio associato a materiale vegetale presente o prodotto in territorio italiano deve comunicare immediatamente l'avvenuta identificazione al servizio fitosanitario regionale competente che provvederà alla conferma (allegato I).

12. Deroghe

1. Il servizio fitosanitario centrale può autorizzare, fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE, deroghe alle disposizioni dell'articolo 10 del presente decreto per prove o scopi scientifici, nonché lavori di selezione varietale purché tali deroghe non compromettano il controllo dell'organismo nocivo e non creino rischio di disseminazione dello stesso (allegato I).

13. Cessazione zone di sicurezza

1. Nelle aree non riconosciute più come «zone protette», ai sensi della direttiva 77/93/CEE, e successive modificazioni, non sussiste l'obbligo di costituire zone di sicurezza.

14. Contributi per l'estirpazione

1. Le regioni al fine di prevenire gravi danni per l'economia di una zona agricola possono stabilire interventi di sostegno alle aziende per l'estirpazione dei frutteti colpiti dalla malattia.

15. Denuncia degli inadempienti

1. Fatta salva l'applicazione dell'articolo 500 del codice penale è facoltà delle regioni stabilire sanzioni amministrative per gli inadempienti alle disposizioni di cui al presente decreto.

2. Il decreto ministeriale 27 marzo 1996, e successive modifiche, citato nelle premesse è abrogato.

16. Entrata in vigore

Il presente regolamento entra in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Materiali e metodi

1. Isolamento ed identificazione.

1.1. Prelievo dei tessuti infetti dal materiale sintomatico.

Nel corso della stagione vegetativa il materiale sintomatico può consistere in fiori, frutti, foglie, germogli, branche e tronchi, in presenza od in assenza di essudato. In presenza di essudato, prelevarne con ansa qualche goccia e sospenderlo in 3 ml di acqua distillata sterile fino ad ottenere una sospensione leggermente opalescente. In assenza di essudato, si trova il limite delle lesioni e si asportano con bisturi sterile 5 pezzetti di corteccia al bordo dei tessuti infetti, dopo aver asportato gli strati superficiali suberificati. Si preferiscano aree umide ed isole arrossate su branche e tronchi, aloni idropici su fiori e frutti.

1.2. Isolamento.

Macerare 5 pezzetti di tessuto (isodiametrici, di circa 3 mm) in acqua distillata sterile in mortaio, dapprima in 0,1 ml e poi dopo aggiunta di 0,4 ml. Preparare una diluizione decimale in acqua distillata sterile (1:9; v:v) della sospensione dei pezzetti o delle gocce di essudato. Inseminare le sospensioni concentrate e le loro diluizioni decimali su piastre di agar nutritivo al saccarosio (ANS) e mettere le piastre ad incubare in aerobiosi a 27 C. Dopo 48 ore individuare le colonie biancastre, aventi 3-5 mm di diametro, elevate a forma di cupola, lucenti e di aspetto mucoso. Siffatte colonie diconsi comunemente levaniformi. Purificare le colonie levaniformi su piastre di ANS con almeno due trapianti successivi di colonia singola a morfologia tipica. Ottenere da ogni isolamento almeno 5 colture pure.

Conservare le colture pure a - 80 °C in brodo nutritivo-glicerina (15%) od a 4 °C liofilizzate.

1.3. Identificazione.

Sottoporre le colture pure ai saggi: presenza di ossidasi, produzione di pigmento fluorescente, ipersensibilità su foglie di tabacco, patogenicità su pere ed agglutinazione su vetrino con antisiero specifico per *Erwinia amylovora*.

Le colture a colonie levaniformi, ossidasi negative, non producenti pigmento fluorescente, causanti ipersensibilità su tabacco, marciume ed essudato su pere ed agglutinate dall'antisiero specifico possono essere identificate provvisoriamente come *Erwinia amylovora*. L'identificazione provvisoria è necessaria e sufficiente per la definizione di una zona contaminata.

1.4. Conferma della identificazione.

Chiunque identifichi come *Erwinia amylovora* un batterio isolato da materiale vegetale deve inviare la coltura pura ad uno dei seguenti centri diagnostici nazionali per la conferma della identificazione.

Istituto di patologia vegetale - Laboratorio di fitobatteriologia Via Filippo Re, 8 - 40126 Bologna

Istituto di patologia vegetale

Via Valdisavoia, 5 - 95123 Catania

Dipartimento di protezione delle piante dalle malattie

Via Amendola, 165/A - 70126 Bari

Per la spedizione ogni coltura pura, fresca o liofilizzata, deve essere imballata entro un incavo di pannello di polistirolo di adeguato spessore, pressato ai lati da due pezzi di cartone incollati tra loro lungo i bordi mediante nastro adesivo. La coltura pura imballata deve essere messa in sacchetto di polietilene sigillato e spedito con urgenza entro busta foderata. Una spedizione può comprendere più colture. Il centro diagnostico deve essere informato della spedizione con almeno tre giorni di anticipo.

Il direttore dell'istituto, cui afferisce il centro diagnostico, comunica per iscritto agli interessati l'esito dei saggi di conferma entro 14 giorni dal ricevimento delle colture pure. La risposta può essere ritardata di 7 giorni in caso di contaminazione delle colture.

Presso i centri diagnostici la identificazione è confermata mediante saggi comparativi dei profili elettroforetici delle proteine cellulari totali o dei profili degli esteri metilici dei grassi cellulari totali o per la presenza di peculiari sequenze nucleotidiche mediante loro amplificazione con reazione a catena della polimerasi conformemente alle tecniche più aggiornate ed affidabili indicate dalla letteratura specialistica.

1.5. Standard di riferimento.

Ogni saggio morfologico, fisiologico, patogenetico, immunologico e molecolare di identificazione deve essere fatto in presenza di appropriati controlli positivi e negativi, rappresentati da colture pure o loro estratti.

I protocolli della tecnica di isolamento e dei saggi di identificazione sono oggetto di corsi di addestramento a numero chiuso presso i centri diagnostici, che provvedono a predisporre, conservare ed inviare su richiesta gli standard di riferimento.

Le spese per la partecipazione ai corsi di addestramento e per l'acquisizione degli standard di riferimento sono a carico degli interessati.

2. Formulario e protocolli.

2.1. Agar-acqua.

Ha la seguente composizione: Agar 0,5 g; Acqua distillata, 100 ml. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

2.2. YDC-agar.

Ha la seguente composizione: Estratto di lievito, 1 g; Glucosio, 2 g; Carbonato di calcio (Polvere finissima; Merck 2063), 2 g; Agar 1,5 g; Acqua distillata, 100 ml. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Agitare bene per tenere in sospensione il carbonato di calcio prima di farla solidificare a becco di clarino in tubo.

2.3. Colture batteriche.

Le colture pure dei batteri isolati e le colture di riferimento possono essere coltivate ordinariamente su strisci di YDC-agar in tubo incubate a 25-27 °C e conservate temporaneamente a temperature ambiente o più a lungo a 4 °C. Su YDC agar *Erwinia amylovora* ha buona crescita già dopo 24 ore. Per il saggio presenza di ossidasi si allevino le colture su strisci di KB agar (vedi produzione di pigmento fluorescente).

2.4. Agar nutritivo al saccarosio (ANS).

Aggiungere 50 g di saccarosio ad ogni litro di agar CM3 (Oxoid) e sterilizzare in autoclave a 121 C per 15 minuti; alternativamente preparare il substrato aggiungendo 8 g di Bacto-Nutrient Broth (Difco; Cat. 0003-17-8), 50 g di saccarosio e 15 g di Agar ad 1 lt di acqua distillata. Dopo aver sciolto l'agar a 100 °C, regolare a pH 7 con aggiunta di 3N NaOH. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Controllo positivo: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Controllo negativo: *Pseudomonas fluorescens*.

Erwinia amylovora e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* producono su ANS colonie levaniformi.

2.5. Presenza di ossidasi.

Preparare 10 ml di soluzione 1% di tetrametil p fenilendiammonio cloruro (es. Merck 821102) (TMFD) in acqua distillata entro un tubo accuratamente pulito. Ritagliare pezzetti (circa 3 X 3 cm) di carta Whatman n. 1 pulita e riporli entro una capsula petri sterile. Dopo aver posto un pezzetto di carta su una superficie di vetro pulita sterile, depositare al centro del pezzetto una goccia della soluzione di TMFD. Mentre la soluzione sta diffondendo radialmente e la carta è ben impregnata, spalmare al centro della area umida una ansata della coltura pura da identificare, avente 18-24 ore di età. Usare una ansa di platino. In presenza di ossidasi, entro 10 secondi compare una macchia porpora violacea scura nell'areola dove è stata deposta la massa batterica. Si ha reazione debolmente positiva quando la macchia compare dopo 10-30 secondi. Se non compare macchia entro 30 secondi, la reazione è negativa.

Controllo negativo: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Controllo positivo: *Pseudomonas fluorescens*.

2.6. Produzione di pigmento fluorescente.

Si saggia sull'agar nutritivo B di King, Ward e Raney (KB agar) avente la seguente composizione: Proteose Peptone (Difco, Cat. 0122-17-4), 20 g; Glicerina 10 g; K₂ HPO₄, 1,5 g; MgSO₄ .7H₂ O, 1,5 g; Agar 15 g; Acqua distillata, 1 litro.

Dopo aver sciolto l'agar a 100 (elevato a)0 C, regolare a pH 7,2 con aggiunta di 3N NaOH. Sterilizzare in autoclave a 121 (elevato a)0 C per 15 minuti.

Attorno alle colonie delle pseudomonadi fluorescenti cresciute su questo substrato si ha diffusione radiale di pigmenti gialli o verdi o bruni che a luce ultravioletta hanno fluorescenza verde o bleu. L'alone fluorescente è visibile spesso anche alla luce normale di laboratorio. Si tenga presente che certi isolati di *Pseudomonas syringae* non producono pigmento fluorescente su KB agar o lo producono con ritardo e la loro reazione può essere interpretata come negativa.

La presenza di aloni fluorescenti deve essere osservata dopo almeno 3 giorni di incubazione a 27 °C.

Controllo positivo: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Controllo negativo: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

2.7. Patogenicità su pera.

Si usino pere immature di cv. Passa Crassana o Conference da 1-2 settimane dopo la caduta dei petali fino a 2-3 settimane prima della maturità fisiologica. Le piccole pere verdi (maggior diametro di 2-3 cm) possono essere raccolte, immerse in soluzione di ipoclorito sodico per 5 minuti, sciacquate in acqua distillata sterile, asciugate con carta bibula sterile e conservate in frigorifero a 4 °C entro contenitori chiusi per parecchi mesi (non oltre gennaio dell'anno successivo). Durante questo periodo esse tendono a maturare gradualmente e divengono man mano meno idonee al saggio. Possono esser usate anche pere delle stesse cultivar conservate nei frigoriferi industriali. Per il saggio si usino perine intere immature oppure fette trasversali tagliate, capsule Petri aventi sul fondo carta bibula immersa in 2-3 mm di acqua distillata. Le perine siano deposte sulla cavità di piccole capsule Petri già predisposte sulla carta bibula in modo che il frutticino non sia a contatto con l'acqua. Le fette di pera, aventi spessore di circa 1 cm, vanno adagiate su uno strato di agar acqua sterile solidificato al fondo di capsule Petri di adeguate dimensioni. La conservazione entro queste capsule Petri assicura alle perine (od alle fette) una adeguata camera umida postinoculazione.

Per l'inoculazione si conficchi per 3-4 mm la punta di un ago attraverso una goccia di 10 µl di sospensione batterica (concentrazione 10⁸ (elevato a) 8 batteri/ml) entro i tessuti della perina (o della fetta). Su ogni perina (o fetta) possono aversi 4 punti di inoculazione per isolato. Dopo l'inoculazione le capsule Petri siano conservate a 27 °C entro sacchetti di polietilene chiusi. In presenza di *Erwinia amylovora* si può osservare sulle perine (o sulle fette) dopo 3-5 giorni la presenza di goccioline lattiginose di essudato. Una perina inoculata con *Erwinia amylovora* tende a marcire per intero entro una settimana. L'area di perina che *Erwinia amylovora* riesce ad infettare a seguito di inoculazione sperimentale è tanto più grande quanto più giovane è il frutto; di conseguenza le lesioni tendono ad essere circoscritte man mano si avvicina la maturità di raccolta.

Gli isolati di *Pseudomonas syringae* causano entro 1-7 giorni sulle perine (o sulle fette) aree imbrunite di aspetto secco attorno al foro d'inoculazione, senza alcuna produzione di essudato. Per gli isolati di piante ospiti diverse da biancospino e pero è opportuno ripetere a dose doppia le prove di patogenicità su perine o fette di pera, nei casi in cui la prima inoculazione non causa alcun sintomo riferibile ad *Erwinia amylovora*.

Controllo positivo: *Erwinia amylovora* (Ceppo padano).

Controllo negativo I: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Controllo negativo II: Acqua distillata.

2.8. Antisiero.

Si usi un antisiero od anticorpi monoclonali preparati usando come antigene una coltura pura o molecola purificata di *Erwinia amylovora*, messi a punto per la reazione di agglutinazione, di cui sia stata saggiata la specificità con un congruo numero di batteri saprofiti associati a pomacee.

Antisiero o anticorpi monoclonali possono essere richiesti ai centri diagnostici od acquistati in commercio da ditte specializzate.

L'antisiero e gli anticorpi monoclonali devono essere conservati ed usati secondo le indicazioni dei centri diagnostici o delle ditte produttrici.

2.9. Agglutinazione su vetrino.

Si usino vetrini portaoggetto per microscopia, trasparenti, puliti, ma non troppo sgrassati per evitare che le gocce d'acqua depositate sopra si espandano troppo e creino un film troppo sottile.

Depositare separatamente su uno stesso vetrino una goccia di antisiero specifico diluito circa da 1:20 a 1:30 (v:v) con soluzione fisiologica (0,85 g di NaCl in 100 ml di acqua distillata) ed una goccia di sospensione densa di cellule del batterio da identificare. La sospensione deve essere lattiginosa, ben visibile ad occhio nudo, ed avere una concentrazione dell'ordine di 10⁸ (elevato a) 10¹⁰ batteri/ml. Mescolare delicatamente con ansa sterile le due gocce e poi imprimere al vetrino un movimento di oscillazione. In caso di agglutinazione, si nota la formazione di flocculi biancastri entro 1-2 minuti.

Se la flocculazione è immediata, i flocculi sono vistosi e grossolani. Se la flocculazione è ritardata (dopo circa 30 secondi), i flocculi sono piccoli e minuti, osservabili facendo scorrere a film lungo il vetrino la mistura di reazione.

Controllo positivo: *Erwinia amylovora* (ceppo padano).

2.10. Ipersensibilità su foglie di tabacco o baccelli verdi di fagiolo.

Il saggio si effettua su foglie adulte di piante di tabacco (*Nicotiana tabacum* L.), preferibilmente delle cultivar Samsun o White Burley.

Si prepari in acqua distillata sterile in provetta di vetro una sospensione di coltura pura, avente concentrazione dell'ordine di 10⁸ (elevato a) 8 batteri/ml. La coltura deve essere ben cresciuta ed avere 24h

di età. Questa concentrazione è riconoscibile con buona approssimazione allorché osservando contro luce si nota che la torbidità è uniforme ed intensa e che, agitando la provetta, i vortici generati dalle cellule sospese sono facilmente distinguibili; i vortici non sono più osservabili quando la concentrazione è di 10 (elevato a) 7 batteri/ml o di 10 (elevato a) 9 batteri/ml.

Al mattino, con siringa da 1 ml ed ago sottile (numeri da 16 a 20) si infiltri la sospensione appena preparata in zona circoscritta di una area internervale di foglia; più colture possono essere infiltrate in altrettante aree internervali di una stessa foglia. L'area internervale infiltrata deve essere marcata con appropriata etichetta autoadesiva al bordo della foglia.

Durante l'infiltrazione è opportuno disporre sotto alle foglie ed attorno alla pianta fogli di materiale assorbente (es. carta bibula, giornali pluristratificati) in modo da raccogliere eventuali gocce disperse.

Dopo l'infiltrazione, asciugata la superficie della foglia da eventuali gocce residue di sospensione batterica con pezzetti di carta bibula, le piante siano conservate a temperatura di 22-28 °C con alternanza di ore di luce (da 8 a 14) e di buio.

In caso di ipersensibilità, già dopo 24 ore si osserva che la intera zona internervale infiltrata con la coltura pura è collassata ed imbrunita. Questa risposta è comunemente indicata come necrosi ipersensibile confluyente. Nei giorni successivi la zona ipersensibile dissecca ulteriormente ed assume consistenza papiracea.

Erwinia amylovora e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (od altre patovar), ma non i batteri saprofiti, causano necrosi confluyente ipersensibile.

Controllo positivo: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Controllo negativo: Acqua distillata.

2.11. Distruzione dei materiali infetti o contaminati.

I campioni di piante infette, le piante o le foglie di tabacco, le perine o le fette di pera usati per gli isolamenti e l'identificazione, tutti i materiali assorbenti contaminati e qualsiasi altro oggetto venuto in contatto con i germi di *Erwinia amylovora* devono essere raccolti in sacchetti autoclavabili e sterilizzati in autoclave a 121 C per 15 minuti.

Allegato II

1. Rete nazionale di monitoraggio.

Deve essere approntata secondo le indicazioni della circolare ministeriale del 4 agosto 1991, integrate da quelle del presente allegato.

La rete nazionale si compone di tre reti interregionali continentali (setentrionale, tirrenica e adriatica) e di due reti insulari (Sardegna e Sicilia). La rete interregionale settentrionale è composta dalle reti delle regioni Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Liguria, Lombardia, Marche, Piemonte, Val d'Aosta, Veneto e delle province autonome di Trento e di Bolzano. La rete interregionale tirrenica è composta dalle reti delle regioni: Calabria, Campania, Lazio, Toscana ed Umbria. La rete interregionale adriatica è composta dalle reti delle regioni Abruzzo, Lucania, Molise e Puglia.

2. Reti regionali di monitoraggio.

Ogni rete regionale è costituita da punti e linee, è gestita dal servizio fitosanitario regionale e si avvale di un centro diagnostico.

2.1. Punti di monitoraggio.

Sono piante ospiti di *Erwinia amylovora*, singole od a gruppi, distanti tra loro circa km 5. Devono essere disposte preferibilmente lungo vie di comunicazione ed essere facilmente identificabili da un ispettore in auto. Ogni punto ha una propria scheda su cui sono annotati coordinate geografiche, punti di riferimento, fotografie, strade di accesso e risultati delle ispezioni.

2.2. Linee di monitoraggio.

Sono costituite da piante ospiti di *Erwinia amylovora* distribuite continue od a breve interdistanza su lunghi tratti di strade, autostrade, corsi d'acqua e linee ferroviarie. Ogni linea ha una propria scheda come i punti.

2.3. Ispettori.

Sono membri del servizio fitosanitario regionale o persone da esso autorizzate a compiere le ispezioni dei punti e delle linee.

2.4. Ispezioni.

Sono fatte in auto lungo itinerari prestabiliti secondo la distribuzione dei punti e delle linee di monitoraggio nel territorio. Ogni punto o linea è ispezionato due volte all'anno, nei periodi maggio-luglio e settembre-ottobre.

2.5. Centri diagnostici.

Ogni rete regionale ha un centro diagnostico cui gli ispettori inviano i campioni sospetti. I centri effettuano l'analisi batteriologica dei campioni, comprendente l'isolamento di *Erwinia amylovora* e la sua identificazione provvisoria per la costituzione delle zone contaminate.