



REGIONE PUGLIA



 **Consiglio Nazionale
delle Ricerche**

Bridging field and laboratory data: operational procedures to ensure traceability and outbreak management

Francesco Palmisano (RPPO, IT)

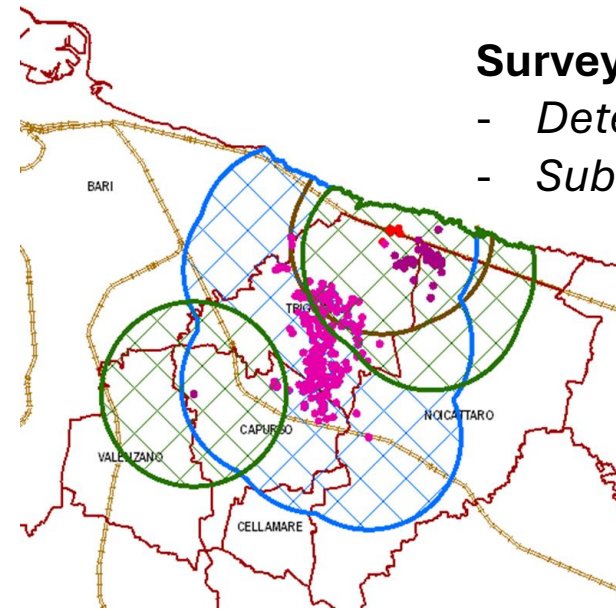
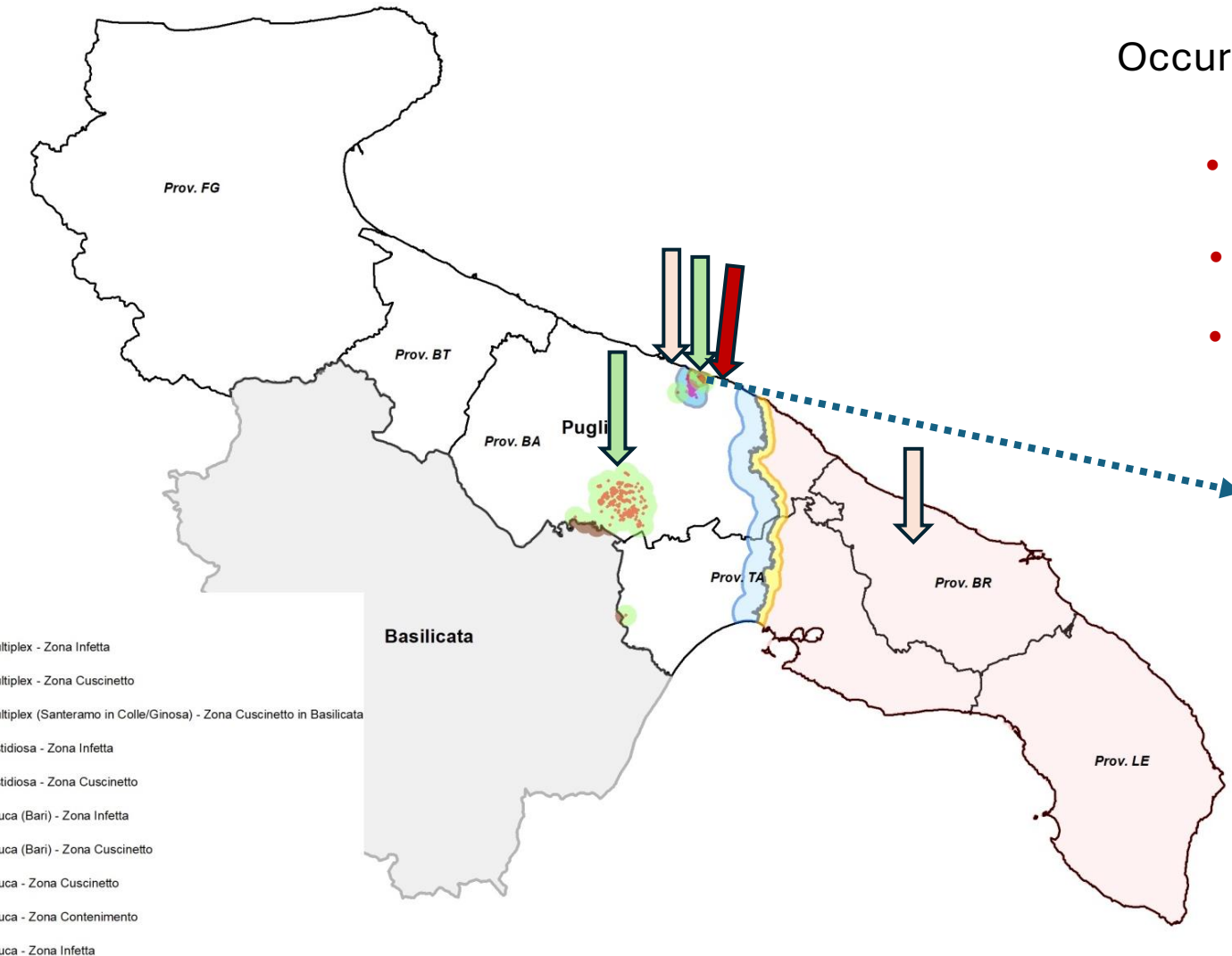
Maria Saponari (CNR, IT)

6th EPPO Workshop for Heads of Plant Pest Diagnostic Laboratories
Saku (EE), 2025-03-06/07

Current situation - *Xylella fastidiosa* in Apulia Region - Italy

Occurrence of Xf isolates belonging to **3 subspecies**

- **Pauca**: «olive» isolates, epidemic and new outbreaks
- **Multiplex**: almond
- **Fastidiosa**: grapes & almond

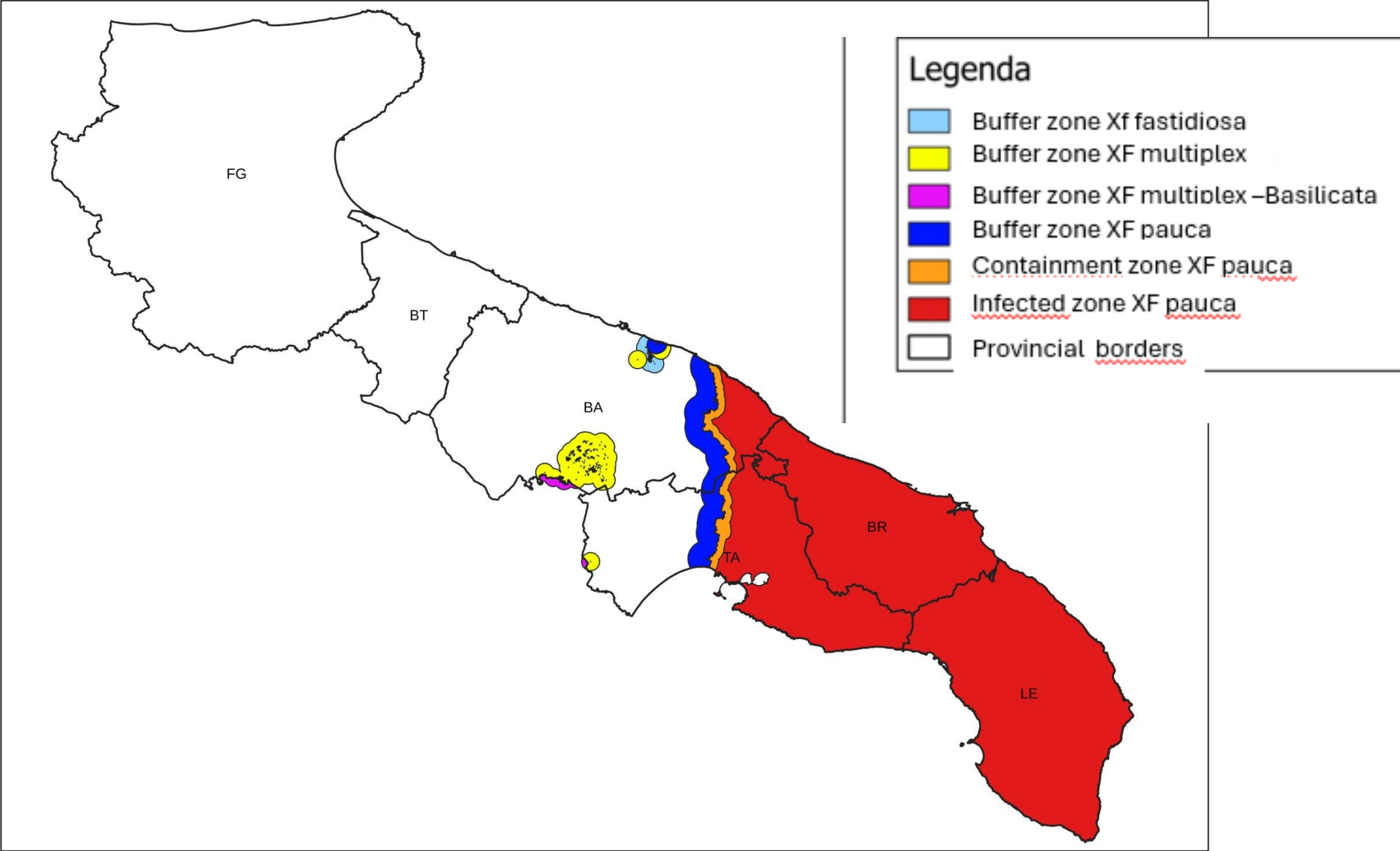


Surveys:

- Detection/delimiting
- Subspecies identification

Common hosts:
eg. Almond,
Polygala

Demarcated areas for *Xylella fastidiosa* in Apulia Region - Italy



Sampling unit
Grid cells (= 1 hectar)

Number? – defined based on RIBESS+ (2 levels of risks  )



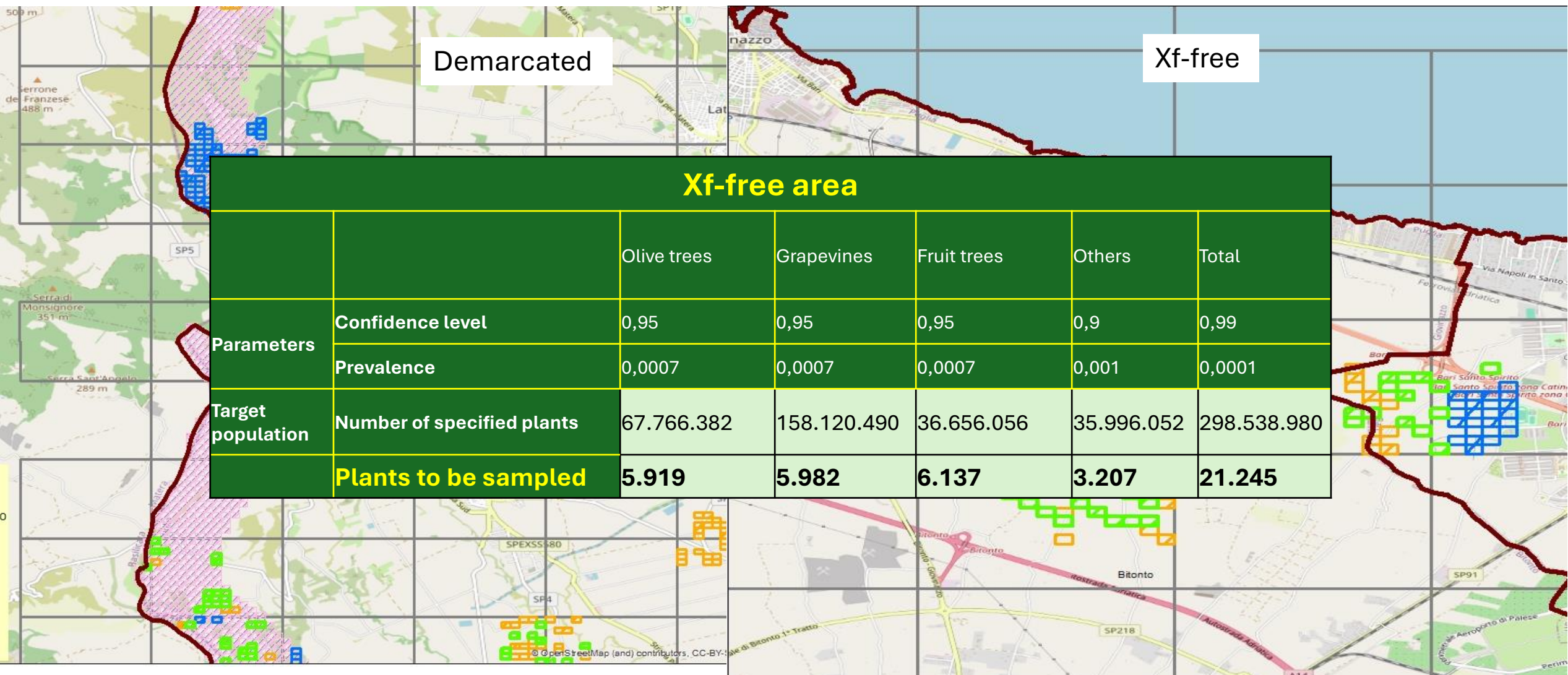
Olive grove



Fruit crops

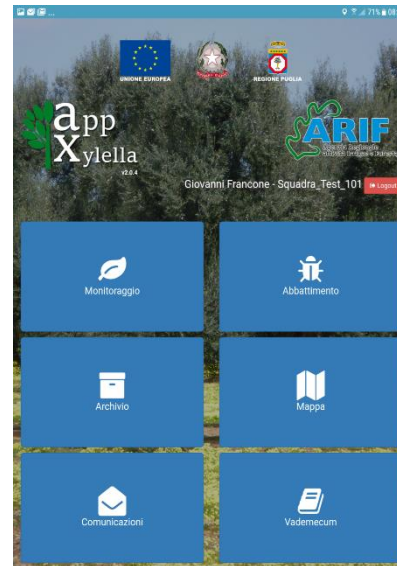


Other species

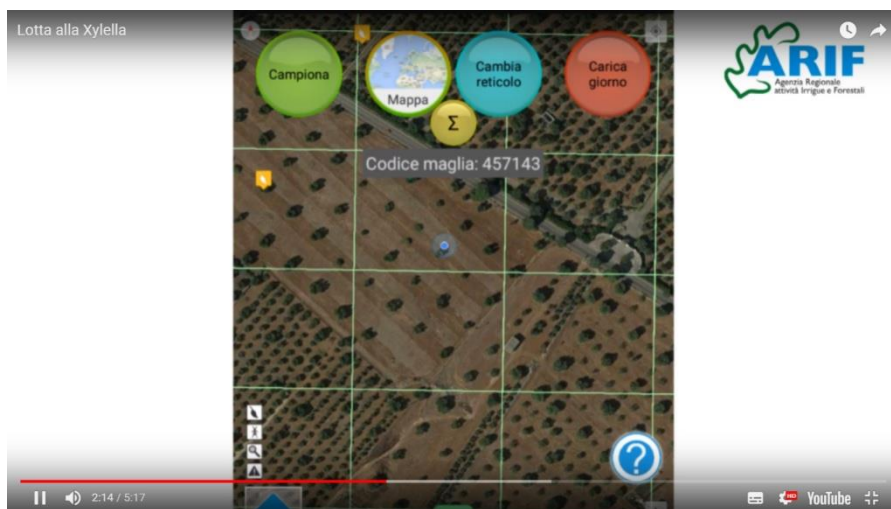


SAMPLING: 1° STEP – visual inspection and collection of shoots/leaves

The APP assign to each team the grid cells to sample on a daily basis



Field team: 2 technicians
Each team is identified by an ID



SAMPLING VINEYARDS (recent outbreak, gap of knowledge for the epidemiology): 1 pooled sample from the border rows, 1 pooled sample from vines inside the vineyard randomly selected



For each tree/plant sampled: the team fill the info on the APP and a label for the bag



Cod. SQUADRA: 2425
DATA: 24/02/25
ID Giornaliero: 37
SPECIE: olivo
SINTOMI: ASSENTI
COD. POOL: 438114-24-9-2

207518

Cod. SQUADRA: 003634
DATA: 03/03/2025
ID Giornaliero: 12
SPECIE: ITA NDORWO
SINTOMI: ASSENTI
COD. POOL: 438114-24-9-2

Nuovo Campionamento

Tipo sintomo *

Maglia *

Quadrante *

Specie consociata *

Presenza vettore *

Stadio biologico vettore

Consulta mappa

INDIVIDUAL AND POOLED SAMPLES



Max 4 samples for Prunus spp.



Each sample:
Unique ID of the bag



Each sample:
Unique ID of the bag

Once the team complete the field work - all information are sent to the database (accessible by all laboratories and inspectors)

Campione - Data rilevamento: 03/03/2025 - Codice Squadra: 003634 - Id giornaliero: 3

<div><div>Id</div><div>1811301</div></div>	<div><div>Data rilevamento</div><div>03/03/2025</div></div>	<div><div>Codice Squadra</div><div>003634</div></div>	<div><div>Id squadra</div><div>1</div></div>	<div><div>Id giornaliero</div><div>3</div></div>	<div><div>Componenti squadra</div><div>Piero Conte</div></div>
<div><div>Tipologia</div><div>Campione</div></div>	<div><div>Codice busta</div><div>273600</div></div>	<div><div>Sub</div><div></div></div>	<div><div>Codice pool</div><div>438114-24-9-1</div></div>	<div><div>Zona</div><div>ZONA INDENNE</div></div>	<div><div>Codice ettaro</div><div>438114-24-9</div></div>
<div><div>Specie</div><div>Olivo (Olea europaea)</div></div>	<div><div>Cultivar</div><div>Altro</div></div>	<div><div>Eta</div><div>Da 50 a 100 anni</div></div>	<div><div>Sintomo</div><div>Assente</div></div>	<div><div>Tipo sintomo</div><div></div></div>	<div><div>Monumentale</div><div></div></div>
<div><div>Note</div><div></div></div>	<div><div>Specie principale</div><div>SI</div></div>	<div><div>Specie consociata</div><div>Frutteto</div></div>	<div><div>Sesto d'impianto</div><div>Non regolare</div></div>	<div><div>Dimensioni</div><div></div></div>	<div><div>Fase fenologica</div><div>Stasi vegetativa</div></div>
<div><div>Stato colturale</div><div>Coltivato, Discreto</div></div>	<div><div>Ultime operazioni colturali</div><div>Altro</div></div>	<div><div>Presenza vettore</div><div>NO</div></div>	<div><div>Stadio vettore</div><div></div></div>	<div><div>Altre patologie</div><div></div></div>	<div><div>Maglia</div><div>438114</div></div>
<div><div>Quadrante</div><div>SO</div></div>	<div><div>Latitudine</div><div>41.0796726228</div></div>	<div><div>Longitudine</div><div>16.8449431658</div></div>	<div><div>Comune</div><div>Bari</div></div>	<div><div>Esito pool</div><div></div></div>	<div><div>Data/ora esito laboratorio pool</div><div></div></div>
<div><div>Analisi secondo livello pool</div><div></div></div>	<div><div>Laboratorio</div><div>CNR</div></div>	<div><div>Esito laboratorio</div><div></div></div>	<div><div>Operatore laboratorio</div><div></div></div>	<div><div>Note laboratorio</div><div></div></div>	<div><div>Analisi secondo livello</div><div></div></div>
<div><div>Data/ora esito laboratorio</div><div></div></div>	<div><div>Esito qPCR (Ouyang et al., 2013)</div><div></div></div>	<div><div>Data saggio</div><div></div></div>			
<div><div>Sottospecie</div><div></div></div>					
<div><div>DDS</div><div></div></div>					
<div><div>Foto</div><div></div></div>					

Id

1811301

UNIQUE ID n° assigned to the sample

Tissue preparation: example of grapes

UNIQUE ID n° assigned to the sample



Tissue preparation: example for olive



Tissue preparation: example for almond (sample collected end of february 25)



Individual samples: 0,4-0,6g

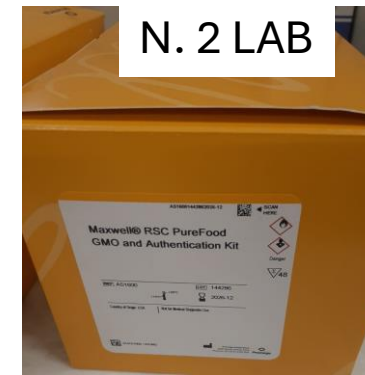
Pooled samples: 1,0-1,4g

DNA preparations

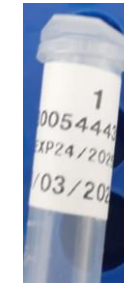


→ 5
LABORATORIES
(3 - ISO 17025)

EPPO 7/24 (5)



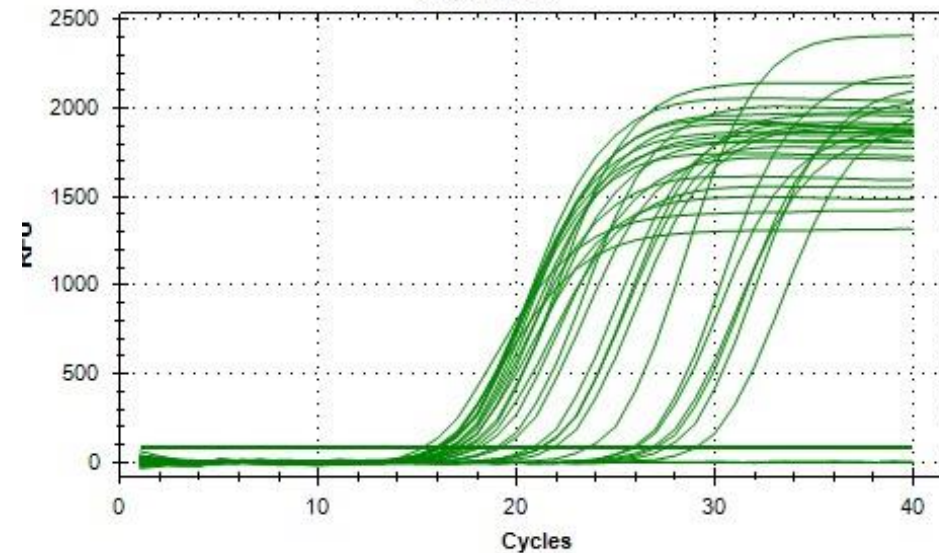
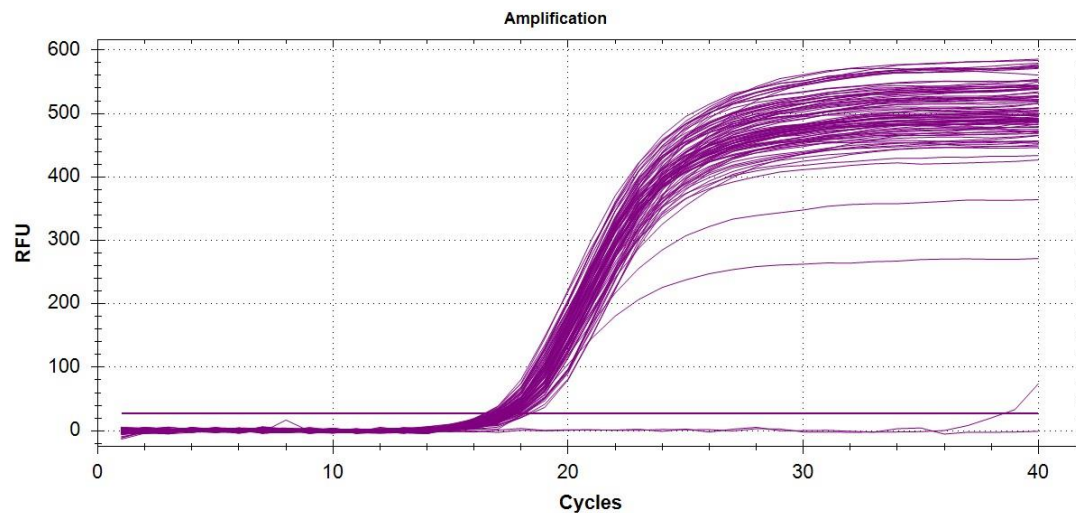
N. 2 LAB
CTAB PROTOCOL



DNA extracts

qPCR

Simplex or duplex with the internal control «COX»



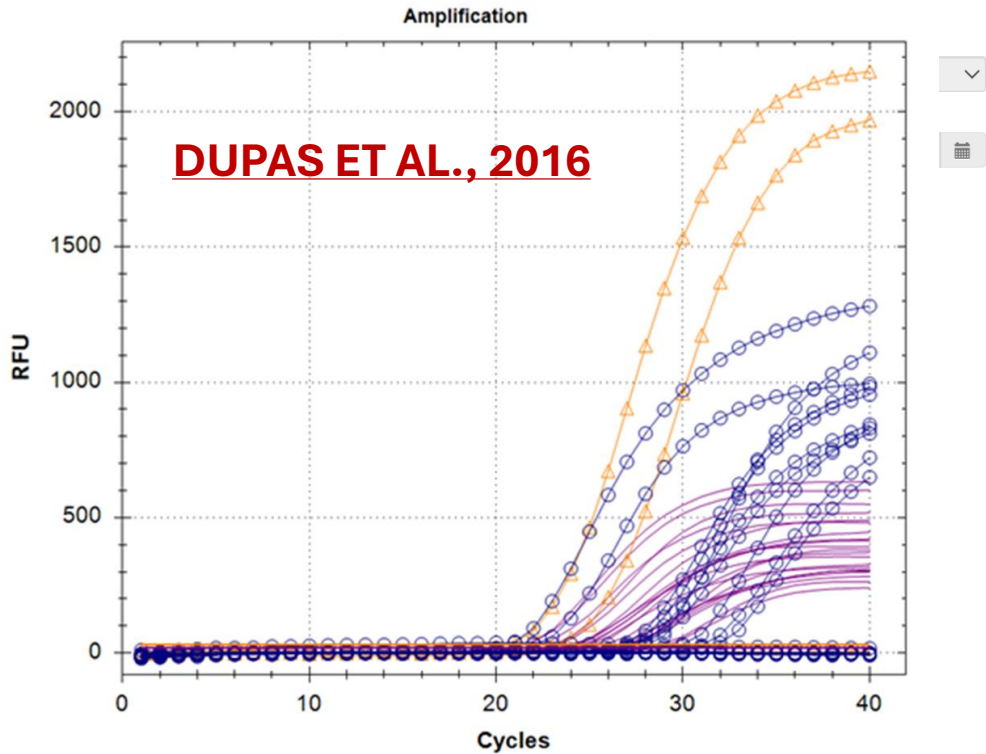
Harper et al., 2010)

Id 1811301	Data rilevamento 03/03/2025	Codice Squadra 003634	Id squadra 1	Id giornaliero 3	Componenti squadra Piero Conte
Tipologia Campione	Codice busta 273600	Sub	Codice pool 438114-24-9-1	Zona ZONA INDENNE	Codice ettaro 438114-24-9
Specie Olivo (Olea europaea)	Cultivar Altro	Eta Da 50 a 100 anni	Sintomo Assente	Tipo sintomo	Monumentale
Note	Specie principale SI	Specie consociata Frutteto	Sesto d'impianto Non regolare	Dimensioni	Fase fenologica Stasi vegetativa
Stato colturale Coltivato, Discreto	Ultime operazioni colturali Altro	Presenza vettore NO	Stadio vettore	Altre patologie	Maglia 438114
Quadrante SO	Latitudine 41.0796726228	Longitudine 16.8449431658	Comune Bari	Esito pool	Data/ora esito laboratorio pool
Analisi secondo livello pool	Laboratorio CNR	Esito laboratorio	Operatore laboratorio	Note laboratorio	Analisi secondo livello
Data/ora esito laboratorio	Ente accreditato	Esito qPCR(Francis et al., 2006)	Esito qPCR(Harper et al., 2010)		
Sottospecie	Operatore ente accreditato	Note secondo livello	Data/ora esito di secondo livel		
DDS	Da abbattere No	Abbattimento			

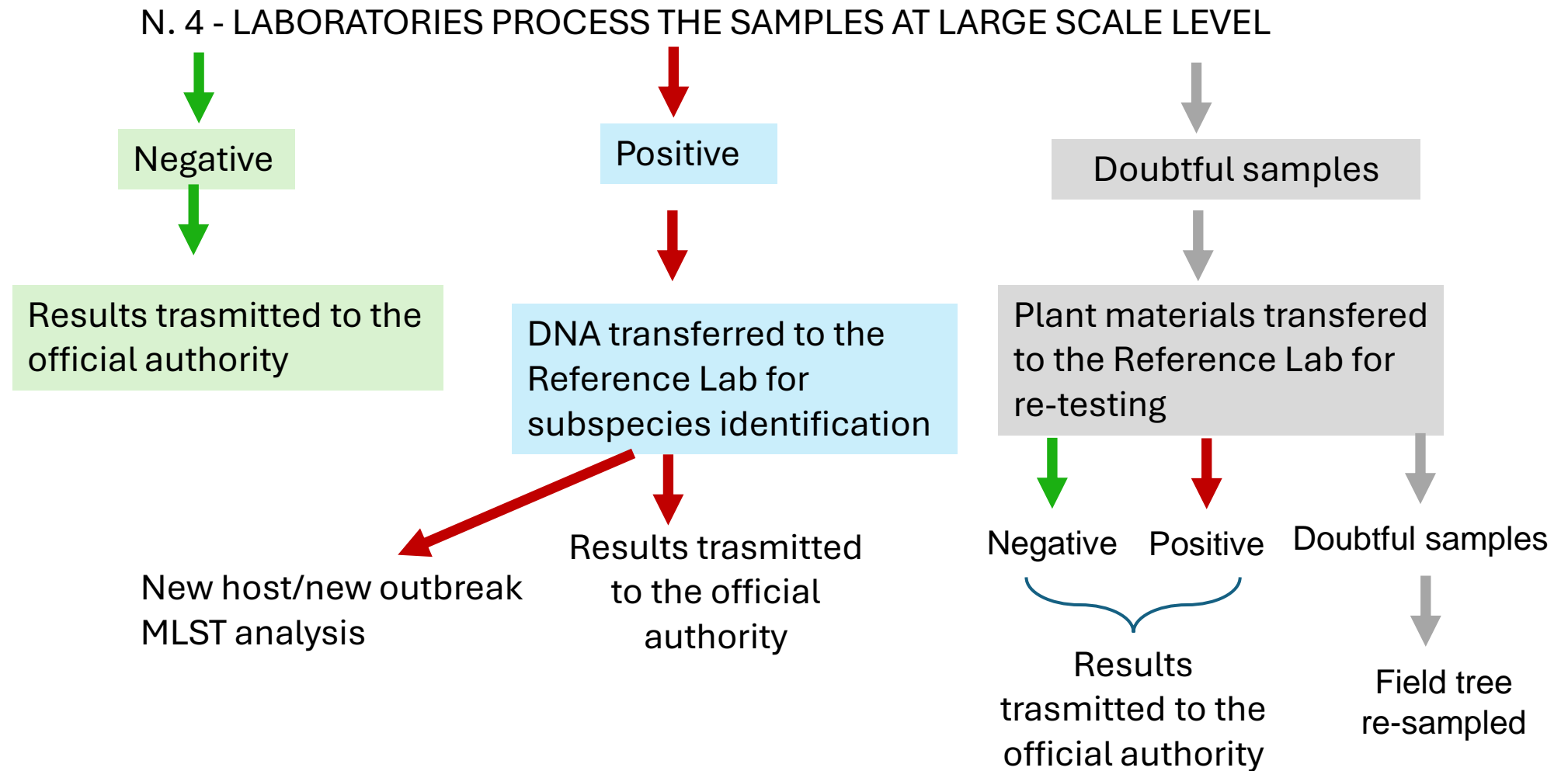
Foto



ALL POSITIVE SAMPLES ARE SUBJECTED TO
qPCR for SUBSPECIES IDENTIFICATION



Laboratory workflow (4 official Labs and 1 reference Lab)



PRACTICAL EXAMPLE of the diagnostic reports and timing

Official LAB detected a positive (samples are tested within 5-6 days)

Prot.347/Ldf/2025

Locorotondo, 20 febbraio 2025

Al Dirigente Responsabile del Servizio Fitosanitario
Regione Puglia
Lungomare N. Sauro, 45/46
70121 Bari

Oggetto: trasmissione esito saggi di primo livello campioni POSITIVI area CUSCINETTO.

Con riferimento ai saggi di primo livello relativi all'accertamento della presenza di *Xylella fastidiosa*, mediante tecnica molecolare (EPPO PM 7/24 rev.5 2023), in allegato si trasmettono i risultati per i campioni consegnati al laboratorio il 13 febbraio 2025.

Si precisa che il documento redatto e gestito dalla Regione Puglia è stato compilato dal referente del CRSFA delle analisi per *Xylella fastidiosa* nell'ambito dell'attività di monitoraggio della Regione Puglia del CRSFA, come richiesto dallo stesso ente e riporta i dati riferiti ai soli campioni dell'area INFETTA risultati Positivi all'analisi. Gli stessi dati sono parte di quelli presenti nel rapporto di prova prot. n. 341 del 20-02-2025.

Referente analisi per *Xylella fastidiosa*
Nell'ambito dell'attività di monitoraggio della Regione Puglia
Dott.ssa Maria Rosaria SILLETTI

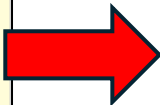
IL DIRETTORE

Prot. Franco NIGRO

IL PRESIDENTE

Rag. Michele LISI


Iscrizione REA c/o CCIAA di Bari al n. 373158. Registro Persone Giuridiche c/o Tribunale di Bari al n. 276 CF 91040360728 P. IVA 04563060724
Via Cisternino, 281 | 70010 Locorotondo (BA) | Tel. 080-4313071 - 080-4313223
e-mail: info@crsfa.it - crsfa@caramia.it | legalmail.it



LABORATORIO CRSFA							
RAPPORTO DI PROVA N° PROT. 347 DEL 20/02/2025							
ID CAMPIONE	DATA RILIEVO	SPECIE	COMUNE	Latitudine	Longitudine	ESITO ANALISI - PCR in tempo reale sulla base di Harper et al., 2010	DATA ANALISI
1804378	13/02/2025	Mandorlo (Prunus dulcis)	Triggiano	41,05178057	16,9514474	POSITIVO	19/02/2025

DOCUMENTO REDATTO E GESTITO DALLA REGIONE PUGLIA
COMPILATO DAL PERSONALE DEL LABORATORIO DI DIAGNOSI FITOPATOLOGICA DEL CRSFA E, COME RICHIESTO
Dallo stesso ente, riportante i dati riferiti ai soli campioni dell' area infetta positivi all'analisi (gli
stessi dati sono parte di quelli presenti nel rapporto di prova prot. n. 341 del 20-02-2025)

2 days later - The Reference LAB identified the subspecies



Consiglio Nazionale
delle Ricerche

Istituto per la Protezione Sostenibile delle PiantepSP

Laboratorio di diagnosi fitosanitaria

Rapporto di Prova 22F/2025

Bari21/02/2025

Al Dirigente Responsabile
del Servizio Fitosanitario
Regione Puglia
Lungomare N. Sauro, 45/46
70121 BARI

Oggetto:

Trasmissione esito saggio molecolare per l'identificazione della sottospecie di *Xylella fastidiosa* su campioni provenienti dalla zona cuscinetto *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* e zona infetta *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*

Con riferimento ai campioni di vite europea e *Prunus dulcis*, consegnati in data 20/02/2025 dal tecnico Arif Sig. Michele Prisciandaro da parte del CRSFA, con la presente si comunicano gli esiti delle analisi per l'identificazione della sottospecie utilizzando il protocollo qPCR descritto da Dupas et al. (2019) come previsto nel Regolamento di Esecuzione (UE) 2024/2507 che modifica l'Allegato IV del Regolamento UE 1201/2020.

Restando a disposizione per ulteriori dettagli, si porgono cordiali saluti.

Laboratorio multisito CNR-IPSP
SEDE ISTITUZIONALE Strada delle Cacce 73, 10135 TORINO
SEDE DI BARI - Via Amendola 165/A, 70126 BARI
CF 80054330588 - P.IVA 02118311008

1/3





Consiglio Nazionale
delle Ricerche

Istituto per la Protezione Sostenibile delle PiantepSP

Laboratorio di diagnosi fitosanitaria

Dettagli ed esiti relativi all'identificazione della sottospecie sui campioni consegnati in data 20/02/25:

Codice accettazioneEXP 22/2025

Codice univoco campione	Codice committente	Latitudine	Longitudine	data campionamento	Codice Pool di appartenenza	Specie	DNA/ Tessuto vegetale	Campione pool/singolo	ANALISI MOLECOLARE PER IDENTIFICAZIONE SOTTOSPECIE			
									<i>Xylella fastidiosa</i>			Data prova
									Esito saggio Dupas et al., 2019			
									<i>fastidiosa</i>	<i>multiplex</i>	<i>pauca</i>	
1_EXP22/25_206 /54-1	1804248	41,05144201	16,95191138	13/02/2025	438123-28-26-1	Vite europea	DNA	Singolo	Rilevata	Non rilevata	Non rilevata	21/02/2025
2_EXP22/25_206 /54-2	1804256	41,0514707	16,95184654	13/02/2025	438123-28-26-1	Vite europea	DNA	Singolo	Rilevata	Non rilevata	Non rilevata	21/02/2025
3_EXP22/25_206 /54-3	1804274	41,05147905	16,95161897	13/02/2025	438123-28-26-1	Vite europea	DNA	Singolo	Rilevata	Non rilevata	Non rilevata	21/02/2025
4_EXP22/25_206 /55-4	1804378	41,05178057	16,9514474	13/02/2025	438123-27-26-2	<i>Prunus dulcis</i>	DNA	Singolo	Rilevata	Non rilevata	Non rilevata	21/02/2025

Example for a new outbreak of a different Xf subspecies

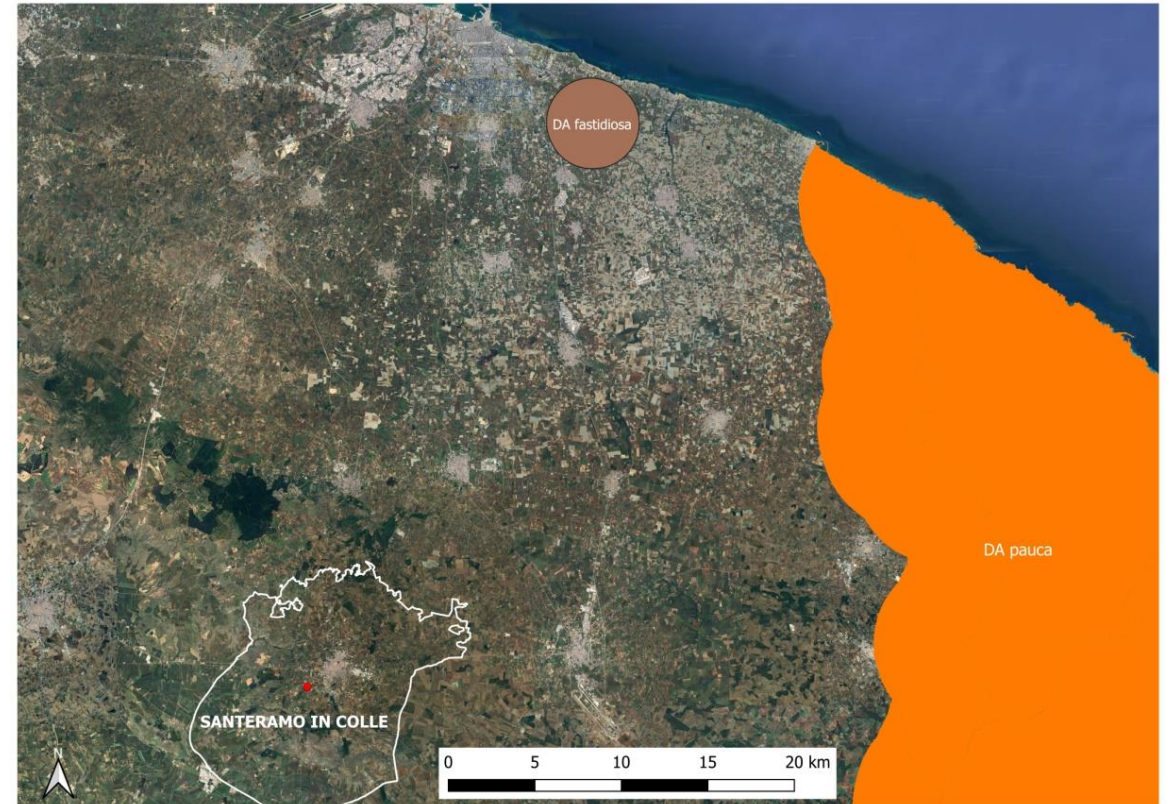
20/03/2024

Surveillance Xf-free for the olive isolates:
A pool of 7 almond trees tested positive in
the Xf-free area



02/04/2024

Reference Laboratory confirmed
the detection of the bacterium in 2
trees of the pool



Timing

03/04/2024
Reference lab
reported the results of
the subspecies
identification: multiplex



Il Responsabile
Bari, 02/04/24

Al Dirigente Sezione
Osservatorio Fitosanitario
Regione Puglia
Lung. Nazario Sauro 41
70121 BARI

Oggetto: Identificazione della sottospecie di *Xylella fastidiosa* e del ceppo su campione infetto di *Prunus dulcis* rinveniente da focolaio in zona indenne.

Con riferimento ai due campioni di *Prunus dulcis* (ID-cod.busta 2471663 e 2471668) provenienti dall'in agro di Santeramo (BA) e risultati positivi al saggio qPCR per *Xylella fastidiosa* (Rapporto di Prova CNR-IPSP. 36/24 trasmesso con nota Prot. 105541 del 27/03/24), con la presente si comunica che su un'aliquota del DNA estratto dal campione ID-cod. busta 2471668 è stata effettuata l'analisi molecolare mediante il saggio di 'Tipizzazione MLST (Multi Locus Sequence Typing)', sulla base di Yuan et al. (2010), per la identificazione del ceppo e della sottospecie. Il profilo allelico determinato per i 7 geni amplificati e sequenziati dal suddetto campione è risultato essere il seguente:

Gene	leuA	malF	holC	cysG	gltI	nuoL	petC	ST*
Allele	5	3	6	3	5	3	3	26

*sequence type=genotipo

Sulla base delle analisi comparative con i profili allelici sinora noti e disponibili in banca dati (pubmlst.org/organisms/xylella-fastidiosa/), il profilo allelico determinato per il campione ID-cod. busta 2471668 corrisponde al genotipo ST26 appartenente alla sottospecie *multiplex*.

NOTIFICATION OF THE PRESENCE OF A PEST TO THE COMMISSION AND TO OTHER MEMBER STATES		Draft No. 19607
Member State: IT - ITALY	2.1 - Notification from: SERVIZIO FITOSANITARIO CENTRALE	2.2 - Official contact: CARLO FRANCESCO CESARONI cf.cesaroni@politichesagricole.it +39.0646656193
Initial Notification date: 2024-03-29 00:00:00	National reference number: IT/16/2024/2030 Update No. & Date: 01/2024-03-29	
1 - General Information		
1.1 - Details of the identity of the pest		
1.1.1 - Title: Update no 1. Presence (confirmed) of Xylella fastidiosa subsp. multiplex in ITALY (Santeramo in Colle)		
1.1.2 - Scientific name of the pest: Xylella fastidiosa subsp. multiplex	1.1.3 - EPPO preferred name: Xylella fastidiosa subsp. multiplex	
1.1.4 - EU category of pest: Annex II B	1.1.5 - EPPO category of pest: A2 list	
Further information:		
1.2 - Executive summary		
1.2.1 - Short summary of the information submitted in points 3-7:		
1.2.2 - Summary of information provided in this update: Confirmation of the presence of a pest.		
1.2.3 - Reason for exceeding the 8 working day deadline from after official confirmation of the presence of a pest to notification (Article 32.1 of Regulation (EU) 2019/1715):		
1.3 - Type of presence reported: Presence (confirmed)		
3 - Location of presence of pest		
3.1 - Administrative region of the location of presence of pest		
1 - NUTS year NUTS I NUTS II NUTS III Local Administrative Unit Other	2021 Sud (ITF) Puglia (ITF4) Bari (ITF47) Santeramo in Colle	
3.2 - Further information about location: "Please refer to boxes 6.1.4 and 7.3.2 where available"		
4 - Reason for notification, pest status of the area, and the Member State concerned		
4.1 - Reason for the notification <input checked="" type="radio"/> Confirmed or suspected appearance of the pest in part of the territory of the Member State concerned, in which its presence was previously unknown.		
4.2 - PEST STATUS of the AREA where the pest has been found to be present, AFTER the OFFICIAL CONFIRMATION.		
4.3 - PEST STATUS in the MEMBER STATE concerned BEFORE the OFFICIAL CONFIRMATION of the presence, or suspected presence, of the pest.		
4.4 - PEST STATUS in the MEMBER STATE concerned AFTER the OFFICIAL CONFIRMATION of the presence of the pest.		



REGIONE
PUGLIA

Dipartimento Agricoltura, Sviluppo Rurale ed
Ambientale
Sezione Osservatorio Fitosanitario

ATTO DIRIGENZIALE

Codifica adempimenti L.R. 15/08 (trasparenza)	
Ufficio istruttore	Sezione Osservatorio Fitosanitario
Tipo materia	ALTRO
Materia	ALTRO
Sotto Materia	ALTRO
Riservato	NO
Pubblicazione integrale	SI
Obblighi D.Lgs 33/2013	NO
Tipologia	Nessuno
Adempimenti di inventariazione	NO

N. 00029 del 08/04/2024 del Registro delle Determinazioni della AOO 181

Codice CIFRA (Identificativo Proposta): 181/DIR/2024/00033

OGGETTO: Individuazione di focolaio di Xylella fastidiosa sottospecie multiplex ST26 in agro di Santeramo in Colle (BA) – Istituzione dell’area delimitata ai sensi dell’art. 4 del Reg. UE 2020/1201.



Act n. 43 from 22/04/2024 (Eradication measures)



REGIONE
PUGLIA

Dipartimento Agricoltura, Sviluppo Rurale ed
Ambientale
Sezione Osservatorio Fitosanitario

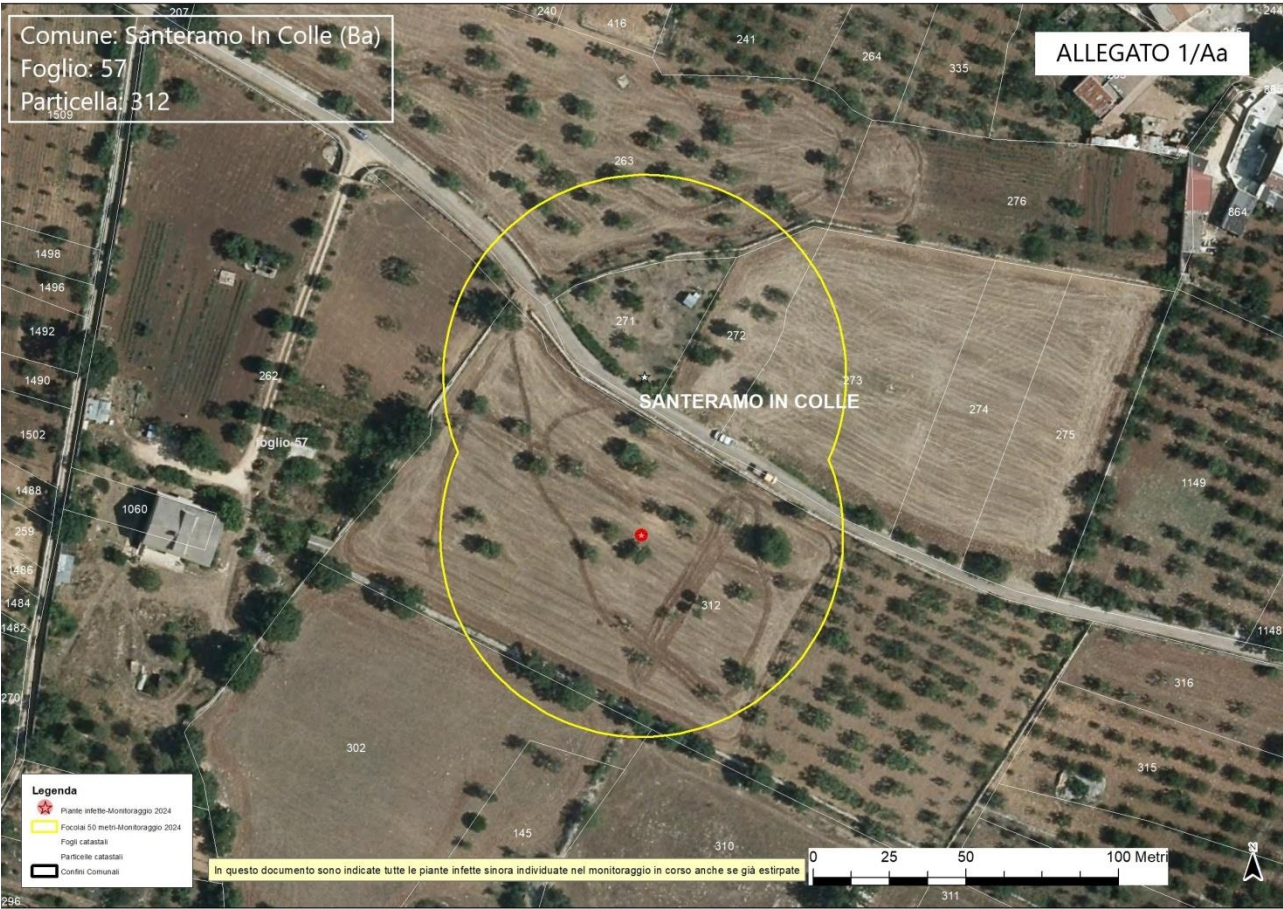
ATTO DIRIGENZIALE

Codifica adempimenti L.R. 15/08 (trasparenza)	
Ufficio istruttore	Sezione Osservatorio Fitosanitario
Tipo materia	ALTRO
Materia	ALTRO
Sotto Materia	ALTRO
Riservato	NO
Pubblicazione integrale	SI
Obblighi D.Lgs 33/2013	NO
Tipologia	Nessuno
Adempimenti di inventariazione	NO

N. 00043 del 22/04/2024 del Registro delle Determinazioni della AOO 181

Codice CIFRA (Identificativo Proposta): 181/DIR/2024/00040

OGGETTO: Reg. (UE) 2020/1201 - D.lgs. 19 del 02/02/2021 – D.G.R. 1866/2022. Prescrizione di misure di eradicazione di 2 piante infette, ai sensi dell'art. 7 del Reg. (UE) 2020/1201, site in agro di Santeramo in Colle (BA) - Zona Infetta Xylella fastidiosa sottospecie multiplex.



Plants uprooted on 15/05/2024



REGIONE PUGLIA



ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO DIFFUSIONE XYLELLA FASTIDIOSA VERBALE DI ABBATTIMENTO DA PARTE DEI TECNICI

Data: 15-05-2024

Codice focolaio: 11200333

Specie: Mandorlo (*Prunus dulcis*)

Latitudine: 40.7845325

Ditta esecutrice: [REDACTED]

Note: dds 43/2024 santeramo in colle pianta infetta devitalizzata per presenza di muretto

Id squadra: 43

Volontario: NO

Proprietario: [REDACTED]

Longitudine: 16.7366074

Comune: Santeramo in Colle

Prima



Dopo



REGIONE PUGLIA



ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO DIFFUSIONE XYLELLA FASTIDIOSA VERBALE DI ABBATTIMENTO DA PARTE DEI TECNICI

Data: 15-05-2024

Codice focolaio: 11200338

Specie: Mandorlo (*Prunus dulcis*)

Latitudine: 40.78418048

Ditta esecutrice: [REDACTED]

Note: dds n. 043 del 22/04/2024. mandorlo

Id squadra: 92

Volontario: NO

Proprietario: [REDACTED]

Longitudine: 16.73659857

Comune: Santeramo in Colle

Prima



Dopo



A DEDICATED WEBSITE for public consultation: www.emergenzaxylella.it



Osservatorio Fitosanitario

Xylella fastidiosa sottospecie PAUCA

Contenimento della
diffusione - Misure
Fitosanitarie

Piante specificate sensibili
alla Xylella fastidiosa
sottospecie pauca
riscontrate in Puglia

Procedure Monitoraggio

Materiale Didattico

Questionari

Normativa

Comunitaria

Nazionale

Regionale

Atti di Estirpazione

Determinazioni zone
delimitate Xylella f. sub.
multiplex

Determinazioni zone
delimitate Xylella f. sub.
fastidiosa

Determinazioni zone
delimitate Xylella f. sub.
pauca



Sostanza attiva	Prodotto commerciale	Colture
Acetamiprid	Epik SI	Olivo
Deltametrina	Decis Evo	Olivo; vite; mandorlo
	Deltagri	Olivo
Flupyradifurone	Sivanto Prime	Olivo
	Riamba	
Spinetoram	Delegate WDG	Olivo
Piretrine (autorizzato anche in regime biologico)	Agro-PYR	Olivo
	Biopiren Plus	
	Biovis	
	Fitopyr	
	Piretro Actigreen	
	Piretro Verde	
Olio essenziale di arancio dolce (autorizzato anche in regime biologico)	Limocide*	Olivo
	Sinala*	

*Sostanze attive e prodotti commerciali autorizzati, con autorizzazione eccezionale (dal 4 aprile 2024 al 1 agosto 2024) contro *Philaenus spumarius* su olivo e impiegabili in agricoltura biologica.



Connesso come: Francesco Palmisano

Uscita

European Food Safety Authority (EFSA)

EFSA
Commission database

Emergenza Xylella - In Evidenza

25-11-2024
Xylella, la Giunta approva il Piano d'azione 2024-2026
Approvazione del "Piano d'azione per contrastare la diffusione di Xylella fastidiosa (Well et al.) in Puglia 2024-2026",
Leggi tutto

23-10-2024
Circolare Esplicativa
Prescrizione di misure fitosanitarie per la movimentazione delle specie specificate a Xylella fastidiosa sottospecie
Leggi tutto

23-08-2024
Prescrizione di misure fitosanitarie per la movimentazione delle specie specificate a
Xylella fastidiosa sottospecie fastidiosa, Xylella fastidiosa sottospecie multiplex e Xylella fastidiosa sottospecie pauca.
Leggi tutto

24-07-2024
Aggiornamento dell'area delimitata per "Xylella fastidiosa sottospecie fastidiosa ST1"
Aggiornamento dell'area delimitata per "Xylella fastidiosa sottospecie fastidiosa ST1", ai sensi dell'art. 4 del Reg. UE 2020/1201.
Leggi tutto

23-07-2024