

(AllegatoA)

ISTRUZIONI OPERATIVE SULLE MODALITÀ DI PRELIEVO DEI CAMPIONI DI MATRICI APISTICHE, VEGETALI, ACQUA E TERRENO IN CASO DI MORIA DI API O SPOPOLAMENTO DI ALVEARI

1. Scopo e campo di applicazione

In caso di moria di api da miele (*Apis mellifera*) o di fenomeni di spopolamento di alveari è necessario provvedere al prelievo di campioni al fine di risalire alle cause del fenomeno. Il prelievo di campioni da analizzare deve riguardare le api stesse o i prodotti dell'alveare (cera, miele, polline, propoli), nonché parti di vegetali, terreno o altre matrici qualora esista il sospetto che la moria o lo spopolamento possa essere attribuito all'utilizzo di prodotti fitosanitari su colture in atto in prossimità degli apiari o comunque nell'area di bottinamento da parte delle api.

2. Modalità operative

Le segnalazioni di moria o spopolamento di alveari devono essere inviate a:

- alla Direzione Prevenzione e Veterinaria all'indirizzo e-mail: vetea@regione.piemonte.it e ai Servizi Veterinari delle ASL di competenza territoriale; (vedi elenco in allegato 1);
- alla Direzione Agricoltura - Settore produzioni Agrarie e Zootecniche, (e-mail: gianfranco.termini@regione.piemonte.it).

Il Veterinario referente per l'apicoltura dell'area territoriale interessata dal fenomeno, o la persona delegata ad operare in sua assenza, attiva immediatamente un gruppo di lavoro, composto almeno dal Veterinario referente per l'apicoltura e da un funzionario della Direzione Agricoltura con competenza in materia di apicoltura, per valutare la segnalazione ed effettuare tempestivamente il sopralluogo.

Il sopralluogo dovrà essere effettuato in

in maniera congiunta dalle diverse figure deputate all'intervento, veterinari, tecnici dell'Assessorato Agricoltura della Regione Piemonte che già operano per l'effettuazione di campionamenti inerenti le misure del PSR (compreso il tecnico apistico che opera in zona), così da indirizzare in maniera più efficace il tipo di prelievo/prova diagnostica da effettuare sul campione di api (ricerca della molecola chimica ritenuta possibile causa della moria sulla base della indagine anamnestica e delle pratiche agricole nelle zone circostanti/eventuale diagnosi differenziale) e sui vegetali o altre matrici presenti nella zona circostante l'apiario, o in appezzamenti limitrofi se necessario, eventualmente anche in assenza del conduttore del fondo in questione. Il prelievo dei campioni si esegue altresì per valutare le misure precauzionali adottate dagli utilizzatori di prodotti fitosanitari per evitare o ridurre il rischio di contaminazione da parte degli stessi a causa dell'effetto deriva. L'intervento dovrà essere effettuato entro massimo **24-36 ore** dalla segnalazione;

Le visite dovranno essere svolte in presenza dell'apicoltore applicando misure di sicurezza. Considerata la rapida degradazione (fotosensibilità) di molte molecole chimiche presenti nei prodotti fitosanitari è essenziale che gli apicoltori provvedano tempestivamente a segnalare i fenomeni di moria o spopolamento.

3. Fattori di criticità

Il campionamento deve essere effettuato nel più breve tempo possibile tenuto conto delle rilevanze scientifiche che hanno evidenziato la rapida degradazione di molecole insetticide entro

poche ore dal loro contatto con le api. E' necessario congelare immediatamente i campioni per sperare di individuare le molecole causa di apicidiosi e, per quanto riguarda le api, sarebbe necessario prelevare individui moribondi.

Il campionamento rappresenta, sull'intero processo del controllo analitico, un momento di elevata criticità, in quanto:

- a) condiziona i risultati di tutte le operazioni successive;
- b) incide in misura notevole sull'attendibilità totale del risultato dell'analisi;
- c) può essere fonte di contestazioni dei risultati analitici qualora non sia correttamente eseguito ed i campioni non siano stati correttamente identificati, sigillati, spediti e conservati.

Per tali motivi il campionamento deve essere eseguito con la massima accuratezza dai Veterinari e dai Tecnici della Regione che devono:

- porre attenzione nella identificazione della matrice oggetto di campionamento (evitando di mescolare e confondere matrici diverse);
- eseguire il campionamento secondo le modalità definite nel presente documento;
- utilizzare strumentazione adatta allo scopo e perfettamente pulita;
- tenere presenti le determinazioni analitiche che devono essere effettuate e gli eventuali suggerimenti da fornire al laboratorio di prova al quale il campione è destinato;
- adottare modalità di conservazione che garantiscano l'adeguata integrità del campione.

I campioni prelevati vanno **immediatamente congelati** e mantenuti in contenitori termici contenenti ghiaccio secco. La consegna al laboratorio di analisi deve comunque essere eseguita nel più breve tempo possibile avendo cura di mantenere la catena del freddo.

3.1 Materiale e strumentazione

Il materiale utilizzato per il prelievo, il trasporto e la conservazione del campione deve essere chimicamente inerte, tale da non contaminare i prodotti campionati. In particolare gli strumenti che entrano in contatto con la matrice campionata devono essere ergonomici, facilmente pulibili, nonché resistenti alle sollecitazioni conseguenti all'uso.

Gli strumenti ed il materiale di cui Veterinari e Tecnici della Regione dovranno essere dotati al momento del prelievo sono:

- guanti di lattice monouso per la manipolazione delle sostanze da campionare;
- sacchetti di plastica da congelatore, capacità 4 litri;
- quando necessario, contenitori in vetro o altro materiale idoneo per sostanze liquide;
- materiale per sigillare e identificare i campioni (es. spago fino per la chiusura dei sacchetti; piombini o altro materiale idoneo per sigillare i campioni; cartellini per etichettare i campioni);
- taglierino o coltello per il prelievo di parti verdi;
- sonde o trivella o vanga per il prelievo di terreno;
- secchio di plastica oppure sacchi di plastica tipo rifiuti per la raccolta del campione in campo e la miscelazione del campione globale;
- contenitori termici per il trasporto dei campioni;
- sacchetti autosigillanti quando necessari.

3.1.1 Etichettatura

Ogni sacchetto o altro recipiente contenente il campione deve essere sigillato in maniera da evitare contraffazioni al medesimo e dotato di etichetta che consenta di collegare il campione al verbale di campionamento.

3.1.2 Verbalizzazione

Le operazioni effettuate ai fini del campionamento di materiale da sottoporre ai controlli di cui al presente documento devono essere puntualmente riportate in un verbale di campionamento.

È indispensabile che chi preleva il campione registri in tale documento almeno:

1. la data e il luogo del campionamento;
2. i nominativi di chi ha effettuato il campionamento;
3. indicazioni relative all'azienda da cui è stato prelevato il prodotto;
4. le coordinate geografiche;
5. la matrice;
6. ogni ulteriore indicazione utile ad individuare e descrivere la zona di prelievo, lo stato dei luoghi (è utile annotare le colture presenti nei paraggi dell'apiario (<1 km) , nonché eventuali considerazioni dell'Ispettore;
7. eventuali dichiarazioni delle parti presenti nel momento del campionamento.

Il verbale deve essere redatto in triplice copia, una per chi effettua il campionamento, una per l'agricoltore controllato, se presente alle operazioni, se terzo rispetto all'apicoltore, e una per l'apicoltore stesso. Il verbale di campionamento deve essere controfirmato dal titolare dell'apiario o dell'azienda agricola controllata se presente alle operazioni, ogni soggetto firma la sua copia di verbale.

Se i documenti di campionamento sono redatti in forma computerizzata, non sarà possibile la loro contestuale firma e gli stessi saranno trasmessi alle persone presenti al campionamento inviandole ai loro indirizzi di posta elettronica.

3.2 Accertamento su aziende possibili causa dell'avvelenamento

Qualora sia possibile individuare aree probabilmente trattate con prodotti fitosanitari, che verosimilmente possono essere la causa della mortalità (anche in base alle informazioni anamnestiche fornite dagli apicoltori), occorre proseguire l'intervento per acquisire informazioni su tali trattamenti. Ci si indirizzerà primariamente ad aree collocate a breve distanza (< 1 km circa), essendo poco probabile che il problema sia a distanza maggiore; il trattamento potrebbe essere avvenuto non necessariamente su piante fiorite (es. semine con concianti/geodisinfestanti, fertirrigazione, trattamenti su piante con melata). Qualora si accerti la possibile causa della mortalità, si dovranno valutare le condizioni di utilizzo dei prodotti fitosanitari (es. prodotto utilizzato, condizioni operative, prescrizioni di utilizzo rispettate, presenza o meno di piante fiorite anche nelle vicinanze o piante spontanee sottostanti), l'avvenuta registrazione del trattamento e le possibili responsabilità. Si procederà al **campionamento** di vegetali oggetto di trattamento e/o di altre matrici che potrebbero essere di interesse (es. erba o altre piante, specie se con fioriture in atto, sottostanti o a breve distanza dalle colture trattate, acqua presente nelle pozzanghere, liquido irrorato direttamente sulle piante). Il campionamento di vegetali dovrà essere eseguito in modo ufficiale in 3 aliquote con verbale (almeno 200 grammi per aliquota), che dovranno essere congelate o inviate immediatamente al laboratorio di prova in regime di freddo.

4 Campionamento

4.1 Campionamento delle api (a cura dei Servizi veterinari)

Occorre verificare la presenza di api morte o moribonde (con incapacità al volo, ridotta mobilità, tremori, presenza di proboscide estroflessa) presenti soprattutto davanti agli alveari o dentro le arnie, sul fondo delle stesse. Compatibilmente con le condizioni climatiche, verificare anche le condizioni dei nidi. Considerare che l'erba alta, davanti agli alveari, ostacola notevolmente il rilevamento della mortalità e la raccolta delle api; per monitorare l'andamento del fenomeno e facilitare la raccolta di api può essere opportuno porre dei materiali puliti davanti agli alveari (es. teli, coperchi degli alveari rovesciati...) o effettuare lo sfalcio. Se rientrano api con polline, annotarne il colore e se tali api presentino o meno sintomatologia. Negli avvelenamenti spesso la mortalità non è omogenea nell'apiario: le famiglie più forti in genere sono le più colpite. La presenza di api morte/moribonde può presentarsi anche in altre situazioni di natura infettiva o

gestionale (es. virus della Paralisi acuta oppure prolungata chiusura degli alveari per trasporto o per altri motivi contingenti, specie se avvenuti con temperature elevate). Al contrario, anche l'assenza di api o la loro marcata riduzione (sindrome da spopolamento - CCD), può deporre per l'origine fossica, oppure per altre cause di natura biologica, tra loro anche sovrapposte. Ove possibile, acquisire documentazione fotografica. Raccolta di informazioni anamnestiche hanno molta importanza e riguardano l'impiego di fitofarmaci nelle vicinanze, che non sempre però sono a conoscenza dell'apicoltore, e le operazioni in precedenza eseguite da quest'ultimo (in particolare i trattamenti antivarroa, ma anche il trasporto e/o la chiusura degli alveari).

In presenza di mortalità di famiglie o di loro spopolamento nonché di significativa mortalità di api, è sempre opportuno procedere al campionamento di api morte o moribonde (possibilmente entro le 24 ore dalla comparsa della sintomatologia) evitando la presenza di terriccio, erba o di api morte da tempo (queste ultime sono di aspetto più opaco e in parte mutilate). Campioni ottimali sono costituiti da circa 1000 api (equivalenti a 100 grammi) per consentire le ricerche di prodotti fitosanitari; campioni più ridotti limitano le ricerche anche se spesso sono sufficienti. Possibilmente campionare api con polline nelle cestelle delle zampe, in contenitore a parte (questo potrà essere utile anche per indirizzare nella ricerca del "pascolo"). Qualora non sia possibile campionare le api (ad es. per totale spopolamento degli alveari, oppure a seguito di interventi non tempestivi e quindi in presenza di api morte da molti giorni), possono essere prelevate le matrici bottinate (raccolte) di recente, in particolare miele non opercolato o polline depositato di recente nei favi. Per tali matrici si potranno prelevare porzioni di favo (o direttamente un favo) oppure il polline si può estrarre dalle cellette con aghi o pinzette. Il/i campione/i è prelevato in aliquota unica utilizzando idonei contenitori rigidi, poi chiusi in sacchetti individuati. Allegare il verbale di prelievo indicando le informazioni acquisite, è utile annotare le colture presenti nei paraggi dell'apiario (< 1 km), il loro stadio vegetativo e le condizioni meteo climatiche, se avverse. Ricerche chimiche qualora non emergano informazioni anamnestiche che indirizzino le ricerche, viste le esperienze pregresse maturate nel nostro territorio, la priorità deve essere indirizzata verso i neonicotinoidi e, se negativi, verso gli altri fitofarmaci (indicare la priorità sul verbale).

4.1.1 Conservazione del campione

Il campione di api va mantenuto al riparo dalla luce, refrigerato e congelato appena possibile. Per consentire le ricerche indirizzate alle malattie dell'alveare, è consigliabile fare un secondo campione, di dimensioni più ridotte (in contenitore rigido, da refrigerare o congelare in relazione ai tempi successivi di inoltro al laboratorio). In presenza di altri apiari collocati a breve distanza, è opportuno procedere a controllo anche degli stessi, tali indagini potranno fornire elementi utili per localizzare la possibile causa della mortalità.

4.2 Campionamento di matrici vegetali in campo (a cura dei Tecnici dell'Assessorato Agricoltura)

Il prelievo può essere effettuato durante ogni fase dello sviluppo vegetativo delle piante.

Il tecnico prelevatore, individuato l'appezzamento, elimina dal proprio ambito di prelievo le aree di confine se utilizzate come fasce di rispetto per la protezione dall'eventuale effetto di deriva da fonti d'inquinamento ambientale.

I campioni devono essere prelevati in un'area rappresentativa dell'appezzamento, si devono individuare più punti di prelievo distribuiti sulla sua superficie, seguendo metodologie uniformi e statisticamente rappresentative (per esempio campionamento a croce oppure lungo le diagonali, metodo del quadrato latino, metodo del blocco randomizzato, ecc.). Il numero dei punti di prelievo dei campioni elementari deve essere stimato in base alla superficie dell'appezzamento da campionare e dalla sua forma geometrica.

| Superficie in mq | Numero minimo di punti di prelievo |
|-----------------------|------------------------------------|
| • inferiore a 2000 mq | 1 |
| • da 2001 a 5000 mq | 3 |

| | |
|-----------------------|----------|
| • da 5001 a 10000 mq | 5 |
| • ogni 5000 mq in più | 1 in più |

Nel caso di fruttiferi, il numero può essere individuato dal numero delle piante che lo compongono:

| Numero delle piante | Numero minimo di punti di prelievo |
|--------------------------|------------------------------------|
| • meno di 50 piante | 1 |
| • da 50 a 300 piante | 3 |
| • da 301 a 600 piante | 5 |
| • ogni 300 piante in più | 1 in più |

Per valutare situazioni specifiche potranno essere effettuati prelievi anche in porzioni non omogenee della zona da controllare (file esterne, vicinanze a manufatti, prossimità di fossi, vicinanza di appezzamenti con altre colture soggette a trattamenti, che possano aver contaminato l'ambiente esplorato dalle api).

Ciascuna partita in esame (intesa come appezzamento investito ad una coltura e con caratteristiche omogenee) deve essere sottoposta a campionamento separato.

4.2.1 Cereali e colture industriali

Tagliare la pianta a non meno di 10 cm dal terreno ed evitare la contaminazione da parte del terreno, quindi separare il materiale da campionare (spighe, foglie, culmi, baccelli, ecc.). Se il prelievo è effettuato durante la raccolta, prelevare dalla macchina più frazioni in momenti diversi.

4.2.2 Colture frutticole e arboricoltura da legno

La raccolta dei campioni deve avvenire dalla chioma esterna: nella parte bassa, per accertamento di eventuale trattamento alla pianta e nella parte alta per accertamento di eventuali fenomeni di deriva.

4.2.3 Colture orticole

Le parti prelevate devono essere solo quelle nei punti più esposti ad un eventuale trattamento e non quelle coperte dal fogliame. In caso di piante in fioritura devono essere prelevati anche campioni di fiori. Deve sempre essere eliminata la terra.

4.2.4 Colture floricole

Le parti prelevate devono essere solo quelle nei punti più esposti ad un eventuale trattamento e non quelle coperte dal fogliame. In caso di piante in fioritura devono essere prelevati anche campioni di fiori. Deve sempre essere eliminata la terra.

4.3 Campionamento di terreno agrario (a cura dei Tecnici dell'Assessorato Agricoltura)

Prelevare secondo una delle metodologie sopra indicate da 5 a 15 campioni elementari per ettaro in base all'estensione della zona da sottoporre ad indagine; per superfici inferiori ad un ettaro prelevare 5 campioni elementari.

La profondità di prelevamento ritenuta utile è in questi casi limitata ai primi 5 cm di terreno, eliminando per quanto possibile la vegetazione che copre il suolo.

4.4 Campionamento di acque (a cura dei Tecnici dell'Assessorato Agricoltura)

Il prelievo dell'acqua viene effettuato con appositi contenitori in vetro, sia dell'acqua immessa nella risaia, sia di quella delle camere di coltivazione. Le epoche del campionamento sono le stesse di

quelle di effettuazione del campionamento del terreno. Il prelievo dei campioni di acqua deve precedere quelle del campionamento del terreno. I campioni di acqua, se l'analisi non è condotta in tempi brevi, vanno congelati e conservati a -20C°.

5. Preparazione, conservazione e spedizione dei campioni

Il personale che ha effettuato il campionamento provvederà alla corretta conservazione dei campioni che non sono stati avati.

Al fine di garantire le informazioni minime necessarie da fornire al laboratorio di prova, nel rispetto dell'anonimato dell'operatore, l'aliquota destinata al laboratorio stesso deve essere accompagnata da apposito documento riportante: matrice, data di campionamento e di consegna, codice identificativo di collegamento al verbale di prelievo. Dovrà essere corredata di lettera di richiesta analisi e di tutte le informazioni, etichette, cartellini o fotografie, che fossero ritenute utili.

6 Termini e definizioni

ALVEARE: l'arnia contenente una famiglia di api (L. 313/2004)

APIARIO: un insieme unitario di alveari (L. 313/2004)

FAVO: struttura composta da cellette esagonali, realizzata a partire dalla cera prodotta da api giovani, utilizzata dalle api stesse per allevare la covata e depositare scorte di miele e polline. Il favo può contenere una quota significativa di propoli

ALIQUOTA: Quota parte del campione finale.

CAMPIONE: gruppo di elementi prelevati da una popolazione presunta uniforme (appezzamento o partita), allo scopo di raccogliere informazioni sulla popolazione stessa.

CAMPIONE ELEMENTARE: quantità di elementi prelevata da un singolo punto dell'appezzamento o partita.

CAMPIONE GLOBALE: insieme dei campioni elementari prelevati da uno stesso appezzamento o partita.

CAMPIONE FINALE: parte rappresentativa del campione globale ottenuta mediante opportuno rimescolamento e riduzione di quest'ultimo. Il campione finale per le finalità qui rappresentate è costituito da tre o quattro aliquote regolarmente sigillate e carteggiate, delle quali una è lasciata presso l'apicoltore, una all'agricoltore interessato, se presente alle operazioni (in questo caso le aliquote sono 4), mentre le altre sono inviate al laboratorio di prova di prima istanza; una per essere analizzata al più presto, l'altra per essere conservata in vista dell'eventuale prova di revisione presso il laboratorio di seconda istanza.

TECNICO PRELEVATORE: personale veterinario dell'ASL e funzionari regionali dell'Assessorato Agricoltura che hanno le competenze per effettuare una verifica ispettiva, incaricati dell'esecuzione del campionamento.

UNITA': la più piccola porzione distinta di una partita che può essere prelevata per costituire la totalità o parte di un campione elementare.

LABORATORIO DI ANALISI: struttura preferibilmente pubblica (IZS Piemonte - Centro Apistico Regionale, Laboratorio Agrochimico Regionale) alla quale inviare i campioni per l'esecuzione delle prove.

REGIONE PIEMONTE



NOMINATIVI REFERENTI ASL - SETTORE APISTICO

(Allegato A)

| ASL | <u>Nome e Cognome</u> | <u>E-mail</u> | <u>Tel. ufficio</u> |
|------------|--|--|----------------------------------|
| TO1 | Dr.ssa Paola FRANCONE | paola.francone@ascittaditorino.it | 011 – 5663192 |
| | | | 011 – 5663194 |
| | | | 011 – 5663200 |
| TO3 | Dr.ssa Maria Vittoria ORECCHIA | mvorecchia@aslto3.piemonte.it | 0121 – 235976 0121 – 235483 |
| TO4 | Dr. Paolo BELLONE | pbellone@aslto4.piemonte.it | 011 – 9817250 011 – 8212328 |
| TO5 | Dr. Paolo FEJLES | feiles.paolo@aslto5.piemonte.it | 011 – 94294667 011 – 94294601 |
| VC | Dr.ssa Barbara BRUNATO | barbara.brunato@aslvc.piemonte.it | 0163 – 426877 |
| | | | 0163 – 426820 |
| BI | Dr. Enrico MIGLIETTA | enrico.miglietta@aslbi.piemonte.it | 015 – 15159267 |
| NO | Dr. Gianni SUMA | gianni.suma@asl.novara.it | 0321 – 374383 |
| | | | 0321 – 801514 |

| ASL | <u>Nome e Coanome</u> | <u>E-mail</u> | <u>Tel. ufficio</u> |
|------------|------------------------------|--|----------------------------|
| VCO | Dr. Guido FILOSI | guido.filosi@aslvc.it | 0324 – 491614 |
| | | | 0324 – 491617 |
| | Dr. Bruno RODA' | bruno.roda@aslvc.it | 0324 – 491613 |
| | | | 0324 – 491617 |

| ASL | <u>Nome e Coanome</u> | <u>E-mail</u> | <u>Tel. ufficio</u> |
|------------|-----------------------------------|--|--------------------------------|
| CN1 | Dr. Guido CESANO | guido.cesano@aslcn1.it | 0175 – 87750 0175 – 479700 |
| | Dr. ssa Fiorella ROSA | fiorella.rosa@aslcn1.it | 0174 – 676125 0171 – 450146 |
| CN2 | Dr. Bartolomeo BORGOGNO | bborgogno@aslcn2.it | 0173 – 316057 0173 – 316214 |
| AT | Dr. Luciano ARPELLINO | larpellino@asl.at.it | 0141 – 981343 0141 – 484026 |
| AL | Dr. Roberto FRANCHINI | rfranchini@aslal.it | 0131 - 306921 0131 - 306597 |

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | |
|--|--|--|--|--|

