



PROTOCOLLO DI RICERCA

PER DEBELLARE BATTERIO "XYLELLA FASTIDIOSA".

Condotto da: Sanitrix S.R.L.

Responsabile Scientifico: Dottore in Fisica Ambientale Emanuele Guerra.

Presso: Masseria Le Filare - Vernole (LE).

Proprietà Intellettuale: Nicola Fantoni e Giovanni Gatta.

In Concessione A: **SANITRIX S.R.L.**

Test Clinici condotti da: Laboratori Clodia Diagnostics & Service

Engineered By: Tundra Ice International S.r.l.

Financed By: Automazione Veneto S.r.l.

Tutte le informazioni (orali o scritte) e la documentazione riguardante questo protocollo di ricerca, sono considerate riservate e non possono essere comunicate a terzi.

Emanuele Guerra



ACCORDO DI RISERVATEZZA

La nozione di "Informazioni riservate" comprende ogni informazione, e/o documentazione, e/o materiale e/o strumento e/o programma di ricerca e di sviluppo fornita da una parte all'altra, o comunque acquisita da una delle parti, direttamente o indirettamente, su qualsiasi supporto (a titolo esemplificativo ma non esaustivo supporto cartaceo, elettronico), chiaramente segnalata come "riservata", "proprietaria" o indicata con diciture simili apposte con lo scopo di indicare la natura riservata e/o confidenziale dell'informazione stessa. La natura riservata delle informazioni può anche riguardare gli studi e le analisi elaborati da una parte sulla base delle informazioni riservate fornite dall'altra parte. Ogni informazione orale deve sempre essere considerata riservata, così come le informazioni riguardanti terze parti. Non sono qualificabili come "informazione riservata" le informazioni che:

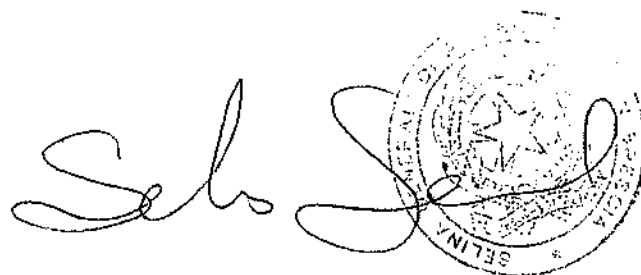
- I. Siano di pubblico dominio precedentemente al trasferimento di tale informazione da una Parte all'altra o diventino di pubblico dominio senza violazione del presente accordo di riservatezza;
- II. Diventino di pubblico dominio dopo la comunicazione di una Parte all'altra per fatto non imputabile alla Parte ricevente;
- III. Siano già in possesso della Parte ricevente prima della comunicazione, come mostrato da documenti precedenti alla data della comunicazione;
- IV. Siano sviluppate indipendentemente dalla Parte ricevente senza uso o riferimento alle informazioni della parte comunicante, come mostrato da documenti e altre prove evidenti in possesso della parte ricevente; o la cui consegna da parte di una Parte ad Autorità Giudiziaria o Amministrativa sia imposta alla stessa Parte da disposizioni legislative o regolamentari, ovvero dalle stesse Autorità Giudiziaria o Amministrativa, nel qual caso la Parte ricevente dovrà tempestivamente avvisare per iscritto la Parte comunicante prima di tale divulgazione o, nel caso non sia possibile, immediatamente dopo e comunicare le modalità con cui avrà luogo la consegna delle informazioni in modo da limitarne il più possibile la diffusione.

Ciascuna Parte si impegna a non divulgare le informazioni riservate a terze parti o ai dipendenti e/o collaboratori a vario titolo di terze parti, salvo che tali parti terze o i loro dipendenti e/o collaboratori a vario titolo siano direttamente coinvolti nell'analisi del Progetto anche quali consulenti di una Parte. La parte ricevente ha la facoltà di divulgare le informazioni riservate ai propri consulenti; in caso di divulgazione illegittima delle informazioni riservate da parte di tali consulenti, o dai componenti degli organi sociali di ciascuna delle parti, la responsabilità per i danni arrecati sarà a carico della parte ricevente.

Ogni Parte si impegna a prendere ragionevoli misure per proteggere la segretezza ed evitare la diffusione delle informazioni riservate ricevute in base al presente Accordo di Riservatezza. Per trattare le informazioni riservate ricevute dall'altra parte ogni Parte dovrebbe utilizzare almeno quelle misure usate per i propri documenti più riservati ed assicurarsi che tutte le persone che hanno accesso a tali informazioni riservate siano vincolate a riservatezza. Ogni Parte dovrà valutare in base a uno standard di normale ragionevolezza e diligenza, che deve essere misurato sulla base della natura e del tipo di informazione trattata e/o ricevuta, i metodi da essa utilizzati per la tutela della riservatezza delle informazioni riservate e sensibili. Qualora a una tale analisi i metodi utilizzati per la tutela delle informazioni riservate dovessero risultare inadeguati alla natura e al tipo di informazioni ricevute e trattate, la Parte dovrà adottare per le informazioni riservate ricevute dall'altra Parte sistemi che, secondo uno standard di normale ragionevolezza e diligenza, risultano adeguati alla tutela della riservatezza del tipo di informazione di cui si tratta, pena la sua responsabilità per tutti i danni arrecati all'altra parte dalla divulgazione delle informazioni oggetto del presente accordo.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

TITOLO DEL PROGETTO	ANALISI DELL'EFFICACIA DEL SISTEMA "ICE SANISYSTEM" NEL DEBELLARE IL BATTERIO "XYLELLA FASTIDIOSA" NELLE PIANTE "OLEA EUROPAEA". STUDIO CONTROLLATO E NON RANDOMIZZATO.
Titolo Breve	ANALISI SISTEMA "ICE SANISYSTEM" in concessione a Sanitrix S.r.l.
Identificativo del Protocollo	ISSNTRX
Responsabili Progetto	SIG. NICOLA FANTONI SIG. GIOVANNI GATTA SIG. MASSIMO FANTONI Per Conto di: SANITRIX S.R.L.
Luogo	Presso Masseria La Filare Località Vernole – In provincia di Lecce.
Centro Di Coordinamento	TUNDRA ICE INTERNATIONAL S.R.L. VIA INDUSTRIA, 39 – 25030 TORBOLE CASAGLIA (BS)
Centro di Ricerca	LABORATORIO PROTOTYPE DI EMANUELE GUERRA VIA VALPIANA, 45 - 25062 CONCESIO in provincia di Brescia.
Responsabile Scientifico	Dottore GUERRA EMANUELE (Laureato in Fisica Ambientale)
Team Clinico	LABORATORI CLODIA DIAGNOSTICS & SERVICE S.R.L. VIA G. POLI, 9/B - 30015 CHIOGGIA (VE) VIA DEGLI ARTIGIANI, 16 - 39100 BOLZANO (BZ)
Responsabile Analisi	Dottore ROBERTO MARCHETTI
Inizio progetto	2017
Ingegnerizzato Da:	Tundra Ice International S.r.l.
Finanziato Da:	Automazione Veneto S.r.l.



INDICE DEI CONTENUTI

1.	SINOSSI	5
2.	INTRODUZIONE	6
3.	BACKGROUND.....	7
4.	SCOPO DELLA RICERCA	13
5.	OBIETTIVO.....	17
6.	IPOTESI - RISULTATI ATTESI.....	17
7.	DISEGNO DELLA RICERCA.....	17
8.	SETTING DELLA RICERCA.....	18
9.	DURATA DELLO STUDIO	23
10.	POPOLAZIONE DELLO STUDIO	23
11.	SVOLGIMENTO E ANALISI	24
12.	CONCLUSIONI	34
13.	CONSIDERAZIONI ETICHE	35

1. SINOSSI



Titolo	Analisi dell'efficacia del sistema di SANITRIX SRL di nome "Ice Sanisystem" nel debellare il batterio "Xylella Fastidiosa" nelle piante "Olea Europaea".
Background	La Xylella fastidiosa è un batterio Gram negativo che vive e si riproduce all'interno dell'apparato conduttore della linfa grezza; il principale vettore di questo batterio sono le "Philaenus Spumarius", una famiglia cosmopolita di insetti dell'ordine dei Rincoti Omoteri. Gli adulti presentano colore tra il nerastro ed il bruno chiaro, e sono lunghi circa 5 mm. I danni possono essere diretti (le punture di nutrizione possono provocare decolorazioni e deformazioni) e indiretti dovuti per lo più alla produzione della schiuma (che può imbrattare i prodotti causandone il deprezzamento del valore commerciale) e come vettori di agenti patogeni.
Obiettivo dello Studio	Eliminare il batterio "Xylella Fastidiosa" all'interno della pianta "Olea Europaea" trattata con il sistema "Ice Sanisystem".
Disegno dello Studio	• Singolo Centro • Retrospektivo • Controllato • Non Randomizzato
Numerosità dei Soggetti	25 Piante di "Olea Europaea" trattate attraverso una struttura mobile, chiamata "Campana", dotata di sistema "Ice Sanisystem" e una pianta cavia trattata con sistemi sperimentali.
Criteri di Inclusione	• Piante "Olea Europaea" • Disseccamenti del lembo Fogliare • Ridotto accrescimento di rami • Imbrunimenti del legno • Zero Produzione di Olive
Criteri di Esclusione	• Piante "Olea Europaea" con produzione di Olive
Analisi Richieste comunità Europea	• Tecniche Sierologiche OPPURE • Tecniche Molecolari
Analisi adoperate	• Test Elisa specifico per Xylella Fastidiosa

Sebo

2. INTRODUZIONE

Il presente protocollo di ricerca ha lo scopo di descrivere brevemente lo studio per valutare l'efficacia del sistema brevettato dai Sigg. Giovanni Gatta e Fantoni Nicola, in concessione a Sanitrix Srl, denominato "Ice Sanisystem" per debellare il batterio "Xylella Fastidiosa". Questo batterio, molto noto a tutte le comunità scientifiche, sta causando grandissimi danni all'agricoltura Salentina della produzione delle olive; dato che questo tipo di batterio attacca la pianta "Olea Europea".

Se non si trova un sistema per debellare questo batterio, che ad oggi è considerato indebellabile, si rischia di mettere in serio pericolo tutta la produzione Europea di Olive, ma anche di altri prodotti tipici della macchia mediterranea.

In questo protocollo di ricerca si utilizza il sistema brevettato "Ice Sanisystem" applicato a una struttura mobile denominata "Campana", questo sistema funziona tramite l'utilizzo di due componenti:

- Uno o più gas allo stato liquido: in particolare in questo protocollo di ricerca è stata utilizzata CO₂ (anidride carbonica) allo stato liquido;
- Un liquido Antiparassitario totalmente naturale e biologico.

I due componenti vengono utilizzati in abbinata ottenendo un microparcellizzazione a freddo (cristalli di ghiaccio naturale); detto sistema è totalmente biologico e non mette a rischio la salute dell'uomo o dell'ambiente, come la maggior parte dei pesticidi utilizzati in agricoltura; contenenti prodotti a base di Zinco e Rame, molto dannosi per la salute dell'uomo e dell'ambiente.

Ricordo che questo studio serve a capire se nella pianta che è stata trattata, che precedentemente al trattamento risultava positiva alla presenza del batterio "Xylella Fastidiosa", quanti batteri di "Xylella Fastidiosa" sono stati debellati.

Grazie all'incrocio dei dati di stress termico indotto alla pianta e i risultati del test Elisa condotto sulle foglie prelevate, sarà possibile avere una modellizzazione del protocollo da eseguire.

Grazie ai numeri analizzati su un campione di 25 piante potremo quindi avere indicazioni chiare sulla possibilità di debellare il problema della "Xylella Fastidiosa".

I primi test, mirati alla verifica della sopravvivenza della pianta (denominata Cavia 1), sono ben incoraggianti per il proseguo in quanto le piante hanno, dopo poche settimane, ripreso la normale funzione di fotosintesi, chiaro segno dello stato di salute della pianta post-trattamento.

Qualora quindi i risultati post trattamento del test ELISA mostrassero valori inferiori a quelli del pretrattamento allora potremo affermare che lo stress termico indotto ha avuto un ruolo di battericida (meccanico) nei confronti della Xylella Fastidiosa.

L'utilizzo dello stress termico come metodo di abbattimento della carica batterica è già ampiamente utilizzato sia nel settore medicale che alimentare e industriale.

Sia la sterilizzazione a vapore, sia quella criogenica, hanno il compito di creare uno stress termico non sopportabile dai batteri o microbi in generale.

Ogni essere vivente è in grado di sopravvivere all'interno di un ristretto range di temperatura, al di fuori del quale incominciano a modificarsi i processi metabolici e riproduttivi.

Se lo stress indotto dalla temperatura si prolunga al di sopra di una certa soglia limite, allora la carica batterica inizia a decrescere, fino alla scomparsa totale.

Chiaramente è essenziale che venga considerato l'intero sistema ospite-ospitante, ovvero pianta e battere. La messa a punto di un protocollo di abbattimento di un certo battere deve tenere conto quindi della resistenza termica della pianta e del battere simultaneamente.

3. BACKGROUND

Gli studi sulle interazioni tra ospite e patogeno, sia a livello biologico che molecolare, aumentano la nostra comprensione dei meccanismi e dei determinanti coinvolti nella specificità/adattamento alla specie ospite, della patogenicità e delle risposte alle infezioni causate da ceppi di *Xylella* geneticamente distinti.

Considerando che genotipi correlati geneticamente possono comunque variare drasticamente nella loro biologia\gamma di ospiti, la conoscenza delle caratteristiche biologiche dei ceppi europei occupa una parte importante delle attività di ricerca in corso, che potrà contribuire a migliorare i programmi di contenimento delle malattie da *Xylella* e, di conseguenza, a limitare la diffusione dell'agente patogeno.

Inoltre, la recente identificazione di diversi focolai di *Xylella* sul territorio europeo rende necessaria l'identificazione della gamma di ospiti dei diversi ceppi, indispensabili alla corretta valutazione del rischio fitosanitario.

Nello scenario attuale, l'olivo è la principale specie di interesse agrario colpita dalla *Xylella* in Europa, e il ceppo associato a questa grave epidemia in Puglia sembra essere il più virulento tra i ceppi riportati in Europa.

Di conseguenza, sono state destinate ingenti risorse allo studio, finalizzato alla comprensione dei meccanismi di interazione che portano alla manifestazione di questa grave malattia, nonché alla valutazione della suscettibilità a questo ceppo di un gran numero di cultivar di olivo e di importanti colture agrarie e specie vegetali tipiche della flora Mediterranea.

Restano tuttavia una serie di aspetti critici:

- La necessità di disporre di strutture di contenimento più ampie di quelle attualmente disponibili (laboratori e serre adeguati a evitare qualsiasi rischio fitosanitario connesso con la manipolazione di materiali sperimentali infetti dal batterio);
- I tempi lunghi necessari per completare le sperimentazioni (gli studi di patogenicità sono esperimenti a lungo termine);
- Le restrizioni sulla quarantena che limitano la manipolazione di diversi ceppi dell'agente patogeno;
- La necessità di coltivare e mantenere in condizioni confinate specie vegetali diverse che richiedono condizioni e pratiche colturali diverse.

Considerato che l'avvio di ricerche specifiche sulla biologia dei ceppi europei (alcuni dei quali mai riportati prima) è relativamente recente (successivo al 2013), e considerata la natura complessa del patogeno, non sono ancora disponibili risultati di studi sul lungo periodo e comunque secondo la comunità Europea il batterio "*Xylella Fastidiosa*" è considerato indebellabile.

Tuttavia, gli esperimenti condotti in Puglia hanno fornito importanti indicazioni preliminari sulla patogenicità del ceppo che causa infezione su olivo e sulle specie ospiti sensibili, come di seguito indicato:

- Inoculazioni artificiali, utilizzando colture di *X. fastidiosa* subsp. *Pauca* ST53 su piante di olivo in vaso, hanno confermato la capacità di questo ceppo di colonizzare sistemicamente le piante di olivo inducendo sintomi tipici del disseccamento rapido, quindi confermando il ruolo patogenico del batterio nella malattia degli ulivi.
- Le inoculazioni in condizioni controllate hanno permesso di avere un'indicazione preliminare del periodo di latenza dell'infezione in olivo, superiore a un anno nelle condizioni sperimentali utilizzate.
- L'analisi del trascrittoma ha evidenziato profili di espressione genica differenziali tra le cultivar infette che mostrano un diverso fenotipo (sintomatici o asintomatici), correlando quindi risposte genetiche specifiche al fenotipo della cultivar. Tali risultati sono coerenti con studi precedenti sviluppati da altri gruppi di ricerca condotti su *Vitis vinifera* o *Citrus* spp. e aprono la strada verso ulteriori indagini per comprendere i geni bersaglio coinvolti nei fenomeni di resistenza in olivo, che consentiranno di accelerare i programmi di incrocio e la selezione assistita da marcatori molecolari.



Guerra Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

Le principali attività in corso e i risultati preliminari sono di seguito elencati:

- In Belgio inoculazioni artificiali sono state effettuate per valutare gli effetti sulla colonizzazione dell'ospite e lo sviluppo della malattia in diverse specie vegetali sottoposte a infezioni artificiali con differenti ceppi di *X. fastidiosa* e mantenute in diverse condizioni di temperatura, disponibilità di acqua ed elementi nutritivi.
- Diversi ceppi, provenienti da caffè e agrumi e appartenenti alla sottospecie *Pauca* (la stessa sottospecie a cui appartiene il ceppo che causa la malattia epidemica dell'olivo in Puglia), sono stati utilizzati per inoculare diverse cultivar di olivo in Brasile al fine di valutare la suscettibilità e la sintomatologia delle infezioni su olivo in relazione al ceppo batterico.
- In Francia sono state inoculate cultivar delle principali specie agrarie (vite, olivo e agrumi) utilizzando diversi ceppi.
- Per quanto riguarda le specie ornamentali, infezioni e sintomi sono stati riprodotti con successo su *Polygala myrtifolia* 6-8 mesi dopo le inoculazioni, utilizzando sia il ceppo italiano (sottospecie *Pauca*) che uno dei ceppi francesi (sottospecie *multiplex*). Allo stesso modo, si sono sviluppate infezioni e sintomi su piante di oleandro a circa 10 mesi dall'inoculazione.
- *Lavandula stoechas* è stata selezionata come pianta modello per valutare gli effetti delle basse temperature sulla colonizzazione delle piante e sulla moltiplicazione del ceppo pugliese.

La rilevanza e il ruolo dei vettori nella diffusione del batterio dipende non solo dalla capacità ed efficienza di trasmettere il patogeno, ma anche dalle caratteristiche ecologiche ed etologiche, dalla gamma di ospiti preferenziali, dalla fluttuazione e dinamica di popolazione su specie vegetali coltivate e infestanti, dalle interazioni con altre componenti epidemiologiche della malattia - come ad esempio le fonti di inoculo - dalle dinamiche patogenetiche in questi ospiti, dal genotipo di *X. fastidiosa* e dalle condizioni ambientali.

Nell'ambito di entrambi i progetti H2020 sono in corso studi e indagini faunistiche sulla identificazione delle diverse specie presenti in relazione alle diverse colture, sugli ospiti preferenziali e sull'ecologia degli insetti xilemofili presenti in diversi paesi europei (Italia, Spagna, Grecia, Germania, Portogallo, Serbia), nonché in oliveti brasiliani.

I primi risultati delle indagini in corso indicano:

- Differenze regionali nella composizione della fauna di xilemofili.
- *Philaenus spumarius* è la specie predominante in Europa.
- *Cicadella viridis*, uno dei vettori noti nelle Americhe, è una specie rara nelle aree meridionali dell'UE.
- In Brasile è stato riscontrato un elevatissimo numero di xilemofili: 270 specie, di cui 97 specie di "sharpshooters", i principali vettori di *Xylella* nel continente americano.

Le indagini e la caratterizzazione degli insetti xilemofili sono integrate con indagini incentrate sulla biologia e sull'ecologia delle specie già identificate come vettori in Europa, con particolare riferimento a *P. spumarius*. Per quest'ultimo, sono in corso studi mirati a identificare le condizioni ambientali che determinano l'ovideposizione, la diapausa e la schiusa delle uova, nonostante la difficoltà di allevamento rappresenti uno dei principali punti critici per gli studi di laboratorio.

È stato organizzato un lavoro congiunto tra diversi partner sull'analisi dei microbiomi e degli endosimbionti di *P. spumarius*, con risultati che dovrebbero essere forniti nel prossimo periodo di riferimento. Sono state individuate specie potenzialmente predatrici (*Zelus renardii*, *Synema globosum*, *Araniella cucurbitina*) con risultati incoraggianti a livello di laboratorio.

Le ricerche sui vettori mirano ad acquisire le conoscenze necessarie allo sviluppo di strategie ecosostenibili per il controllo delle loro popolazioni. Le informazioni ottenute dalle attività sopramenzionate, una volta validate, contribuiranno allo sviluppo di nuovi strumenti per il controllo dei vettori.

Questi includono, ma non si limitano a:

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

- L'uso dei segnali vibrazionali per interferire nella comunicazione tra gli adulti e sviluppare strategie di controllo sostenibili (ad esempio, interruzione dell'accoppiamento o tecniche di trap&kill);
- L'uso di sostanze volatili per migliorare la cattura con le trappole;
- L'uso di batteri endosimbiotici come potenziale mezzo per il controllo biologico.

Inoltre, sono state avviate prove sul campo per testare diversi approcci principalmente mirati al controllo del *P. spumarius*, tra cui:

- L'uso di piante non ospiti come "cover crops" in oliveti;
- L'uso di bordure con piante trappola;
- La sperimentazione di diverse sostanze e formulazioni ad azione insetticida per applicazioni sia in regime di protezione integrata che di agricoltura biologica.
- L'uso del sistema preventivo "Ice Sanisystem": direttamente sulle coltivazioni, detto sistema lavora ad azione ovocida e insetticida. Il sistema è totalmente biologico e non presenta nessuna controindicazione verso altre specie utili o per l'uomo.

Per quanto riguarda gli insetticidi per il controllo del *P. spumarius*, le applicazioni a base di piretroidi e neonicotinoidi hanno dato i risultati migliori, in termini di efficacia e persistenza, rispetto ai numerosi altri principi attivi testati.

Questi risultati, uniti alla necessità di avere indicazioni sul numero, sul periodo di applicazione, sulla possibilità di utilizzare approcci di gestione integrata, supportano l'esigenza di intensificare le ricerche su nuove formulazioni e nuovi test sperimentali al fine di perseguire un controllo dei vettori più sostenibile ed efficace.

La disponibilità di serie di dati di monitoraggio da parte delle Autorità fitosanitarie nazionali costituisce un ulteriore elemento importante per lo sviluppo e la calibrazione di questi modelli. Per esempio, sulla base dei dati di monitoraggio e delle conoscenze disponibili sulla prevalenza degli ospiti modelli per stimare la data di introduzione del batterio in Corsica e per rivelare la presenza di eventuali "componenti nascoste" (cioè nicchie di piante che servono da fonte di inoculo), per comprendere la storia dell'invasione e per tracciare proiezioni delle dinamiche di *Xylella* in diversi scenari futuri.

I risultati complessivi sono riepilogati di seguito:

- I modelli spazio-temporali testati con il set di dati di monitoraggio pugliese hanno confermato l'elevata diffusione della malattia in condizioni ambientali favorevoli quali quelle dell'areale infetto.
- Un'analisi descrittiva preliminare indica che le variabili ambientali sono abbastanza omogenee nell'area di studio della Puglia, quindi non si prevedono differenze influenti nei modelli.

Prima di iniziare ad eseguire i test sul campo può essere utile fare alcune considerazioni:



Img.1 Presenza del Batterio *Xylella* Fastidiosa nel mondo.



Guerra Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

Come si può osservare nell'immagine 1, la distribuzione del batterio "Xylella Fastidiosa" nel mondo è fortemente influenzata dalla latitudine. Infatti il batterio è presente soprattutto in paesi vicini ai tropici, in questi paesi sono presenti climi con inverni temperati, quindi questo ci lascia pensare che la diffusione del batterio è prediletta in zone con climi con inverni temperati.

Questa distribuzione sembra mettere in evidenza la sensibilità del batterio "Xylella Fastidiosa" alle temperature, soprattutto alle basse temperature.

Africa	Morocco		Absent, confirmed by survey
	Argentina		Present, restricted distribution
America	Brazil	Bahia	Present, restricted distribution
		Espirito Santo	Present, no details
		Goiás	Present, no details
		Minas Gerais	Present, no details
		Para	Present, no details
		Parana	Present, no details
		Rio de Janeiro	Present, no details
		Rio Grande do Sul	Present, no details
		Santa Catarina	Present, no details
		Sao Paulo	Present, no details
		Sergipe	Present, no details
			Present, few occurrences
	Canada	British Columbia	Present, no details
		Ontario	Present, few occurrences
		Saskatchewan	Present, no details
	Costa Rica		Present, no details
	Honduras		Absent, unreliable record
	Mexico		Present, no details
	Paraguay		Present, no details
	Peru		Absent, confirmed by survey
	Puerto Rico		Present, no details
	United States of America		Present, widespread
		Alabama	Present, widespread
		Arizona	Present, no details
		Arkansas	Present, no details
		California	Present, no details
		Delaware	Present, no details
		District of Columbia	Present, no details
		Florida	Present, widespread
		Georgia	Present, widespread
		Indiana	Present, no details
		Kentucky	Present, no details
		Louisiana	Present, restricted distribution
		Maryland	Present, no details
		Mississippi	Present, widespread
		Missouri	Present, no details
		Montana	Absent, unreliable record

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

America	United States of America	Nebraska	Absent, unreliable record
		New Jersey	Present, no details
		New Mexico	Present, few occurrences
		New York	Present, no details
		North Carolina	Present, no details
		Oklahoma	Present, no details
		Oregon	Present, few occurrences
		Pennsylvania	Present, no details
		South Carolina	Present, no details
		Tennessee	Present, no details
		Texas	Present, widespread
		Virginia	Present, no details
		Washington	Present, no details
		West Virginia	Present, no details
Asia	Venezuela		Present, no details
	India		Absent, unreliable record
		Himachal Pradesh	Absent, unreliable record
	Iran		Present, restricted distribution
	Israel		Present, few occurrences
	Lebanon		Absent, invalid record
	Taiwan		Present, restricted distribution
	Albania		Absent, confirmed by survey
	Austria		Absent, confirmed by survey
	Belgium		Absent, confirmed by survey
	Czech Republic		Absent, intercepted only
	Estonia		Absent, confirmed by survey
	Finland		Absent, confirmed by survey
	France		Transient, under eradication
Europe	France	Corse	Present, restricted distribution
	Germany		Absent, pest eradicated
	Italy		Present, restricted distribution
	Lithuania		Absent, confirmed by survey
	Netherlands		Absent, confirmed by survey
	Portugal		Transient, under eradication
	Serbia		Absent, invalid record
	Slovenia		Absent, confirmed by survey
			Transient, under eradication
	Spain		Transient, under eradication
		Islas Baleares	Present, restricted distribution
	Switzerland		Absent, pest eradicated
	Turkey		Absent, invalid record

In microbiologia è bene nota la somiglianza a livello di genoma tra *Xylella Fastidiosa* e *Escherichia Coli*. Nonostante questa somiglianza di base e, nonostante entrambi i batteri appartengano alla famiglia dei Gram negativi, in letteratura è ben evidenziata la differenza di risposta agli stress termici dei due batteri. La *Xylella Fastidiosa* sembra, anche in laboratorio, avere una particolare sensibilità per le basse temperature ed inizia a mostrare segni di decadimento a temperature ben sopportabili da batteri suoi simili.

Riporto a sostegno di ciò, un breve trattato in merito:



Emanuele Guerra
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

Temperature-Dependent Growth and Survival of *Xylella Fastidiosa* in Vitro and in Potted Grapevines.

Article in *Plant Disease* 85(12):1230-1234 · December 2001

"Xylella Fastidiosa is a xylem-inhabiting bacterium that causes Pierce's disease (PD) of grapevine. Growth rates of X. Fastidiosa in a rich liquid medium were determined by culturing methods at various temperatures. The slope of the regression line between the points of 18 and 28°C was similar to that reported for Escherichia coli between 12 and 30°C and for Erwinia amylovora between 9 and 18°C. For three PD strains, two almond strains, and an oleander strain, X. Fastidiosa grew fastest at 28°C but did not grow at 12°C. Grape seedlings kept at 5, 10, 17, or 25°C for 18 days, beginning 2 weeks post inoculation at 25°C, had 230-fold lower populations of X. Fastidiosa when kept at 5°C, but populations did not change significantly over time at the other temperatures. In planta populations of X. Fastidiosa decreased 3 days after placing the seedlings at 5 and 37°C, and subsequent samples yielded no culturable bacteria at 37°C. Based on in vitro and in planta studies, it appears that temperatures between 25 and 32°C may be critical for the epidemiology of Pierce's disease because of its rapid growth rate at these temperatures, whereas temperatures below 12 to 17°C and above 34°C may affect the survival of X. Fastidiosa in plants."

Sulla base di queste osservazioni, ben descritte in letteratura, possiamo ipotizzare che un rapido congelamento dello Xilema possa, in breve tempo, influenzare drasticamente la carica batterica presente al suo interno.

Risulta molto diretto il paragone con il settore alimentare in merito ai processi di abbattimento dell'*Escherichia coli* nel cibo.

Ecco cosa dice la direttiva a tal merito:

La circolare n.10 del 1992 del Ministero della Salute stabilisce che, al fine di eliminare ogni potenziale pericolo dai cibi serviti ai propri clienti, tutte le attività di ristorazione che servono pesce crudo ai propri clienti devono conservare il pesce a una temperatura inferiore a -20° per almeno 24 ore continuative. Il tempo potrebbe essere più lungo in caso di tipi particolari di pesce o di pezzi di grandi dimensioni.

4. SCOPO DELLA RICERCA

Valutare l'efficacia della campana che utilizza il sistema brevettato "Ice Sanisystem" nel debellare il batterio "Xylella Fastidiosa". Il sistema utilizza, per sanificare qualsiasi superficie ed eliminare qualsiasi tipo di parassita in abbinata a due elementi:

- Un mix di Gas naturale che il suo passaggio dallo stato liquido allo stato solido produce "neve", che raggiunge temperature fino a $-78,5^{\circ}\text{C}$.
- Un insetticida naturale biologico. Non è pericoloso per l'essere umano. Ed è ottenuto dal mix di diversi estratti naturali di radici, il maggior vantaggio di questo liquido è la sua non tossicità verso gli insetti buoni come le api, i lombrichi, le coccinelle; Risulta totalmente innocuo per la salute degli animali e delle persone, può essere utilizzato su frutta, verdura e fiori. Attualmente è comprovato da diversi studi scientifici che gli estratti di radici e piante all'interno del liquido hanno un effetto repellente per oltre 200 tra insetti, acari, funghi e batteri. Ovviamente essendo un "rimedio naturale" ricavato da diverse piante e radici non è tossico al contatto con la pelle e non ha particolari effetti non desiderati. Il mix in alcuni casi non uccide direttamente l'insetto, ma altera i processi vitali del parassita, che alla fine non riesce più a nutrirsi, riprodursi o fare la metamorfosi.

È stato deciso di utilizzare i due elementi per un semplice, ma allo stesso tempo efficace, motivo: il gas nebulizza in particelle di dimensioni piccolissime il liquido naturale: permettendo così di raggiungere i punti più impervi, ma anche di attaccare i parassiti in maniera più diretta grazie anche alle basse temperature che il sistema produce e letali per qualsiasi tipo di parassita e batterio.

L'utilizzo del singolo elemento (che può essere gas o l'insetticida naturale) non risulta così efficace.

Il sistema interamente brevettato, permette di produrre micro nebulizzazioni criogeniche, antiparassitarie biologiche direttamente sulle superfici da trattare ottenendo risultati efficaci contro tutti i parassiti, per esempio:

- **INSETTI:** Il mix elimina gli insetti dannosi tra i quali: afidi, lumache, nematodi, cocciniglie, falene, scarafaggi, mosche, termiti e zanzare. Oltre a lasciarli stecchiti, ne attacca le larve;
- Il mix criogenico coibentato elimina i **BATTERI GRAM NEGATIVI ED I FUNGHI**.

Grazie all'utilizzo di questo sistema possiamo ridurre drasticamente la quantità di trattamenti insetticidi chimici molto dannosi alla salute e di risanare, tramite l'abbattimento della carica batterica nei vasi Xilematici, la pianta.

Il gas naturale allo stato liquido all'interno delle bombole entra nell'ugello di miscelazione che converte il detto Gas in particelle MICRONIZZATE di "neve" che vengono unite in abbinata con un liquido naturale biologico, pescato dalla pompa interna al sistema, ottenendo così un mix micronizzato criogenico antiparassitario e antibatterico naturale.

Una parte di gas diventa freddo diretto, necessario per spingere la neve dalla punta dell'ugello sui parassiti; l'altra parte di gas ghiaccia il liquido anti batterico, pescato, che viene indirizzato verso le pareti da trattare. Permettendoci così di raggiungere zone impervie e di fissare il freddo alle pareti.

Il mix di gas e di anti parassita biologico prodotto è una miscela di particelle di dimensioni diverse ghiacciate che contengono anti parassiti naturali, quindi biologici, che creano l'effetto letale ottimale al contatto con i parassiti bersaglio, nei nidi e sulle uova già depositate dagli stessi.

Questa tecnologia è già stata sperimentata in campo, anche durante la ricerca, dai nostri ricercatori per eliminare l'insetto "Philaenus Spumarius" ed altri come:



Guerra Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

- **SCARAFAGGI (BLATTA GERMANICA)**
Sono stati completati test di successo per eliminare gli scarafaggi tedeschi, la *BLATTA GERMANICA*, nelle fabbriche, case e ospedali. Basta spruzzare il mix per pochi secondi contro la blatta che muore all'istante.
- **CIMICI (CIMEX LECTULARIUS)**
È stato eseguito un test in laboratorio dove cimici adulte e uova sono state poste su cartone appallottolato per simulare crepe. Successivamente è stato eseguito il trattamento con il Sistema "Ice Sanisystem": sono state fatte passare 24 ore dopo il trattamento per contare il numero di adulti morti. Il risultato è straordinario già dopo 12 ore tutte le cimici adulte erano morte e le uova non si sono più schiuse neanche dopo una settimana.
- **ACARO ROSSO (DERMANYSSUS GALLINAE)**
È stato eseguito un test direttamente all'interno del pollaio, dato che l'acaro rosso colpisce principalmente polli. È stato eseguito il trattamento con il sistema "Ice Sanisystem" nebulizzando le particelle all'interno del pollaio e direttamente sui polli. Il primo trattamento serve per eliminare l'acaro, successivamente bisogna trattare il pollaio con frequenza per eseguire una prevenzione.
- **TARMA DEL CIBO (PLODIA INTERPUNCTELLA)**
Questo test è stato condotto nella sala confezioni di un grande impianto di lavorazione delle patate in cui sono state trovate larve di tarne. La sola pulizia non è riuscita a eliminare tutte le larve delle tarne presenti nella stanza, quindi è stato eseguito il sistema "Ice Sanisystem" a tutte le aree dell'attività. Il trattamento ha eliminato tutte le larve presenti e tutte le tarne; dopo due settimane la stanza era ancora libera da larve e tarne adulte.

Per il trattamento alla pianta "*Olea Europaea*" atto a debellare il batterio "*Xylella Fastidiosa*" abbiamo utilizzato il sistema completo Ice Sanisystem quindi abbiamo lavorato sia sul fronte preventivo che sul fronte intensivo.

INTERVENTO CURATIVO.

L'intervento curativo è previsto per tutte le piante che già presentano i segni tipici della malattia, ma anche per le piante che iniziano mostrare i primi segni di malattia (anche se non sono state ancora classificate come infette).

L'intervento è abbastanza complicato e richiede un trattamento lento e efficace. Per ottenere il risultato migliore sono CINQUE step da seguire:

I. POTATURA Pianta MALATA

Ripulire la pianta dalla chioma e arrivare alle ramificazioni delle branchie primarie mantenendo le branchie secondarie solo se non completamente disseccate e comunque al di sopra delle biforcazioni a V dei Rami vigorosi. È importante mantenere delle foglie della chioma verde per poter analizzare dopo il trattamento, normalmente preserviamo tre rami verdi dai rami vigorosi per poi andare ad analizzare dopo il trattamento. Ripulire dai polloni che escono dal terreno, dalle radici e dal tronco. Regoliamo attraverso una dima la circonferenza e l'altezza dell'albero in funzione alle misure della campana per il trattamento intensivo.

II. LAVAGGIO ANTIBATTERICO BIOLOGICO

Sanificare la Pianta potata con il sistema brevettato di miscelazione a freddo "lancia a carrello" ramo per ramo compreso il terreno intorno alla pianta.

III. IRRORAZIONE DI PRODOTTO ANTIBATTERICO BIOLOGICO ALLA RADICE

Diluire in 50 litri di Acqua il prodotto biologico e innaffiare la pianta facendo attenzione alla distribuzione del liquido su tutte le radici. E' consigliabile eseguire questa operazione la sera precedente il trattamento intensivo in campana.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

IV. COPRIRE LA PIANTA MALATA

Per assicurarsi il miglior risultato è stato analizzato dal nostro Team il risultato ottenuto dalla copertura della pianta "Cavia 1": avvenuto in primis con un telo di copertura agricolo in PVC. Da questa base il nostro team ha sviluppato e costruito una campana in vetroresina coibentata ed equipaggiata del sistema "Ice Sanisystem" ottenendo un sistema molto efficiente pratico ed efficace favorendo una cryonebulizzazione di particelle in ambiente coibentato favorendo altresì l'attaccamento delle stesse sulle pareti da trattare della pianta, un isolamento termico ideale ed adattabile, mantenendo temperature costanti e shock termici rapidi a sfavore del batterio ma a favore del ciclo vitale della Pianta.



Img. 2 Breve illustrazione del processo di copertura della pianta con la Campana

V. GHIACCIARE LA PIANTA CON IL MIX BIOLOGICO

Dopo aver ricoperto la pianta con la campana brevettata da Sanitrix Srl ha inizio il vero e proprio trattamento, quindi andiamo a eseguire il triplice funzionamento ovvero:

Iniettiamo tramite gli ugelli di erogazione micro particelle formate dal mix tra CO₂, in fase liquida e prodotto antiparassitario biologico, nell'ambiente campana coibentato direttamente sulla pianta ottenendo così la saturazione di CO₂, eseguiamo quindi l'abbassamento delle temperature fino alla parte interna della pianta, ovvero nel vaso xilematico quindi un'ulteriore sanificazione esterna rendendo così la zona in lavorazione sterile.

Ovviamente la durata del trattamento dipende da diversi fattori, quali:

- La dimensione della pianta (più la pianta è grande più è il tempo richiesto, e quindi maggior consumo, per saturare l'ambiente);
- La quantità di ugelli presenti (maggior numero di ugelli, minor tempo per saturare l'ambiente);
- Il livello di infezione della pianta (per piante che presentano solamente i primi segni della malattia, quindi dove il batterio non è ne ancora presente all'interno della pianta il trattamento richiederà meno aggressività e quindi minor tempo, mentre al contrario per piante molto ammalate il trattamento dovrà essere più aggressivo e quindi più lungo).

L'obiettivo è quello di portare una temperatura inferiore ai -5°C all'interno del vaso xilematico, temperatura alla quale il batterio "Xylella Fastidiosa" viene debellato.

VI. LASCIARE A RIPOSO LA PIANTA PER 24 ORE

Dopo aver eseguito il trattamento con il mix biologico bisogna lasciare la pianta a riposo per 24 per poi prelevare i campioni da analizzare con le tecniche e le modalità dettate dalla comunità europea.




Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

Dopo aver ristabilito la temperatura all'interno della campana, quest'ultima viene rimossa dalla pianta (con lo stesso procedimento utilizzato per coprire la pianta) e vengono applicate sulle piante trattate delle reti anti insetto per mantenere tutti gli insetti dannosi lontano dalla pianta.



Img. 3 Breve illustrazione del processo di scopertura della pianta con la Campana

PREVENZIONE

Dopo l'intervento "aggressivo" e dopo esserci assicurati che la pianta non è più ammalata è consigliato il trattamento di prevenzione, tramite la lancia del nostro sistema basta spruzzare il mix biologico sulla pianta ripetutamente e con cadenza regolare (marzo, fine agosto) per eliminare tutti gli insetti che possono portare batteri e per eliminare qualsiasi altro batterio o fungo che si trova sulla pianta. In fase di test e comunque durante la fase vitale (marzo/agosto) dell' insetto portatore (sputacchina) è consigliabile coprire la pianta con reti a maglia fine per evitare qualsiasi possibilità di infezione alla pianta tramite lo stesso portatore.



5. OBIETTIVO

5.1. OBIETTIVO PRIMARIO

Obiettivo di questa ricerca applicata al problema della Xylella Fastidiosa è quello di individuare e valutare un processo termico in grado di sottrarre rapidamente calore al sistema Pianta-battere, senza arrecare danni permanenti alla pianta e nel contempo portare a zero la carica batterica interna allo Xilema e valutare l'impatto del trattamento tramite il macchinario con sistema "Ice Sanisystem" verso il batterio "Xylella Fastidiosa" presente nella pianta "Olea Europaea".

ENDPOINT PRIMARIO: Pianta "Olea Europaea" riduzione del batterio dannoso "Xylella Fastidiosa".

6. IPOTESI - RISULTATI ATTESI

6.1. IPOTESI PRIMARIA

Dal punto di vista teorico il batterio "Xylella Fastidiosa" muore a temperature inferiori ai 12°C; con il nostro sistema "Ice Sanisystem" puntiamo a portare la temperatura della pianta a meno di - 10°C. Inoltre con l'utilizzo di un pesticida naturale biologico svolgiamo una seria azione antibatterica contro il batterio "Xylella Fastidiosa" presente all'interno della pianta.

7. DISEGNO DELLA RICERCA

- A SINGOLO CENTRO

È lo studio realizzato da un solo ricercatore o gruppo di ricerca in un centro universitario o extra universitario.

- RETROSPETTIVO

Studio nel quale i dati raccolti si riferiscono ad eventi che si sono verificati.

- CONTROLLATO

Studio epidemiologico analitico nel quale il ricercatore non determina l'assegnazione dei soggetti a ciascun gruppo, ma si limita a registrare (osservare) quello che avviene nella realtà.

- NON RANDOMIZZATO

In uno studio clinico non randomizzato, i partecipanti sono assegnati utilizzando un metodo non casuale. L'assegnazione viene decisa e gestita dallo sperimentatore.




Dottore Emanuele Guerra

8. SETTING DELLA RICERCA

La ricerca viene eseguita presso il campo Test situato nella "Masseria La Filare" di Vernole in provincia di Lecce, sotto la supervisione del Fisico Ambientale Dottor Emanuele Guerra.

I test di apprendimento clinico sono eseguiti dal team clinico dei Laboratori Clodia avendo in loco presenti tutti i macchinari di diagnostica atti a valutare la presenza o meno del batterio "Xylella Fastidiosa" all'interno delle piante di Olivo.

La pianta cavia 1 trattata si trova nella provincia di Lecce, più precisamente nella località Vernole.

La pianta cavia 2 si trova nella Provincia di Brescia, più precisamente a Torbole Casaglia.

Per poter eseguire tale trattamento e indurre uno stress monitorabile, quantificabile e ripetibile ci si avvale del dispositivo denominato "Campana", dove è stato installato il Brevetto "Ice Sanisystem" di Sanitrix S.r.l. Attraverso l'utilizzo del dispositivo "Campana" indurremo diversi stress termici, sia per durata sia per intensità a 25 piante di Ulivo presenti in provincia di Lecce in una zona fortemente colpita dall'epidemia di Xylella Fastidiosa.



Img. 4 Campana Situata nel campo "Masseria La Filare".

La campana è realizzata in materiale coibentato isolante e riflettente in modo da minimizzare lo scambio di calore con l'esterno, riducendo quindi tempi del trattamento e l'impiego di CO₂.

La sottrazione di calore alla pianta avviene grazie alla rapida espansione del gas in pressione che, grazie alla turbolenza generata, si distribuisce in tutta la campana, grazie anche alla presenza di 7 ugelli di emissione.

Per poter conoscere e misurare la situazione internamente alla campana viene utilizzato un datalogger collegato a 5 termocoppie: 3 termocoppie ambientali e due interne allo xilema, in punti diversi.

Questo ci permetterà di conoscere il gradiente termico esistente tra l'interno della campana e l'interno dello Xilema. La corteccia agisce da isolante ed è quindi essenziale sapere la temperatura interna allo Xilema, ovvero nella corona circolare che si trova appena sotto la corteccia.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA



SONDA 1: Rappresentativa dei Rami

SONDA 2: Rappresentativa del Tronco

Img. 5 Interno della Campana

Pianta "Cavia 1" Infetta:
Rigermogliata dopo trattamento.

Pianta "Cavia 2" Non infetta:
Dopo trattamento intensivo a dimostrare la
Resistenza della pianta allo stress termico



Img. 6 Pianta Infetta Germogliata

Img. 7 Pianta non infetta trattata



Img. 8 Pianta Infetta Germogliata

Img. 9 Pianta non infetta trattata



Img. 10 Pianta Infetta Germogliata

Img. 11 Pianta non infetta trattata



Guerra Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

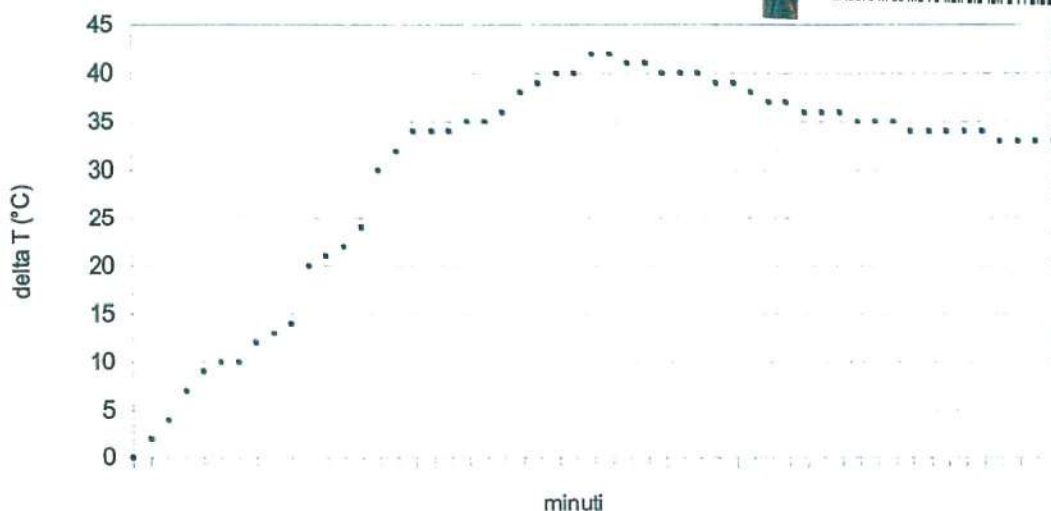
Riportiamo a titolo di esempio uno dei 25 profili di temperatura registrati dal datalogger; si compone di un rilevamento al minuto per ciascuna delle 5 termocoppie:

	PIANTA 3				
	AMB. MEDIA	AMB. BASSA	AMB. ALTA	SONDA 1	SONDA 2
23/09/2019 12:55:00	23	24	24	30	30
23/09/2019 12:56:00	15	17	16	28	28
23/09/2019 12:57:00	8	8	8	26	26
23/09/2019 12:58:00	2	1	0	23	23
23/09/2019 12:59:00	-4	-2	-5	21	21
23/09/2019 13:05:00	-35	-40	-34	20	20
23/09/2019 13:06:00	-38	-44	-36	20	20
23/09/2019 13:07:00	-39	-45	-38	18	18
23/09/2019 13:08:00	-40	-46	-40	17	17
23/09/2019 13:09:00	-41	-46	-41	16	16
23/09/2019 13:10:00	-42	-47	-42	10	10
23/09/2019 13:11:00	-43	-48	-43	9	9
23/09/2019 13:12:00	-45	-49	-44	8	8
23/09/2019 13:13:00	-48	-51	-45	6	6
23/09/2019 13:14:00	-51	-54	-47	0	0
23/09/2019 13:15:00	-50	-53	-46	-2	-2
23/09/2019 13:16:00	-49	-53	-45	-4	-4
23/09/2019 13:17:00	-47	-52	-43	-4	-4
23/09/2019 13:18:00	-46	-50	-43	-4	-4
23/09/2019 13:19:00	-47	-51	-44	-5	-5
23/09/2019 13:20:00	-49	-54	-47	-5	-5
23/09/2019 13:21:00	-53	-57	-50	-6	-6
23/09/2019 13:22:00	-53	-57	-49	-8	-8
23/09/2019 13:23:00	-52	-56	-48	-9	-9
23/09/2019 13:24:00	-52	-55	-48	-10	-10
23/09/2019 13:25:00	-53	-56	-50	-10	-10
23/09/2019 13:26:00	-55	-58	-52	-12	-12
23/09/2019 13:27:00	-55	-58	-51	-12	-12
23/09/2019 13:28:00	-54	-58	-50	-11	-11
23/09/2019 13:29:00	-53	-57	-49	-11	-11
23/09/2019 13:30:00	-51	-56	-48	-10	-10
23/09/2019 13:31:00	-50	-54	-47	-10	-10
23/09/2019 13:32:00	-48	-53	-46	-10	-10
23/09/2019 13:33:00	-46	-52	-44	-9	-9
23/09/2019 13:34:00	-45	-50	-43	-9	-9
23/09/2019 13:35:00	-43	-48	-41	-8	-8
23/09/2019 13:36:00	-42	-47	-39	-7	-7
23/09/2019 13:37:00	-40	-45	-38	-7	-7
23/09/2019 13:39:00	-37	-42	-34	-6	-6
23/09/2019 13:40:00	-35	-40	-33	-6	-6
23/09/2019 13:41:00	-34	-38	-31	-6	-6
23/09/2019 13:42:00	-32	-37	-29	-5	-5
23/09/2019 13:43:00	-30	-35	-28	-5	-5
23/09/2019 13:44:00	-29	-34	-26	-5	-5
23/09/2019 13:45:00	-27	-32	-24	-4	-4
23/09/2019 13:46:00	-25	-30	-23	-4	-4
23/09/2019 13:47:00	-24	-29	-21	-4	-4
23/09/2019 13:48:00	-23	-27	-20	-4	-4
23/09/2019 13:49:00	-22	-26	-19	-4	-4
23/09/2019 13:50:00	-20	-25	-17	-3	-3
23/09/2019 13:51:00	-19	-23	-16	-3	-3
23/09/2019 13:52:00	-18	-22	-14	-3	-3
23/09/2019 13:53:00	-8	-17	-8	-3	-3
STOP					

Da tali dati, calcolando il delta T tra ambiente esterno alla campana e temperatura interna allo xilema, possiamo calcolare un indice di stress termico, la cui curva permette di calcolare l'integrale dello stress:



Stress Termico nello Xilema



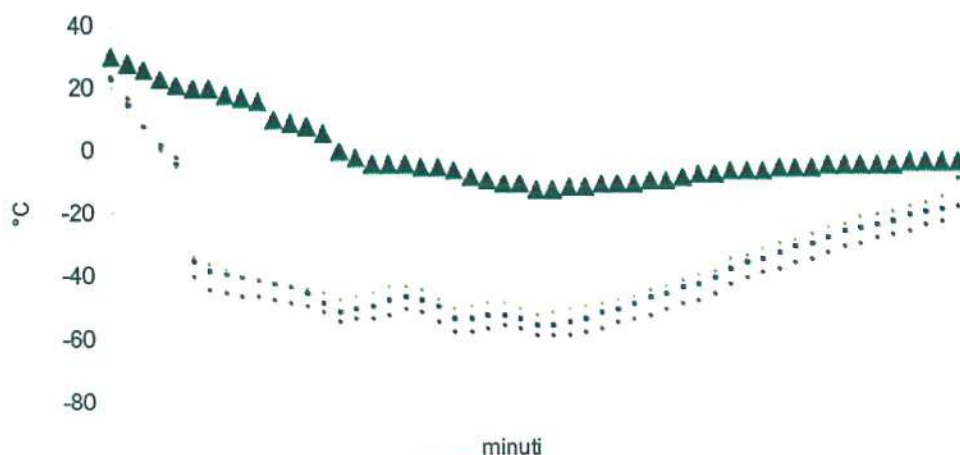
Come si vede, sin dai primi minuti lo stress termico inizia a salire rapidamente fino a raggiungere circa 45°C di differenza con la temperatura esterna. Tale rapidità di raffreddamento (pendenza della curva) rappresenta l'efficienza termica della campana, che raffredda quindi lo Xilema a un rate di circa 2°/min.

In pochi minuti si raggiunge quindi il punto di congelamento dell'acqua contenuta nei vasi xilematici con la formazione di micro cristalli che, espandendosi rispetto allo stato liquidi, mandano in compressione tutto il reticolo che compone lo Xilema.

Successivamente lo Xilema raggiunge e supera i -5°C; tale valore (-5°C) è abbastanza nota in microbiologia per essere un valore soglia per la sopravvivenza di molti batteri.

Nel grafico seguente vediamo come le tre termocouple interne alla campana (giallo, blu e rosso) abbiano un andamento molto simile e sfalsato solo di qualche grado a causa della normale stratificazione dell'aria fredda che in basso risulta essere a minore temperatura rispetto alle termocouple poste a mezza altezza ed in alto. Interessante vedere come le due termocouple all'interno del tronco e del ramo descrivono un andamento sovrapposto, indice della buona omogeneità della temperatura all'interno.

Andamento temperature



Dopo circa 18 minuti dall'inizio (30°C) del trattamento si raggiungono i 0 gradi centigradi interni e si continua poi a mantenere al di sotto di tale soglia la temperatura per un periodo di tempo minimo.



Emanuele Guerra
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

Si nota facilmente l'inerzia termica dovuta alla corteccia. Si tenga conto che tale campagna di misurazione è avvenuta con temperature esterne alla campana superiori ai 30°C e rappresentano quindi il caso più svantaggioso per validare l'efficienza termica della campana.

Dai dati termici si evidenzia anche la bontà della coibentazione e realizzazione della campana, ricordando che è appoggiata sul terreno e pertanto non è a tenuta stagna.

Per quantificare e rendere ripetibile lo stress termico utilizziamo la formula:

$$\text{Thermal stress Index: } \sum_i (T_i - T_a) * 1\text{min}$$

T_a: Temperatura esterna alla campana

T_i: Temperatura rilevata per ogni minuto di trattamento

Tale semplice somma (o integrale discreto) permette di avere un indice delle calorie (o Joule) sottratti alla pianta durante il trattamento. Per il seguente studio è sufficiente conoscere un indice di stress termico in quanto non ci sono variabili che non lo consentano.

Possiamo a questo punto esporre la tesi di tale studio.

TESI:

Individuare un range di stress termico (o indice di stress termico) che, applicato alla pianta con il sistema SANITRIX, permetta di debellare il battere interno allo xilema senza arrecare danno alla pianta e al sistema circostante.

9. DURATA DELLA RICERCA

Dato che la presente ricerca è basata sullo studio di fattibilità, i tempi sono stati veramente ristretti. Le piante sono state trattate, quindi prelevate di campioni prima e dopo il trattamento nella zona del test tramite laboratorio certificato mobile.

Possiamo identificare tre fasi principali:

1. Fase 1, denominata *Project Start Up*, costituita da (GIA' ESEGUITA):
 - 1.1. Redazione Protocollo preliminare Scientifico
 - 1.2. Test su pianta cavia 1 infetta presso zona infetta a Vernole Lecce
 - 1.3. Attesa condizioni del ciclo vegetativo della pianta trattata e rigermogliazione pianta
2. Fase 2, denominata *Set up*, costituita da (GIA' ESEGUITA):
 - 2.1. Messa in prova del sistema su pianta cavia 2 non infetta presso nostro domicilio operativo
 - 2.2. Test su 25 esemplari di piante che presentano segni evidenti di contagio da Xylella Fastidiosa
 - 2.3. Isolamento delle piante trattate e difesa al ricontaminamento da parte dei vettori con sistema "Ice Sanisystem" e con l'ausilio di reti a maglia finissima.
3. Fase 3, denominata *Analysis*, costituita da (GIA' ESEGUITA):
 - 3.1. Analisi dei dati e disseminazione risultati
4. Fase 4, Approfondimento e confronto fra analisi sierologica e molecolare

È fondamentale però l'urgenza nell'eseguire l'analisi per andare a perfezionare il sistema per evitare di esporre tutta l'agricoltura Italiana al batterio killer "Xylella Fastidiosa".

10. POPOLAZIONE DELLO STUDIO

10.1. CRITERI DI INCLUSIONE

- Piante "Olea Europaea"
- Disseccamenti del lembo Fogliare
- Ridotto accrescimento di rami
- Imbrunimenti del legno
- Zero Produzione di Olive

10.2. CRITERI DI ESCLUSIONE

- Piante "Olea Europaea", non affette dal batterio "Xylella Fastidiosa", che producono ancora Olive.




Dottore Emanuele Guerra

11.SVOLGIMENTO E ANALISI

Perché i risultati abbiano Valore e siano confrontabili e valutabili, seguiamo rigorosamente il protocollo diagnostico di analisi della Xylella imposto dalla commissione Europea, che prevede:

PRELIEVO DEI CAMPIONI

Il campione deve essere costituito da 8/10 rametti di 15-20 cm con foglie. Il prelievo dei campioni va effettuato con l'ausilio di uno svettatoio telescopico, bisogna campionare nei settori della chioma che presentano sintomi, prestando cura nel prelevare rametti non interessati da disseccamento, ma rametti ancora vitali e in vegetazione.

I campioni vengono prelevati in maniera casuale cercando di prelevare campioni da diverse posizioni della pianta per valutare l'intero comportamento della pianta al trattamento.

È molto importante assicurarsi che sulle porzioni vegetali campionate non vi siano insetti alati potenziali vettori di Xylella Fastidiosa; pertanto è necessario scuotere energicamente e/o sottoporre a lavaggio, le parti vegetali che possono ospitare insetti, assicurandosi di non movimentare insetti in qualsiasi stadio vitale.

ATTREZZATURE

Ove possibile il materiale da campionare può essere prelevato con il solo uso delle mani oppure con l'ausilio di cesoie/svettatoi, opportunamente disinfettati tra il campionamento di una pianta e la successiva.

Nel caso specifico dell'olivo, considerando che il batterio è rilevabile soprattutto nei rami e nelle branche prossimali a quelle che mostrano sintomi, spesso localizzate nella parte alta della chioma, è necessario adoperare svettatoi telescopici per poter prelevare il campione in maniera adeguata.

TRASPORTO

Completate le operazioni di prelievo, sulla busta di plastica che racchiude il campione va apposta l'etichetta con tutti i dati necessari alla tracciabilità. In particolare vengono riportati tutti i dati generati in automatico dall'applicazione *XylApp*:

- Codice Squadra
- Data
- ID Giornaliero
- Specie Campionata
- Sintomi

Le buste relative ai campioni di uno stesso sito devono essere raggruppate in bustoni dove vengono riportati i dati relativi al luogo, data del prelievo e squadra di tecnici. I campioni devono essere conservati in frigo sia in campo che durante il trasporto ai laboratori. È estremamente importante non lasciare i campioni al sole, anche riposti nelle borse frigo.

I campioni devono essere consegnati dagli agenti fitosanitari, o da personale appositamente incaricato, ai laboratori nella stessa giornata del prelievo.

ANALISI

I campioni vegetali sono dapprima sottoposti a saggi sierologici di tipo massale (analisi di Primo livello) e, successivamente in caso di campioni con esito incerto ed una determinata percentuale di campioni negativi, a saggio molecolare di conferma (analisi di Secondo livello).

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

1. Analisi con tecnica "Sierologica" (Analisi di Primo Livello)

I metodi sierologici si basano sulle proprietà antigeniche delle proteine di superficie della cellula batterica. Tra questi, il saggio immunoenzimatico ELISA è quello più ampiamente utilizzato, avendo le peculiarità di alta processività e procedure relativamente semplici per la preparazione del campione.

Per ogni campione l'estrazione, sia ai fini del saggio ELISA che per l'isolamento del DNA, va effettuata utilizzando almeno 0,5-0,8 g di tessuto, ottenuto da 5-10 foglie (a seconda delle dimensioni e consistenza delle foglie). Le foglie selezionate per l'estrazione devono essere rappresentative dell'intero campione, dando priorità alle foglie sintomatiche, qualora presenti.

La procedura descritta di seguito prevede l'impiego di un kit ELISA commerciale. Prove preliminari di validazione, mediante ring-test, hanno infatti dimostrato la affidabilità di tale metodo nella diagnosi del ceppo CoDiRO di Xylella Fastidiosa in tessuti di olivo. È importante evidenziare che ciascun saggio deve includere i controlli positivi e negativi, rappresentati da estratti vegetali di piante, rispettivamente, infette e sane per ciascuna delle specie incluse nel test diagnostico, qualora disponibili; in alternativa quelli forniti col kit.

Fasi del protocollo diagnostico di DAS-ELISA

ATTREZZATURA NECESSARIA:

- Set di reagenti per la rilevazione sierologica di Xylella fastidiosa (Loewe Biochemica GmbH, Cat. No. 071195)
- Reagenti chimici per la preparazione dei tamponi
- 4-Nitrofenil fosfato
- Piastre ELISA (Flexible Plates, Falcon o Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96, Sigma-Aldrich)
- Buste BIOREBA (BB6430100B o similari)
- Tubi da micro centrifuga
- Pipette (qualsiasi produttore)
- Micro pipette (P20, P200, P1000, pipetta multicanale)
- Omogeneizzatore di tessuti (Homex BIOREBA o similare)
- Incubatore a 37°C
- Lettore di piastre (405 nm)
- Bilancia analitica (qualsiasi produttore)



- I. Sensibilizzazione**
Diluire gli anticorpi (IgG) specifici a X. fastidiosa 1:200, in "Coating buffer" (ad es. 50 µl in 10 ml di tampone, o in eguale rapporto per altri volumi) e distribuire 100 o 200 µl in ciascun pozzetto della micro piastra. Coprire la piastra e porla in una camera umida. Incubare la piastra a 37° C per 4 h.
- II. Lavaggi**
Lavare quattro volte la piastra con "Washing Buffer".
- III. Preparazione campione vegetale e incubazione con l'antigene**
Omogeneizzare i campioni in "Extraction Buffer" (1:10 w/v). Pesare almeno 0,5 g di piccioli e porzioni basali fogliari, avendo cura di sterilizzare, tra un campione e l'altro la lama usata per tagliarli. Trasferire il tessuto vegetale in bustina e aggiungere 5 ml di tampone; schiacciare con un martello e tritare mediante un omogeneizzatore semiautomatico (ad es. Homex, BIOREBA). Trasferire 1 ml di succo vegetale in una provetta e conservare a 4° C fino al momento dell'uso, in modo da favorire la precipitazione dei residui vegetali. Dispensare 100 o 200 µl di succo vegetale in ciascun pozzetto della micro piastra. Coprire la piastra, porla in una camera umida e incubare a 4° C per tutta la notte.



Guerra Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

- IV. Lavaggi
Ripetere la fase II.
- V. Aggiunta anticorpi coniugati ad enzima
Diluire gli anticorpi coniugati alla fosfatasi alcalina (anti-Xf- AP-IgG) in "Conjugate Buffer" (1: 200).
Dispensare 100 o 200 µl in ciascun pozzetto della piastra. Coprire la piastra, porla in una camera umida e incubare a 37° C per 4 h.
- VI. Lavaggi
Ripetere la fase II.
- VII. Aggiungere Substrato
Sciogliere il para-nitrofenilfosfato (0,6-1 mg/ml) in "Substrate buffer" e dispensare 100 o 200 µl per pozzetto. Incubare a temperatura ambiente (18-25° C) per almeno 2 ore o più a lungo, fino ad osservare il viraggio di colore (giallo). Leggere la piastra a $\lambda=405$ nm dopo 60-120-180 min (se necessario prolungare la reazione per tutta la notte) utilizzando un lettore di piastre. La reazione enzimatica può essere bloccata mediante aggiunta di 25µl di NaOH (idrossido di sodio) 3 M in ciascun pozzetto.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

2. Analisi con tecnica "Molecolare" (Analisi di Secondo Livello)

Le tecniche molecolari si basano essenzialmente sulle tecniche di amplificazione genica, mediante PCR. L'estrazione di DNA di *X. fastidiosa* dalla coltura batterica e dalle piante ospiti può essere effettuata con kit commerciali o con tampone di estrazione CTAB o, nel caso di coltura batterica, con tampone Tris-EDTA-Sarkosyl.

I saggi molecolari di conferma sono effettuati sottoponendo il campione a doppio test con l'impiego congiunto di almeno due marcatori molecolari (coppie di primer) specifici per l'amplificazione di due regioni genomiche del batterio. In particolare come previsto nelle procedure diagnostiche EPPO 7/24 (3), i saggi qPCR vengono effettuati con i primer descritti da Harper et al. (2010), a cui si aggiunge un secondo saggio qPCR utilizzando i primer specifici per il gene che codifica la proteina HL (Francis et al., 2006), oppure i primer disegnati sul gene che codifica la proteina Cobalamin Synthesis.

I tessuti vegetali possono essere omogeneizzati mediante un omogeneizzatore semiautomatico (es. Homex, BIOREBA) o un apparecchio simile, o macinando il tessuto in azoto liquido. L'estrazione degli acidi nucleici totali può essere eseguita da tessuti vegetali ed insetti mediante kit commerciale o estrazione mediante metodo CTAB.

Estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale Dneasy Plant Mini kit, cat. No. 69104 – Qiagen, usa

ATTREZZATURA NECESSARIA:

- (Opzionale) PCR Workstation (qualsiasi fornitore)
 - Omogeneizzatore di tessuti (Homex BIOREBA o similare)
 - Micro centrifuga da banco capace di 14,000 rpm (qualsiasi fornitore)
 - Vortex (qualsiasi fornitore)
 - Unità PCR (qualsiasi fornitore)
 - qPCR unità (qualsiasi fornitore)
 - Bilancia analitica (qualsiasi fornitore)
 - Termoblocco capace di 65-70°C + 2°C
 - Spettrofotometro micro volumetrico Nanodrop (o similari)
 - Pipette dedicate calibrate annualmente (P10, P20, P200, P1000).
 - Freezer (-20°C, no-Frost-free, qualsiasi fornitore)
 - Buste (BIOREBA, cod. BB6430100B o similari)
 - Tubi da Micro centrifuga da 2ml, 1,5 ml (pre-sterilizzati, certificati DNase & RNase free, qualsiasi fornitore)
 - Puntali con filtri sterili (P10, P200, P1000, qualsiasi fornitore)
 - Pipette pasteur (qualsiasi fornitore)
 - Tubi da PCR da 0,2 ml (qualsiasi fornitore)
 - Acqua di grado molecolare (qualsiasi fornitore)
 - Etanolo (96-100%, qualsiasi fornitore)
 - Isopropanolo (qualsiasi fornitore)
 - Cloroformio (qualsiasi fornitore)
- I. Pesare 200 mg di tessuto fresco (50 mg se liofilizzato) e omogeneizzare con mortaio e pestello in azoto liquido. Trasferire il tessuto polverizzato in tubi da 2 ml.
 - II. Il tessuto restante può essere conservato a -20 °C. Nel caso di insetti, omogeneizzare il tessuto asportato dall'insetto in un tubo da 2 ml con 1-2 micro sferette di tungsteno per max. 15-20 sec a 24 frequenze/sec, in un mixer Mill300 (Qiagen).




Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

- III. Aggiungere 800 μ l di kit del Buffer di estrazione AP1Qiagen DNeasy Pianta Mini e 8 μ l di RNasi A soluzione stock (100 mg/ml).
- IV. Incubare il lisato cellulare a 65° C per 10 min.
- V. Aggiungere 260 μ l di Buffer AP2 al lisato, agitare con il vortex brevemente e incubare in ghiaccio per 5 min.
- VI. Centrifugare a 20.000 x g (14.000 rpm) per 10 min.
- VII. Caricare il lisato in una Spin QIAshredder Mini Column (colonna color lilla) in un tubo da 2 ml e centrifugare per 2 min a 20.000 x g (14.000 rpm), quindi, scartare la colonna (in genere, possono essere recuperati circa 500 μ l di lisato).
- VIII. Misurare il volume e aggiungere 1,5 volumi di Buffer AP3/E al lisato e miscelare mediante pipetta.
- IX. Trasferire 650 μ l della miscela compreso l'eventuale precipitato nella Spin Column DNeasy Mini posizionata in un tubo da 2 ml. Centrifugare a 6.000 x g (8.000 rpm) per 1 min (scartare il liquido eluito attraverso la colonna).
- X. Ripetere il passaggio 8 con la parte restante della miscela. Eliminare il liquido passato attraverso la colonna.
- XI. Posizionare la colonna in un nuovo tubo di raccolta da 2 μ l. Aggiungere 500 μ l di Buffer AW alla colonna e centrifugare a 8.000 rpm per 1 min. Eliminare il liquido passato attraverso la colonna.
- XII. Aggiungere altri 500 μ l di AW e centrifugare per 2 minuti a 20.000 x g (14.000 rpm) per asciugare la colonna.
- XIII. Trasferire la colonna in un tubo da 1,5 ml e dispensare 200 μ l di tampone AE (a temperatura ambiente) direttamente sulla membrana. Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugare per 1 min a 6.000 x g (8.000 rpm) per raccogliere il DNA eluito (non permettere alla colonna di asciugarsi).
- XIV. Estratti di DNA genomico totale possono essere conservati a 4° C per un uso immediato o a -20 °C.
- XV. Determinare la concentrazione mediante spettrofotometro (Nanodrop o similari). Leggere l'assorbimento (A) a 260 nm ed a 280 nm. Per l'acido nucleico di alta qualità, il rapporto A260/280 ottimale dovrebbe essere vicino a 2.
- XVI. Portare la concentrazione del DNA a 50-100 ng/ μ l, e utilizzare 2 μ l (in un volume finale di 25 μ l) per impostare la reazione di PCR.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

IMPOSTAZIONE DEI LAVORI:

Inizialmente viene individuata un'area caratterizzata da ulivi vistosamente malati (foglie e rami secchi) e tutti simili in dimensione tra di loro.

Tali campioni vengono numerati:

PIANTA 1



Img.12 Pianta 1

PIANTA 2



Img. 13 Pianta 2

PIANTA 3



Img. 14 Pianta 3

Gli alberi da cui sono stati presi i campioni di foglie da analizzare mostrano chiaramente i segni caratteristici della malattia; sono infatti poche le foglie rimaste sui rami, nessun segno di germogliazione è visibile.

Le foglie vengono quindi raccolte in maniera rappresentativa dell'albero; i valori che si ottengono con il test ELISA sono quindi valori medi ottenuti dall'estratto di diverse foglie del medesimo albero.

Il giorno successivo al prelievo dei campioni di riferimento (o pretrattamento), sono iniziati i primi trattamenti sulle piante 1-2-3.

I trattamenti sono registrati in file Excel, restituiti dal datalogger componente della campana.

La bontà della lettura delle termocoppie è stata testata qualche giorno prima dell'inizio dei test utilizzando delle termocoppie di riferimento certificate.

Dopo aver verificato il corretto funzionamento di tutti gli ugelli, il sistema viene facilmente posto sopra la prima pianta ed il trattamento può iniziare.



Img. 15 Breve illustrazione del processo di copertura della pianta con la Campana

Nelle ore successive al trattamento, con la stessa metodologia del campionamento precedente, vengono prelevate le foglie che costituiranno il campione di riferimento per il post trattamento.



Emanuele Guerra
Dottore Emanuele Guerra

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

I test ELISA, oltre ad indicare una soglia POSITIVO/NEGATIVO, restituiscono un valore numerico di assorbanza che permette di fare analisi semi-quantitative.

Ciò significa che andremo a confrontare i valori di assorbanza prima e dopo il trattamento.

L'efficacia del trattamento contro la Xylella sarà supportato dalle differenze numeriche rilevate prima e dopo il trattamento con il test ELISA.

Per la modalità di prelievo campioni e analisi ELISA ci siamo avvalsi dei laboratori Laboclodia, che hanno messo a disposizione tutta la strumentazione e metodologia richiesta dalla Commissione Europea per la diagnostica Xylella.



Img. 16 e 17 Attrezzatura utilizzata durante le analisi

Per indicare la modalità di valutazione dei risultati prendiamo come riferimento le prime tre piante trattate: Il test ELISA prevede, per ogni piastra di analisi, l'individuazione di una soglia che definisce il risultato come POSITIVO O NEGATIVO. Tale soglia viene calcolata a partire da due controlli positivi e da due controlli negativi.

Per le prime tre piante, appartenenti alla stessa piastra di analisi, la soglia vale 0,056; valori superiori indicano un risultato POSTIVO (infetto) e valori inferiori indicano un risultato NEGATIVO (non infetto).

Riportiamo i dati ottenuti direttamente dall'analizzatore:

CAMPIONE	LETTURA	ASSORBANZA	POS/NEG
B	0,327	-0,016	0,056
B	0,354	0,011	
CP	2,23	1,887	POS
CN	0,367	0,024	
CP	1,454	1,111	POS
CN	0,353	0,010	
B	0,367	0,024	
B	0,324	-0,019	
1AT 1	0,325	0,052	NEG
1BT 1	0,377	0,034	NEG
2AT 1	0,374	0,031	NEG
2BT 1	0,354	0,011	NEG
3AT 1	0,367	0,024	NEG
3BT 1	0,547	0,204	POS
1A 1	0,197	0,574	POS
1B 1	0,347	0,004	NEG
2A 1	0,455	0,112	POS
2B 1	0,404	0,061	POS
3A 1	0,452	0,109	POS
3B 1	0,341	0,088	POS

La prima parte della tabella mostra la parte di preparazione del test; analizzando i controlli positivi (CP) e negativi (CN) contenuti in ogni piastra del KIT ELISA, si deduce la soglia qualitativa; in questo caso è 0,056. Ogni campione rappresenta la media di diverse foglie raccolte dallo stesso albero, e vengono analizzati due campioni per ogni albero.

PROTOCOLLO DI RICERCA: XYLELLA FASTIDIOSA

I campioni riportanti la lettera T indicano i campioni dei trattati (POST TRATTAMENTO).

In rosso, nella tabella precedente i risultati sopra soglia (positivi), in verde quelli negativi.

La preponderanza di valori positivi nel pretrattamento e la preponderanza di valori negativi nel post trattamento è indice che il trattamento ha ridotto, notevolmente, la carica batterica relativa al battere Xylella F. all'interno dello xilema. Ciò è prova tangibile che lo stress termico apportato con il sistema ha diretta efficacia sul battere Xylella.

Su tutta la campagna di test si è evidenziato una netta diminuzione dei valori restituiti dal test ELISA post trattamento. AL di là dei problemi di ripetibilità nella natura del Test, il delta esistente tra i valori pre e post trattamento (sia mediati che non) indicano una correlazione tra lo stress e i valori di carica batterica dei campioni analizzati.

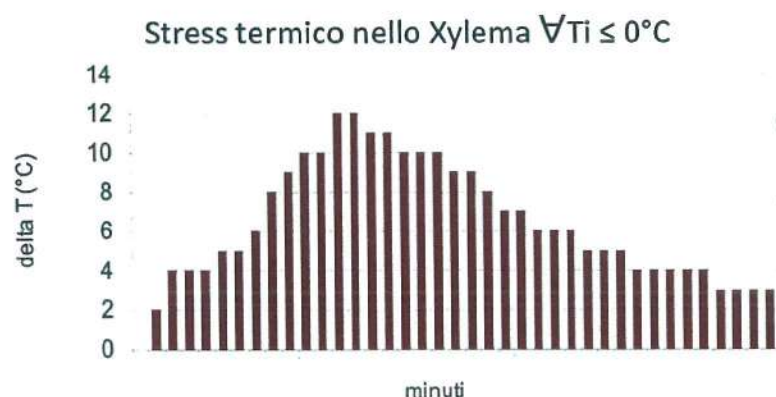
Premesso ciò, queste prime tre piante sono rappresentative di 25 piante trattate dell'intera campagna di analisi e possiamo tenere tali valori rappresentativi di uno stress termico MINIMO necessario per ottenere un'efficacia sufficiente a contrastare il problema della Xylella senza danneggiare la pianta. Riportiamo quindi tale stress applicato alle piante 1-2-3 di cui sopra risultati ELISA, pre e post trattamento.

Per poter quantificare lo stress termico indotto introduciamo la seguente espressione matematica:

$$\text{Thermal stress Index: } \sum_i (T_i - T_a) * 1\text{min} \geq 1600 \text{ } ^\circ\text{C} * \text{min}$$

Teniamo presente che la precedente discretizzazione della sommatoria rispetto all'integrale è da ritenersi un'ottima approssimazione dell'area sottesa alla curva della temperatura nel tempo di trattamento.

Per evitare che la temperatura esterna (o il periodo dell'anno) possa influenzare il calcolo introduciamo un nuovo indice di stress termico che considera solo i valori di temperatura interni allo xilema inferiori a 0°C. Questo permette di escludere la variabile temperatura esterna e soprattutto ci da indicazioni sullo stress nella zona di temperatura che è di interesse, cioè dallo 0 in giù.



$$\text{Thermal stress Index below } 0^\circ\text{C: } \sum_i (0 - T_i) \times 1\text{min} \geq 250 \text{ } ^\circ\text{C} * \text{min}$$

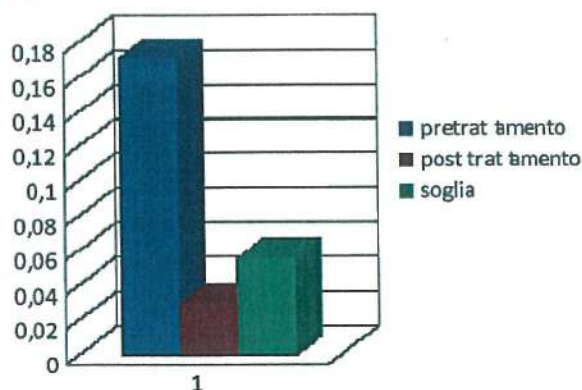
Tale espressione ci consente di quantificare lo stress termico (valore cumulato) che è minimo necessario applicare alla pianta per liberarla dall'infezione interna, o quantomeno per ripetere il netto miglioramento ottenuto nella prima campagna di test.



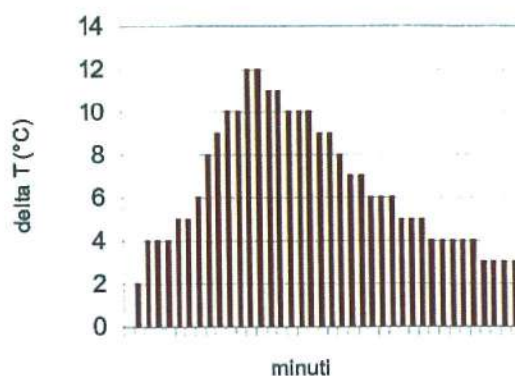
Giovanna Emanuele
Dottore Emanuele Guerra

Possiamo quindi associare il grafico dello stress termico nello xilema ai seguenti risultati (mediando sulle tre piante ad esempio):

assorbanza media piante 1-2-3



Stress termico nello Xilema $\Delta T_i \leq 0^\circ\text{C}$



Alcune osservazioni in merito ai risultati:

Riteniamo normale che ci siano dei rami negativi anche prima del trattamento; l'espansione dell'infezione avviene nel tempo ed è quindi normale che ci siano dei rami non infetti (seppur in minoranza) in piante malate.

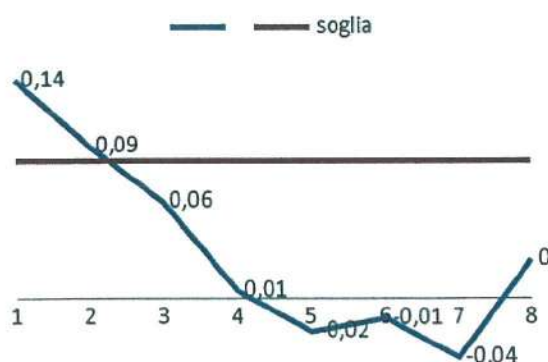
È altresì possibile riscontrare dei rami ancora positivi dopo il trattamento; questo può dipendere dall'intensità dell'infezione che sicuramente non è omogenea tra i vari rami e possono quindi esserci rami o zone della pianta che necessitano di un trattamento più prolungato.

Un'osservazione inoltre sulla ripetibilità intrinseca al test ELISA; notoriamente tale test risente di falsi positivi, se ne trovano diverse pubblicazioni in letteratura scientifica.

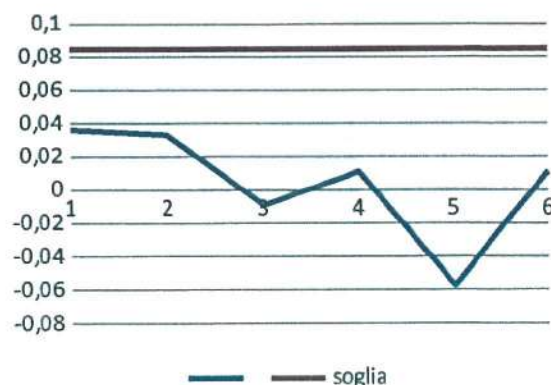
Per farcene un'idea abbiamo eseguito diverse ripetizioni del medesimo campione.

Nella prima serie da sei tutti i campioni sono negativi mentre su un'altra serie di ripetizioni in due casi su 8 i risultati sono stati appena oltre la soglia della positività mentre gli altri 6 sono allineati e negativi.

8 RIPETIZIONI



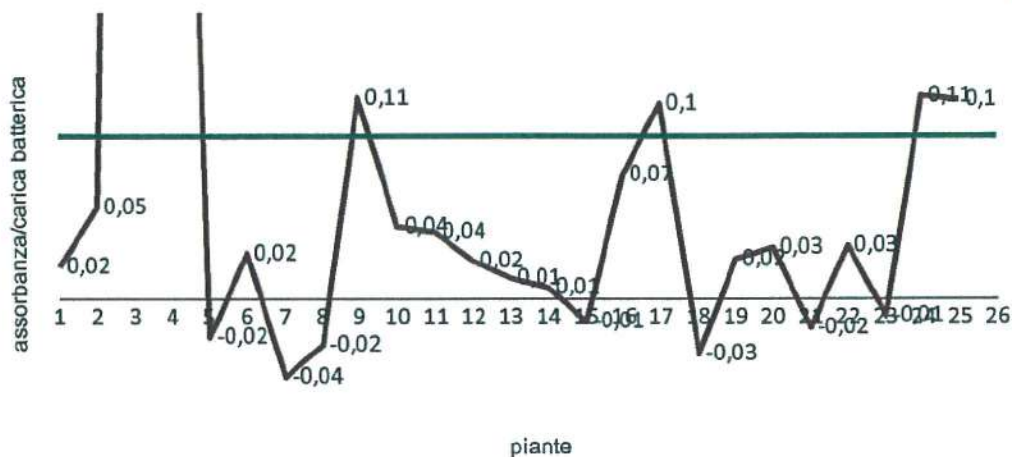
RIPETIZIONI SU MEDESIMO CAMPIONE



Si conferma quindi anche nel nostro caso il verificarsi di falsi positivi con il metodo ELISA, seppur sempre molti vicini alla soglia.

piastra 3 P4,5,10,11,12

post trattamento



Il grafico sopra riporta l'andamento dei risultati nella piastra successiva: i primi due punti sono riferiti ai controlli positivi (CP) mentre tutti i successivi punti relativi alle piante sono sotto soglia o , in pochi casi, appena sopra la soglia della positività. Importante sottolineare che, pur considerando positivi questi probabili "falsi positivi", numerose sono state le piante che hanno mostrato totale negatività nel post trattamento (piante non più infette). Tali piante, inizialmente infette, dopo pochi giorni dal trattamento hanno manifestato segni di ripresa (nuove foglie) a conferma della bontà del trattamento (Per quanto riguarda la salute delle piante trattate, non solo nel corso di questo anno, ma anche il precedente è stato verificato che tutte le piante sono tornate a produrre foglie, e quindi fotosintesi, per la produzione di nuovi rami).



33
Seli
Guerra Emanuele
 Dottore Emanuele Guerra

12. CONCLUSIONI

Dopo aver preso parte alle fasi di campionamento e aver eseguito l'analisi dei dati relativi agli stress termici, dopo aver analizzato i risultati ottenuti con il KIT ELISA, risulta evidente l'esistenza di un legame tra lo stress termico indotto dal sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix Srl e la carica batterica interna allo Xilema.

L'energia sottratta alla pianta sotto forma di calore, ghiaccia l'acqua interna allo xilema e arreca danno meccanico e/o metabolico ai batteri interni ai canali linfatici.

È importante notare come questa fase di congelamento dei vasi Xilematici conduca ad un'inevitabile dilatazione di tutto il sistema xilematico (riming).

Tale fenomeno di natura termodinamica favorisce un ripristino di attività e funzionalità delle zone di conduzione xilematica che precedentemente erano intasate dalla carica batterica interna (motivo della morte del ramo e/o della pianta).

In particolar modo, come già riscontrato in letteratura e nel corso di questa campagna, risulta necessario un discreto periodo (almeno 20 minuti) in cui la temperatura dello xilema scende sotto i -5°C.

Il protocollo si compone quindi di un profilo termico che, se applicato alla pianta tramite dispositivo "Ice Sanisystem" di Sanitrix Srl, garantisce l'abbattimento della carica batterica di Xylella fastidiosa.

Tale profilo termico, di cui sopra alcuni accenni, viene eseguito in automatico dal software interno a "Ice Sanisystem" di Sanitrix Srl e viene quindi reso facilmente ripetibile su tutte le piante che necessitano il trattamento.

Ritengo inoltre che il sistema presenti anche dei vantaggi dal punto di vista della tecnologia in quanto non richiede nebulizzazioni in chioma di biocidi o l'utilizzo di pesticidi dannosi per l'ambiente circostante, differentemente quindi dalla nebulizzazione in chioma di biocidi e/o fitoterapici tossici che facilmente si disperdono in aria e nel terreno, peggiorando, di fatto, il problema. Detto sistema è adattabile a tutti i tipi di cultivar ed anche alle pregiatissime piante millenarie.

La valutazione dell'efficacia del sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix Srl è stata testata utilizzando come pianta cavia l'ulivo; Questa scelta è stata dettata sia dalla facile disponibilità di piante positive ad un batterio che è ben noto all'opinione pubblica.

I risultati ottenuti devono quindi spronare ad una seria valutazione del dispositivo di Sanitrix Srl come valido strumento di contenimento dei problemi ambientali, economici (ma anche sociali) legati ai danni enormi che il battere comporta.

ULTERIORI CONSIDERAZIONI FINALI:

I test eseguiti suggeriscono una validità generale a livello di tecnologia; è facilmente ipotizzabile che il medesimo trattamento possa portare benefici anche ad altre tipologie di piante che manifestino problemi legati a batteri vari. Per ogni tipologia di pianta da trattare (come fatto nel caso dell'ulivo) si riterrà necessario conoscere lo stress termico sopportabile dalla pianta e letale per il parassita.

Inoltre, considerata la situazione attuale in Puglia, è consigliabile proporre e utilizzare il sistema SANITRIX, anche su piante d'ulivo secolari il cui valore storico, culturale ed economico richiede tutti i possibili sforzi per evitarne la morte o lo sradicamento.

Anche in questo caso, vista la differente conformazione di alberi secolari rispetto a quelli finora analizzati, sarà necessario, applicando lo stesso metodo qui mostrato, individuare il valore di stress efficace contro il battere e sopportabile dalla pianta.

Consiglio inoltre, per un migliore monitoraggio dei processi a venire, di utilizzare sempre le termocoppie all'interno dello xilema durante il processo e, se possibile, aumentarne il numero per avere una migliore cognizione e garanzia dell'efficacia del trattamento.

13. CONSIDERAZIONI ETICHE

DICHIARAZIONE DI HELSINKI.

La versione attuale della Dichiarazione di Helsinki (2013) è di riferimento per gli aspetti etici di questo studio clinico e sarà rispettata da tutti coloro che sono impegnati in questa ricerca.

RESPONSABILITÀ DELLO SPERIMENTATORE

Ogni Sperimentatore è responsabile della conduzione dello studio in accordo con le attuali linee guida ICH/GCP di buona pratica clinica, che rappresentano lo standard internazionale di qualità per la progettazione, la conduzione e la divulgazione degli studi. L'aderenza a questi standard garantisce che i diritti, la sicurezza e il benessere dei soggetti coinvolti nello studio siano salvaguardati, e che i dati ottenuti dallo studio siano credibili.

DEVIAZIONI DAL PROTOCOLLO ED EMENDAMENTI

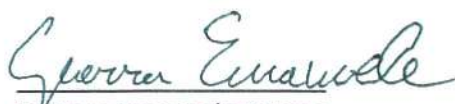
Gli allegati al presente protocollo costituiscono parte integrante dello stesso. Gli investigatori non potranno fare modifiche al protocollo dopo l'approvazione del Comitato Etico. Qualsiasi cambiamento dovrà essere concordato con il Responsabile scientifico dello studio e sarà oggetto di emendamento, secondo le modalità previste dalla normativa vigente.

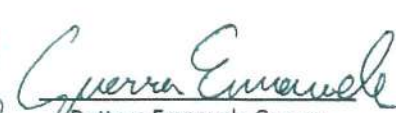
ACCORDO DI SEGRETEZZA

La proprietà dei dati generati in questo protocollo sono dei Sigg. Gatta Giovanni e Fantoni Nicola, proprietari del sistema brevettato. Tutti i materiali, le informazioni (orali o scritte) e la documentazione inedita fornita ai coordinatori e investigatori, riguardante questo protocollo, sono considerati riservati e non possono essere comunicati a terzi.

Il presente protocollo viene utilizzato da Sanitrix SRL per analizzare e studiare al meglio il sistema brevettato.

Torbole Casaglia (BS), il 28 Ottobre 2019.


Dottore Emanuele Guerra

  
Dottore Emanuele Guerra

100

N. 1576 di Repertorio

VERBALE DI ASSEVERAZIONE DI PERIZIA
REPUBBLICA ITALIANA

L'anno duemiladiciannove, il giorno sei del mese di novembre

06-XI-2019
In Brescia, nel mio studio sito in Piazza Monsignor Giuseppe
Almici al civico n.13.

Avanti a me Selina Generali, Notaio residente in Brescia,
iscritta presso il Collegio Notarile di Brescia, è presente
il signor: _____

GUERRA EMANUELE, nato a Brescia il giorno 1 agosto 1979,
residente a Concesio (BS), via Valpiana n.45, Codice Fiscale
GRR MNL 79M01 B157U.

Detto comparente, cittadino italiano della cui identità
personale io Notaio sono certo, mi presenta il Protocollo di
ricerca inerente l'analisi dell'efficacia del sistema "ICE
SANISYSTEM" nel debellare il batterio "Xilella Fastidiosa"
nelle piante "Olea Europaea", redatta nella sua qualità di
Dottore Magistrale in Fisica dell'Ambiente, chiedendomi di
asseverarla con giuramento, ai sensi dell'articolo 1 del
R.D.L. 14 luglio 1937 n.1666.

Quindi deferisco il giuramento al comparente, previa seria
ammonizione da me notaio effettuata allo stesso sulle
conseguenze delle dichiarazioni mendaci o reticenti e
sull'obbligo di dichiarare la verità. Il comparente presta
quindi il giuramento, pronunziando le parole: "Giuro di aver
bene e fedelmente adempiuto all'incarico ricevuto e quindi
redatto la perizia che precede al solo scopo di far
conoscere la verità". _____

Richiesto io Notaio ho ricevuto il suesteso atto del quale
ho dato lettura al comparente che lo sottoscrive con me
Notaio in calce.

Scritto con sistema elettronico da persona di mia fiducia, a
mia personale assistenza e dettatura, completato a mano di
mio pugno, occupa sin qui del presente foglio. _____

Guerra Emanuele
Selina Generali



SECONDA SESSIONE ANALISI

ESEGUITO DA SANITRIX

DICEMBRE 2019

1. INTRODUZIONE

Per approfondire la ricerca relativa al sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix e alla sua efficacia sul battere della *Xylella Fastidiosa* attualmente contenuto nello Xylema di molti ulivi in Puglia, e non solo, indichiamo ai laboratori Clodia la necessità di reperire il kit di analisi per PCR ed ELISA, specifici per *Xylella*.

Differentemente dalla prima sessione del protocollo, decidiamo di utilizzare l'analisi molecolare in quanto più affidabile e ripetibile nei risultati. Continueremo inoltre ad usare il test ELISA, anche se la bassa ripetibilità dei risultati ottenuti nella prima sessione ci porta a fare affidabilità sul test PCR.

Dopo aver riscontrato in letteratura i frequenti problemi legati ai numerosi falsi positivi restituiti dal test ELISA, l'utilizzo del test molecolare ci porterà ad una certezza dei risultati ottenuti.

I lavori relativi a questa seconda sessione mirano anche ad ottenere ulteriori informazioni in merito allo stress termico e alla sua durata minima necessaria per debellare il battere contenuto nella pianta da trattare.

Tale seconda sessione avviene infatti a quasi 4 mesi dalla precedente che era avvenuta a temperature intorno ai 30°C ambientali. Ripetere tali test a partire da una temperatura di circa 15°C ci permetterà di ottimizzare i tempi del trattamento, limitando notevolmente l'utilizzo di Anidride Carbonica, con notevoli benefici dal punto di vista della gestione logistica e dei costi inerenti al trattamento.

L'esecuzione dei test prevede il rispetto del protocollo messo a punto nella prima sessione, con l'obiettivo di individuare della piante positive da trattare, per poi verificarne la positività o negatività al test PCR post trattamento.

I test su sei piante verranno effettuati applicando diversi stress termici, sia per durata che per intensità, per individuare il minor stress termico necessario a rendere negativo l'esito dei test molecolari.

SECONDA SESSIONE DI ANALISI

Premessa:

La preparazione delle piante da trattare avviene secondo quanto descritto nella prima parte del presente protocollo, così come la modalità di campionamento, che riportiamo per completezza:

PRELIEVO DEI CAMPIONI

Il campione deve essere costituito da 8/10 rametti di 15-20 cm con foglie. Il prelievo dei campioni va effettuato con l'ausilio di uno svettatoio telescopico, bisogna campionare nei settori della chioma che presentano sintomi, prestando cura nel prelevare rametti non interessati da disseccamento, ma rametti ancora vitali e in vegetazioni.

I campioni vengono prelevati in maniera casuale cercando di prelevare campioni da diverse posizioni della pianta per valutare l'intero comportamento della pianta al trattamento.

È molto importante assicurarsi che sulle porzioni vegetali campionate non vi siano insetti alati potenziali vettori di *Xylella Fastidiosa*; pertanto è necessario scuotere energicamente e/o sottoporre a lavaggio, le parti vegetali che possono ospitare insetti, assicurandosi di non movimentare insetti in qualsiasi stadio vitale.

ATTREZZATURE

Ove possibile il materiale da campionare può essere prelevato con il solo uso delle mani oppure con l'ausilio di cesoie/svettatoi, opportunamente disinfettati tra il campionamento di una pianta e la successiva.

Nel caso specifico dell'olivo, considerando che il batterio è rilevabile soprattutto nei rami e nelle branche prossimali a quelle che mostrano sintomi, spesso localizzate nella parte alta della chioma, è necessario adoperare svettatoi telescopici per poter prelevare il campione in maniera adeguata.

TRASPORTO

Le buste relative ai campioni di uno stesso sito devono essere raggruppate in bustoni dove vengono riportati i dati relativi al luogo, data del prelievo e squadra di tecnici. I campioni devono essere conservati in frigo sia in campo che durante il trasporto ai laboratori. È estremamente importante non lasciare i campioni al sole, anche riposti nelle borse frigo.

I campioni devono essere consegnati dagli agenti fitosanitari, o da personale appositamente incaricato, ai laboratori nella stessa giornata del prelievo.

2. PREPARAZIONE

La preparazione delle piante da trattare, prevede, come precedentemente descritto, la pulitura della pianta da parte dei rami manifestatamente infetti (secchi).

Il fatto che i prelievi delle foglie e rametti da analizzare avvenga prelevando foglie ancora vitali, indica chiaramente come il batterio si possa estendere per tutto il sistema linfatico (Xylema) di ramo in ramo, arrivando a disseccare l'intera chioma.

I campioni non sono quindi stati presi da rami secchi, ma da rami ancora vitali, con foglie verdi, mentre la parte già secca viene asportata prima del trattamento.

Le piante trattate, di cui le foto sottostanti, sono quindi piante a cui sono state asportate le parti vistosamente malate; l'obiettivo è quindi quello di uccidere il battere che ancora infetta la pianta prima che possa raggiungere le parti della pianta ancora non infette.

È probabile che troveremo sia campioni positivi, sia campioni negativi nelle piante pretrattamento.

I campioni positivi indicheranno che l'infezione ha già raggiunto le ultime foglie verdi presenti sulle piante già pulite, i campioni che restituiranno un valore negativo indicheranno piante in cui l'infezione non ha ancora raggiunto le ultime parti vive, ma lo farà a in breve tempo a meno che il battere non venga ucciso.



Come si nota facilmente le piante interessate al trattamento sono state già private della parte malata; i campioni di foglie e rametti sono stati prelevati dai restanti rami verdi, con foglie non secche. Sono quindi rami destinati a seccarsi nel giro di poche settimane o mesi in quanto il battere sarà in grado di infettare anche queste ultime parti verdi, non tanto per la Sputacchina ma per l'estendersi dell'infezione internamente allo Xylema.

Sono state scelte sei piante appartenenti al medesimo appezzamento di terra, al centro di un territorio devastato dal battere, in Puglia: Piante di questo tipo (come la maggior parte delle piante presenti nel territorio Pugliese) sono destinate a morire in quanto l'infezione si estenderà presto ai rami ancora non malati.

Inoltre tali piante, infette, sono potenziali fonti di ulteriore diffusione del battere in quanto l'insetto vettore può prelevare il battere da tali piante e infettarne altre sane.

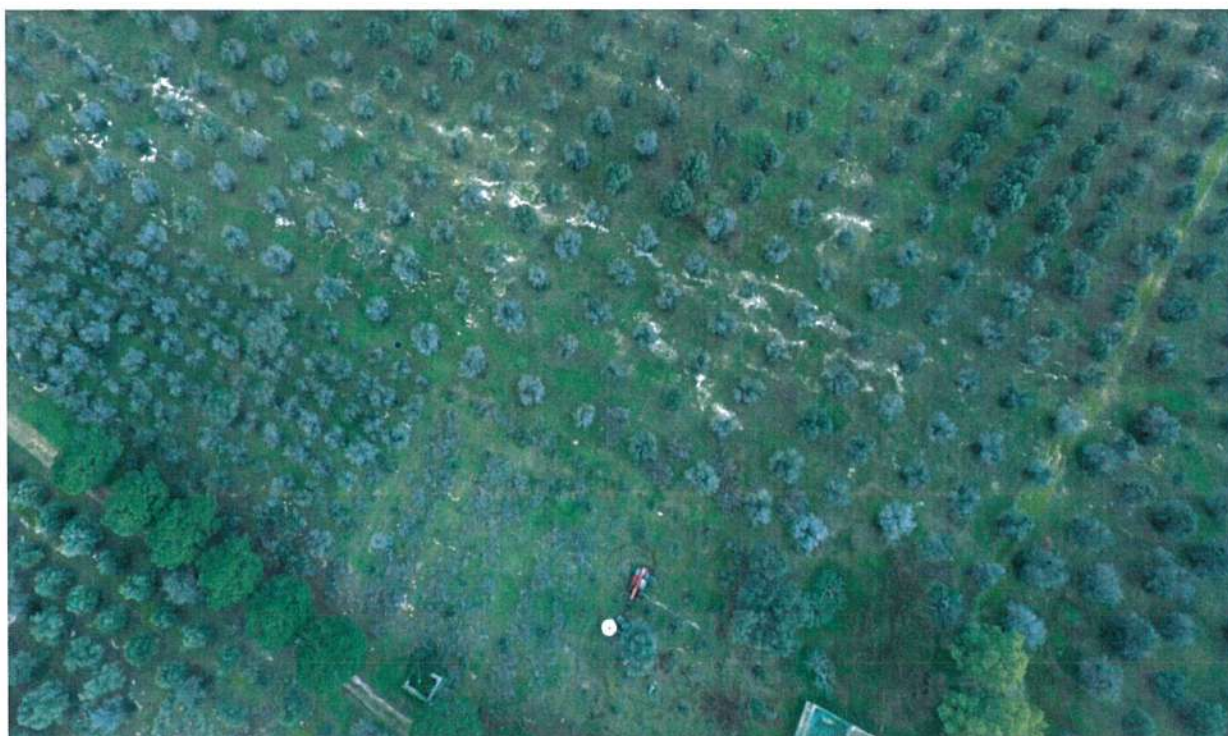
È proprio su tale tipologia di piante che il sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix può portare un enorme beneficio, alla pianta e al territorio; eliminando la carica batterica interna allo Xylema, sia sulle foglie che sui rami, mediante lo stress termico indotto, sarà possibile preservare le parti non infette della pianta, permettendo alla pianta di sopravvivere senza poter diventare pericolosa per altre piante del territorio.

Foglie verdi residue da analizzare



Rami malati già recisi

Nella foto sottostante viene circoscritta l'area del campionamento di questa seconda sessione di analisi:



SECONDA SESSIONE DI ANALISI

Nella foto seguente la posizione delle piante analizzate nella prima sessione e la posizione relativamente all'area interessata dalla seconda sessione:



Si nota facilmente come le piante analizzate, sia nella prima che nella seconda sessione si trovino in un contesto che manifesta i chiari sintomi dell'infezione da Xylella Fastidiosa (Rami secchi, privi di foglie verdi).

3. RACCOLTA DATI

Come avvenuto nella prima sessione, il sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix dispone di termocoppie e datalogger per raccogliere e monitorare l'andamento delle termiche interne alla campana e interne allo Xylema.



Ecco la disposizione delle sonde di temperatura interne allo Xylema: sono inserite in un foro profondo 20 mm a diverse altezze della pianta e ci indicano la reale temperatura al di sotto della corteccia.

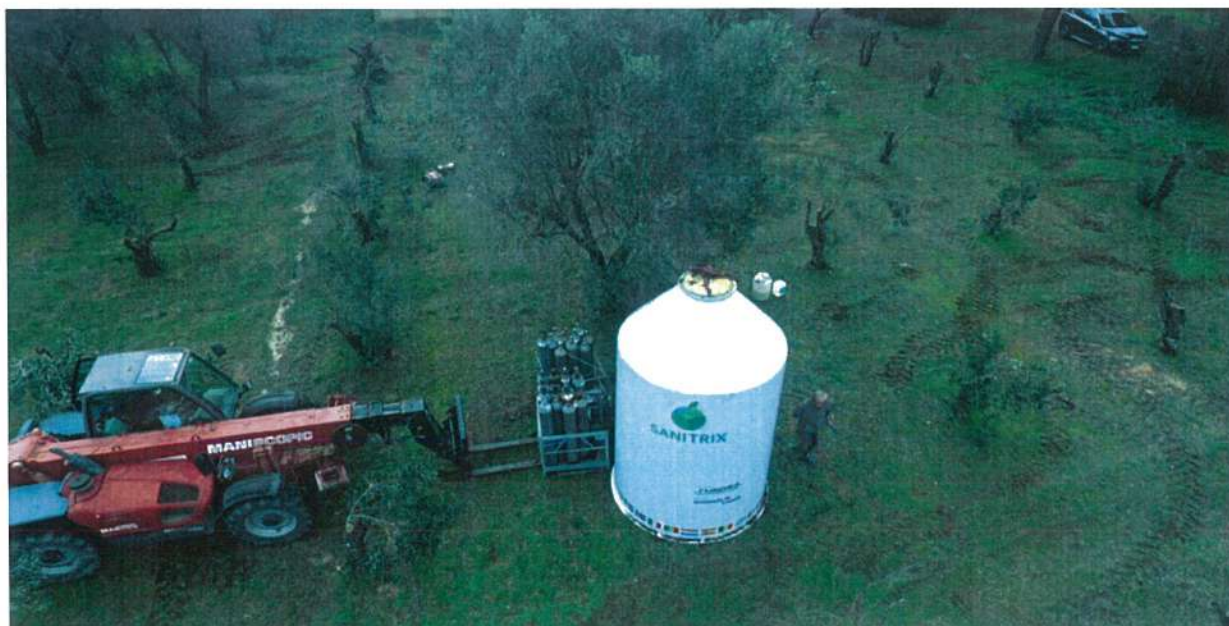
Tale temperatura è quindi rappresentativa dello stress termico subito dal sistema Pianta-batteria indotto dal trattamento "Ice Sanisystem".

Si notano chiaramente sia le parti di pianta tagliate, sia le foglie verdi presenti su rami ancora non secchi, ma potenzialmente già infetti. I campioni da analizzare, sia pre che post trattamento, sono stati prelevati da tali rami.

Tali piante rappresentano quindi uno stadio terminale della vita della pianta, qualora non ci sia un intervento efficace in grado di eliminare la carica batterica di Xylella internamente alla pianta.

Grazie all'Anidride Carbonica rilasciata dai numerosi nebulizzatori interni alla campana potremo modulare lo stress termico e monitorarlo sia con sonde ambientali (3 sonde ambientali: bassa, media e alta), sia con le sonde interne alla pianta (5 sonde interne).

Tutto viene monitorato e registrato dal datalogger.



SECONDA SESSIONE DI ANALISI

Riportiamo, a titolo di esempio, il file restituito dal datalogger per la pianta 1:

SONDE	1	2	3	4	5	AMB BASSA	AMB MEDIA	AMB ALTA
16/12/2019 15:27:00	6	0	-1	1	-3	-48	-51	-38
16/12/2019 15:28:00	5	0	-1	0	-4	-50	-52	-39
16/12/2019 15:29:00	5	0	-2	0	-3	-48	-50	-38
16/12/2019 15:30:00	5	1	-1	0	-3	-46	-47	-37
16/12/2019 15:31:00	6	1	0	1	-2	-44	-45	-36
16/12/2019 15:32:00	6	1	0	1	-1	-43	-43	-36
16/12/2019 15:33:00	6	1	0	1	-1	-43	-42	-36
16/12/2019 15:34:00	6	2	-1	1	-1	-41	-40	-35
16/12/2019 15:35:00	6	2	0	1	-1	-40	-39	-35
16/12/2019 15:36:00	6	2	0	1	0	-39	-37	-34
16/12/2019 15:37:00	6	2	0	1	0	-37	-35	-33
16/12/2019 15:38:00	6	2	0	2	0	-36	-34	-32
16/12/2019 15:39:00	6	2	-1	1	0	-35	-33	-32
16/12/2019 15:40:00	6	3	0	2	0	-34	-32	-30
16/12/2019 15:41:00	6	3	-1	1	0	-34	-31	-30
16/12/2019 15:42:00	6	2	-1	1	-1	-34	-32	-30
16/12/2019 15:43:00	5	2	-2	0	-2	-34	-32	-30
16/12/2019 15:44:00	5	2	-2	0	-2	-34	-32	-30
16/12/2019 15:45:00	5	1	-3	0	-2	-34	-33	-30
16/12/2019 15:46:00	4	1	-3	0	-3	-35	-34	-31
16/12/2019 15:47:00	4	1	-3	0	-3	-35	-34	-31
16/12/2019 15:48:00	4	0	-4	0	-4	-35	-34	-31
16/12/2019 15:49:00	4	0	-4	0	-4	-36	-35	-31
16/12/2019 15:50:00	3	0	-4	-1	-4	-36	-35	-32
16/12/2019 15:51:00	3	0	-5	-1	-5	-36	-36	-32
16/12/2019 15:52:00	3	0	-5	-1	-5	-36	-36	-32
16/12/2019 15:53:00	3	0	-5	-1	-5	-37	-36	-33
16/12/2019 15:54:00	3	0	-5	-1	-6	-37	-36	-33
16/12/2019 15:55:00	2	0	-6	-2	-6	-37	-37	-33
16/12/2019 15:56:00	2	0	-5	-1	-6	-37	-36	-32
16/12/2019 15:57:00	3	0	-5	-1	-5	-36	-35	-30
16/12/2019 15:58:00	3	0	-4	-1	-4	-35	-34	-29
16/12/2019 15:59:00	3	1	-4	0	-4	-33	-32	-28
16/12/2019 16:00:00	2	1	-4	0	-4	-34	-33	-29
16/12/2019 16:01:00	1	0	-5	-1	-5	-36	-34	-31
16/12/2019 16:02:00	1	0	-6	-2	-6	-38	-36	-32
16/12/2019 16:03:00	0	-1	-7	-3	-7	-40	-38	-34
16/12/2019 16:04:00	0	-2	-6	-4	-6	-41	-40	-36
16/12/2019 16:05:00	-1	-3	-8	-5	-7	-43	-42	-39
16/12/2019 16:06:00	-1	-4	-8	-5	-8	-45	-44	-41

Tutte le temperature sono espresse in Gradi centigradi.

Le colonne riportano la temperatura rilevata dalle cinque termocoppie interne allo Xylema e le tre temperature ambientali interne al sistema "Ice Sanisystem".

SECONDA SESSIONE DI ANALISI

Con questi dati è facilmente calcolabile lo stress termico indotto alla pianta ricorrendo alla formulazione proposta al termine della prima sessione di analisi:

$$\text{Thermal stress Index below } 0^{\circ}\text{C: } \sum_i (0 - T_i) \times 1\text{min} \quad \forall \quad T_i \leq 0^{\circ}\text{C}$$

Al termine della prima sessione avevamo ottenuto il seguente valore di riferimento:

$$\text{Thermal stress Index below } 0^{\circ}\text{C: } \sum_i (0 - T_i) \times 1\text{min} \geq 250 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min} \quad \forall \quad T_i \leq 0^{\circ}\text{C}$$

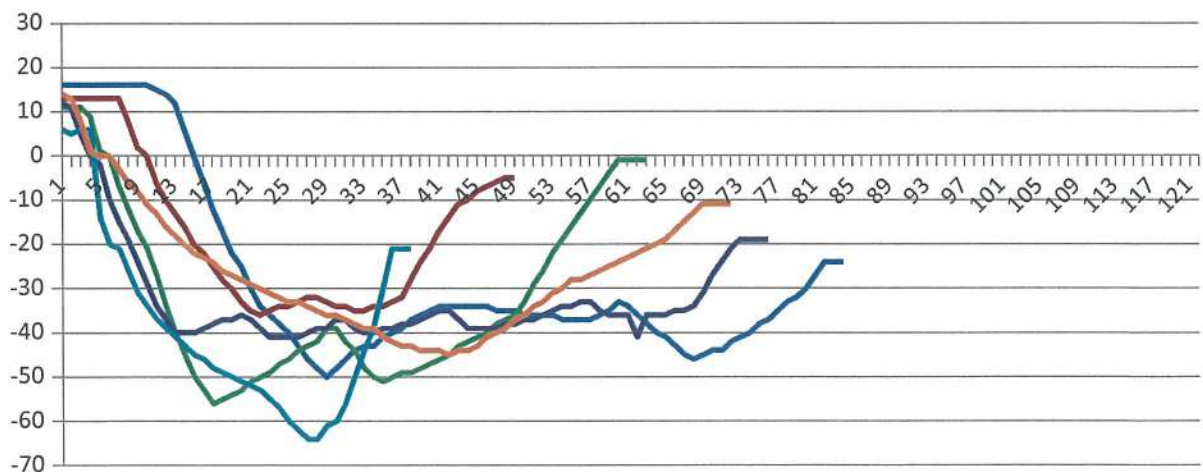
Sfrutteremo questa seconda sessione di analisi per verificare tale formulazione e possibilmente, abbassare tale valore in modo da rendere più sostenibile e veloce il trattamento.

Verranno eseguiti diversi trattamenti, differenti per durata e temperature, al fine di minimizzare lo stress minimo e necessario a rendere negativi campioni inizialmente positivi.

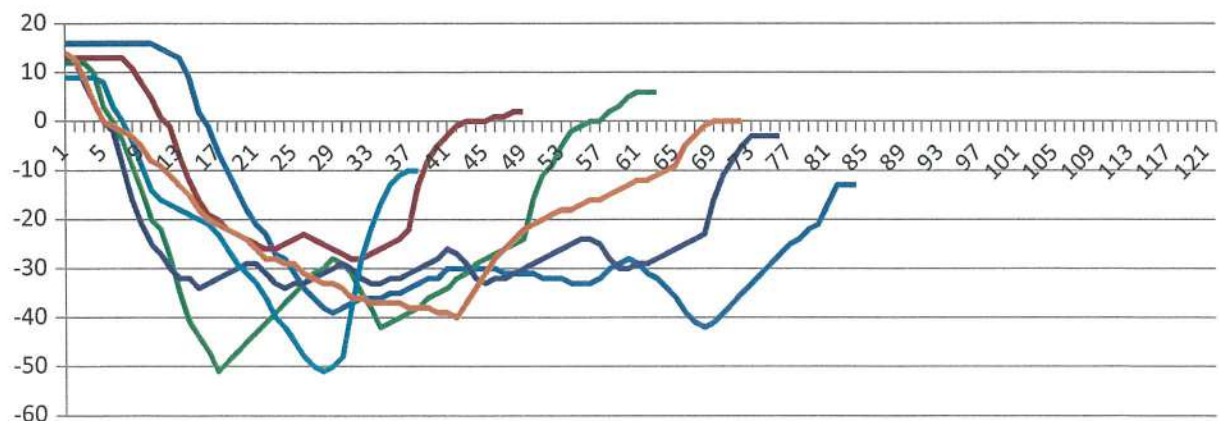
Di seguito i grafici relativi alle letture delle tre sonde ambientali, bassa, media e alta.

Tali valori mostrano, tendenzialmente, un gradiente decrescente di temperatura verso l'alto; tale differenza sono facilmente intuibile e dimostrano il buon funzionamento del sistema dal punto di vista della lettura de valori di processo.

TEMPERATURA AMBIENTALE BASSA



TEMPERATURA AMBIENTALE ALTA



SECONDA SESSIONE DI ANALISI

I grafici indicano l'andamento delle tre letture delle termocoppie ambientali;

Le temperature più basse si verificano in basso, le più elevate in alto.

Le sei diverse curve indicano i sei trattamenti eseguiti, come si vede differenti sia per durata che per intensità.

Al fine di ottenere un valore numerico da inserire nella formula dello stress termico minimo e sufficiente ad abbattere la carica batterica della Xylella, consideriamo la temperatura interna allo Xylema:

Come si vede è possibile modulare sia la durata sia l'intensità dello stress; la pianta 1 riceve uno stress meno intenso ma per una durata di tempo maggiore.

4. RISULTATI ANALISI MOLECOLARE PCR

Le analisi effettuate su sei piante hanno restituito diverse informazioni, tra cui:

- 1) Le piante, seppur già private della parte malata, sono ancora infette e i rami residui, seppur ancora con foglie verdi, verranno infettati a breve tempo dal diffondersi dell'infezione internamente allo Xylema.
- 2) Delle sei piante analizzate, abbiamo ottenuto 5 coppie di dati strumentalmente validi.
- 3) Di queste 5 piante 2 erano positive prime del trattamento.
- 4) Queste due piante POSITIVE, dopo il trattamento "Ice Sanisystem", sono risultate NEGATIVE.
- 5) Le altre 4 piante, inizialmente NEGATIVE, sono rimaste NEGATIVE dopo il trattamento.

Lo stress termico ceduto alla prima delle due piante risulta essere:

$$\sum_i (0-T_i) \times 1\text{min} (\forall T_i \leq 0^\circ\text{C}) = 224^\circ\text{C}*\text{min}$$

Lo stress termico ceduto alla seconda delle due piante risulta essere:

$$\sum_i (0-T_i) \times 1\text{min} (\forall T_i \leq 0^\circ\text{C}) = 204^\circ\text{C}*\text{min}$$

Possiamo ritenere quest'ultima equazione migliorativa e sostitutiva rispetto a quella ottenuta nella prima sessione. Ciò permette di stressare il meno possibile la pianta garantendo però l'abbattimento della Xylella Fastidiosa interna allo Xylema.

Possiamo pertanto scrivere:

$$\sum_i (0-T_i) \times 1\text{min} (\forall T_i \leq 0^\circ\text{C}) \geq 204^\circ\text{C}*\text{min}$$

Individuato tale valore minimo è consigliabile applicare un fattore di sicurezza (o garanzia) pari al 110% del valore trovato. È già stato dimostrato "in vivo" che la pianta è in grado di sopportare tale stress.

Possiamo quindi concludere:

$$\sum_i (0-T_i) \times 1\text{min} (\forall T_i \leq 0^\circ\text{C}) \geq 225^\circ\text{C}*\text{min}$$

Questa formula, tenendo conto che considera le temperature interne allo Xylema, vale anche per piante di dimensioni diverse da quelle analizzate nel corso di questo studio.

Le temperature ambientali sono invece da ritenersi valide solo per piante di dimensioni simili a quelle analizzate.

Risulterà quindi sempre essenziale poter conoscere e registrare le temperature interne allo Xylema, indipendentemente dalla dimensione della pianta.

5. MANTENIMENTO DELLE PIANTE IN BUONA SALUTE POST TRATTAMENTO

Per minimizzare al massimo la possibilità che una pianta trattata possa nuovamente contrarre infezioni da Xylella Fastidiosa, il sistema "Ice Sanisystem" permette di nebulizzare al suo interno non solo gas, ma anche nebulizzati liquidi fitoterapici.

Abbiamo pertanto individuato dei prodotti fitoterapici che possano essere nebulizzati post o pre trattamento al fine di agevolare la nuova crescita fogliare ma anche di mantenere inattaccabile la pianta da parte di possibili insetti vettore.

La possibilità di nebulizzare in automatico quantità ben precise di fitoterapici biologici senza disperderli in maniera eccessiva nell'ambiente (al fine di mantenere sana la pianta nel tempo) ci permette di trasformare un trattamento prettamente curativo (lo stress termico) in un trattamento completo, che non solo cura la pianta ma le permetterà di rimanere in salute nel tempo.

Abbiamo così, in seguito a numerose ricerche in merito, individuato il seguente mix di antibatterici/fitoterapici naturali che verrà integrato nel protocollo come fase finale del trattamento:

- Acido acetico, Acido acetilsalicilico, Olio di neem

Tale mix nebulizzato post trattamento verrà in parte assorbito dalla pianta, in parte rimarrà a costituire un layer del mix sulla pianta che possa scoraggiare gli insetti dall'essere attratti dalla pianta (funzione repellente). L'origine naturale e non tossica di tali sostanze nebulizzate può definire biologico tale trattamento, in quanto non vengono utilizzati prodotti di origine sintetica che possano recare danno al sistema circostante la pianta trattata.

6. CONSIDERAZIONI SULL'ESTENSIONE DEL TRATTAMENTO DA ESEGUIRE

Il trattamento "Ice Sanisystem" di Sanitrix vanta una buona versatilità: può essere effettuato a singole piante ornamentali da giardino, così come a estese culture di ulivi.

È ovvio che per ottenere risultati soddisfacenti e stabili nel tempo, l'area da trattare debba essere più ampia possibile (nel caso di estese aree coltivate).

Ciò vuol dire che è consigliabile eseguire il trattamento "Ice Sanisystem" su zone ampie che possano essere poi monitorate nel tempo.

Sarebbe quindi opportuno, per ottimizzare i risultati e mantenerli nel tempo, partire con il trattamento "Ice Sanisystem" dalle così dette "Zone cuscinetto" e continuare i trattamenti verso le zone interne colpite dal problema *Xylella Fastidiosa*.

Un'operazione eseguita in parallelo con numerose campane permetterebbe quindi non solo di contenere l'area focolaio ma anche di evitare ritorni della malattia nel tempo. Gli insetti vettore del battere *Xylella* infatti hanno autonomia di spostamento di poche decine di metri.

E' quindi auspicabile poter applicare il trattamento "Ice Sanisystem" su ampie zone infette per poter bonificare dal battere un'ampia zona e mantenerla sana e produttiva negli anni seguenti.

GRAFICI LABOCLODIA PCR:

www.qiagen.com

Quantitation Report

Experiment Information

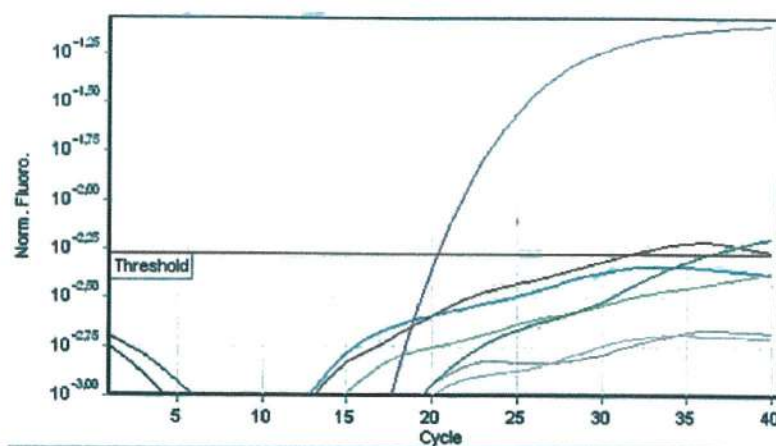
Run Name	XYLELLA Run 2019-12-18 (1)
Run Start	18/12/2019 13.55.51
Run Finish	18/12/2019 15.20.35
Operator	MS
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	,

Quantitation Information

Threshold	0,00536
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	6
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Dottor Emanuele Guerra

Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1			Unknown	31,96			
2			Unknown				
3			Unknown				
4			Unknown				
5			Unknown				
6			Unknown				
7			Unknown				
8			Unknown				

(Continued on next page)...

No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
9			Unknown	36,57			
10			Unknown	20,36			
11			Unknown				
12			Unknown				

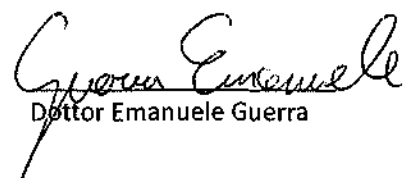
file://C:\Documents and Settings\pc\Impostazioni locali\Temp\REPTMP\1.html

08/01/2020

13		Unknown				
----	--	---------	--	--	--	--

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold. NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold. Legend:

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
Copyright © 2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)


Dottor Emanuele Guerra



www.qiagen.com

Quantitation Report

Experiment Information

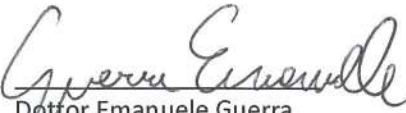
Run Name	XYLELLA Run 2019-12-17 (1)
Run Start	17/12/2019 13.09.04
Run Finish	17/12/2019 14.33.20
Operator	MS
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	,

Quantitation Information

Threshold	0,00551
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	6
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

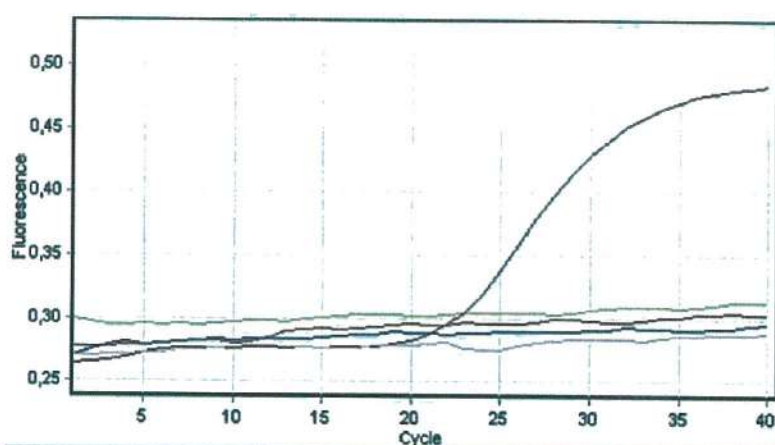
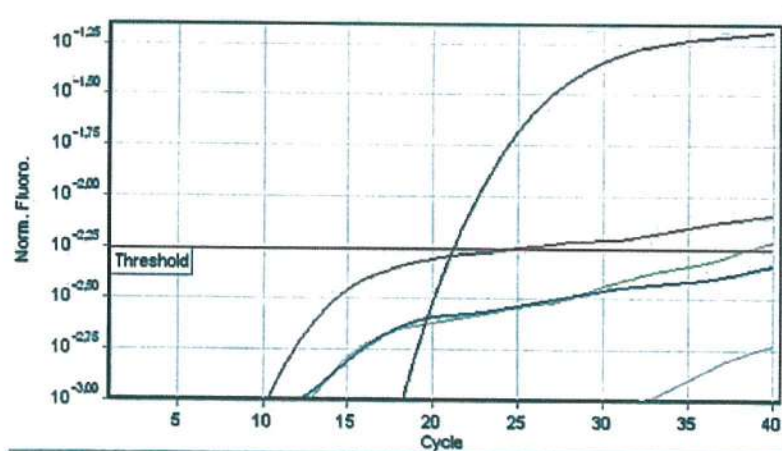
Messages

Message


Dottor Emanuele Guerra

Profile

Cycle	Cycle Point
min secs Hold@95°,150	
(repeats) Cycling 40	Step 1@95°, hold15secs, acquiring toCycling A([Green][1][1])
	Step 2@62°, hold45secs

Raw Data For Cycling A.Green**Quantitation data for Cycling A.Green**

Standard Curve



No.	Colour	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	■		Unknown	24,69			
2	■		Unknown	38,36			
3	■		Unknown				
4	■		Unknown	21,21			
5	■		Unknown				

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold. NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold. Legend:

This report generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0 (Build 9)
Copyright © 2010 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

7. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questa seconda sessione di analisi rafforzano le conclusioni della prima sessione.

Le analisi molecolari hanno mostrato che le piante inizialmente positive alla Xylella Fastidiosa sono diventate negative post trattamento. Tutte le piante negative pre trattamento sono rimaste negative, segno dell'affidabilità e ripetibilità di questo metodo.

L'ipotesi che lo stress termico indotto alla pianta dal sistema "Ice Sanisystem" abbia un effetto diretto sul battere della Xylella Fastidiosa ha trovato conferma. Non solo, le piante trattate mesi fa risultano ad oggi presentare chiari segni di ripresa, con nuovi getti e foglie.

La quantità di stress ceduto dal sistema "Ice Sanisystem" di Sanitrix è stata fatale per il battere ma è stato sopportato dalla pianta.

Possiamo quindi concludere, dopo queste due sessioni, che i risultati ottenuti in ottemperanza dei metodi di analisi indicati dall'unione Europea, indicano chiaramente una diretta relazione tra il trattamento e i risultati microbiologici

Le piante trattate, qualora positive, sono risultate negative al battere nelle analisi post trattamento.

È probabile che indurre stress minori al limite individuato possa non essere efficace sul battere.

Così come è probabile che stress eccessivamente superiori al limite minimo individuato possano arrecare danno alla pianta, oltre che al battere.

Ciò che questo capitolato ha individuato è un valore minimo di stress, facilmente quantificabile, in grado di rendere negative al battere piante che in precedenza erano positive, senza arrecare un danno fisiologico alla pianta trattata.

La quantificazione di tale stress permette al processo di essere eseguito in maniera automatica e ripetibile, senza alcun impatto ambientale negativo.

Abbiamo inoltre avuto conferma di quanto si trova in letteratura in merito al test ELISA; risulta essere molto più economico del test PCR ma può portare a risultati non realistici.

Si consiglia pertanto, qualora lo si ritenesse utile o fattibile, di continuare in futuro ad utilizzare il metodo molecolare PCR per evitare di avere risultati non affidabili.

Come atto conclusivo di questo protocollo potrebbe essere utile, ora che il processo e l'analisi dati sono stati ben messi a punto e verificati, eseguire analisi PCR su un campione più ampio e diversificato per età e/o dimensioni.