

Allegato 2

Piattaforma mare ed acque interne: Piano operativo 2017- giugno 2018

PREMESSA

In attuazione di quanto indicato nel documento di cui all'allegato 1 si esplicitano di seguito le azioni che saranno perseguite durante il periodo 2017- giugno 2018. Le stesse potranno essere rimodulate in virtù di nuove esigenze o di situazioni intercorrenti.

1. Diagnostica: attività

1.1 Pesci, molluschi, crostacei ed echinodermi

L'attività dei laboratori dell'IZSLT è rivolta principalmente alla diagnosi e prevenzione delle malattie infettive, parassitarie e dismetaboliche di pesci, molluschi e crostacei.

I campioni provengono da impianti di acquacoltura in corso di fenomeni di mortalità o dei controlli ufficiali previsti dai piani di monitoraggio delle malattie infettive degli animali acquatici ai sensi del D. Lgs 148/2008 (setticemia emorragica virale e necrosi ematopoietica infettiva dei salmonidi e marteiliosi e bonamiosi dei molluschi), da laghetti di pesca sportiva, da acquari pubblici, amatoriali, commerciali o sono prelevati in corso di morie in ambiente naturale.

Nelle Tabelle 1 e 2 sono rappresentati i metodi classici e biomolecolari a regime in tale ambito.

Tabella 1 Metodi classici a regime

PROVA	POS	ROMA MIC	PISA	ACCREDITATA A ROMA	ACCREDITATA A PISA
Esame anatomico patologico	Metodo non procedurato	SI	SI	NO	NO
Bonamia ostreae presunta (esame microscopico-ricerca)	POS MIC 048 INT	SI	NO	SI	NO
Marteilia refringens presunta (esame microscopico-ricerca)	POS MIC 046 INT	SI	NO	SI	NO
Agenti batterici patogeni (tecnica microbiologica)	POS SIP 006 INT	SI	SI	NO	NO
Esame parassitologico (tecnica microscopica)	Metodo non procedurato	SI	SI	NO	NO
Aeromonas hydrophila (esame colturale)	POS SIP 008 INT	SI	SI	NO	NO
Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida (esame colturale)	POS SIP 009 INT	SI	SI	NO	NO
Lactococcus garvieae (esame colturale)	POS SIP 010 INT	SI	SI	NO	NO
Photobacterium damsela subspecies piscicida (esame colturale)	POS SIP 011 INT	SI	SI	NO	NO
Vibrio anguillarum (esame colturale)	POS SIP 012 INT	SI	SI	NO	NO
Yersinia ruckeri (esame colturale)	POS SIP 013 INT	SI	SI	NO	NO
Attività dell'acetilcolisterasi (spettrofotometria)	POS SIP 014 INT	NO	SI	NO	NO
Frequenze dei micronuclei (esame microscopico)	POS SIP 015 INT	NO	SI	NO	NO
Esame istologico (ematossilina-eosina)	POS ACC 001 INT	SI	NO	NO	NO

Tabella 2 Metodi biomolecolari a regime

PROVA	POS	ROMA MIC	PISA	ACCREDITATA A ROMA	ACCREDITATA A PISA
Identificazione di specie batteriche mediante PCR e sequenziamento.	Metodo non procedurato	NO (prova eseguita a RM diagnostica)	SI	NO	NO

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primmo semestre 2018:

- 1.1.A) Analisi del flusso dei campioni diagnostici (Roma, Pisa);
- 1.1.B) Condivisione delle metodiche mediante verifica delle procedure ed eventuale revisione e valutazione di altre attività non ancora procedurate (*Roma, Pisa*);
- 1.1.C) Condivisione del protocollo per il recupero di fauna ittica da vasche, bacini idrici naturali o artificiali (*Roma, Pisa*);
- 1.1.D) Condivisione delle Linee guida regionali per la gestione di morie di ittiofauna in acque libere (Decreto dirigenziale n. 6481 del 15/12/2009 - regione Toscana) (*Roma, Pisa*).

1.2 Cetacei e tartarughe marine

L'IZSLT ha acquisito, negli ultimi anni, notevoli competenze nella diagnostica di cetacei e tartarughe marine spiaggiati. Il monitoraggio dello stato sanitario di questi animali, che occupano un posto al vertice della catena trofica, è indispensabile per conoscere lo stato di salute del mare ed ha importanti risvolti di salute pubblica in quanto potenziali vettori di agenti zoonotici.

Gli IZZSS hanno inoltre un importante ruolo nella diffusione di conoscenze scientifiche e nell'informazione di un'opinione pubblica sempre più attenta a questi fenomeni.

Numerosi sono stati gli eventi formativi effettuati in entrambe le regioni verso il personale dei Servizi veterinari delle ASL costiere, delle Capitanerie di porto competenti per i diversi tratti di coste svolti attraverso eventi teorico-pratici allo scopo di sensibilizzare ed armonizzare le procedure di intervento e lo scambio di informazioni con tutti gli Enti coinvolti nella rete.

L'attività diagnostica sugli animali spiaggiati prevede l'uso di un protocollo condiviso con la Rete nazionale spiaggiamenti mammiferi marini (ReNaSMM), con analisi diversificate in funzione dello stato di conservazione degli animali. Tutte le attività sono condotte da diversi laboratori dell'IZSLT in stretta sinergia. Dai cetacei studiati nel corso di questi anni sono stati isolati anche patogeni dal potere zoonosico (es. *Brucella ceti*, *Salmonella spp.*), nuovi ceppi di Morbillivirus, *Toxoplasma spp.*, *Photobacterium damsela* potenzialmente patogeni e nuovi Poxvirus, mai segnalati precedentemente sulle coste italiane.

Nelle Tabelle 3 e 4 sono rappresentati i metodi classici e biomolecolari a regime in tale ambito.

Tabella 3 Metodi classici a regime

PROVA	POS	ROMA ACC	PISA
Esame anatomo patologico	Metodo non procedurato	SI	SI
Agenti batterici patogeni (tecnica microbiologica)	Metodo non procedurato	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Esame parassitologico (tecnica microscopica)	Metodo non procedurato	SI	SI
Esame istologico (ematossilina-eosina)	POS ACC 001 INT	SI	NO
Enteroparassiti (flottazione)	POS ACC 011 INT	SI	SI
Enteroparassiti (sedimentazione formolo-acetica)	POS ACC 013 INT	SI	SI
E.coli (esame colturale)	POS DIG 001 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Pasteurellaceae (esame colturale)	POS DIG 005 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Isolamento ed identificazione di <i>Yersinia spp</i>	POS DIG 008 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI

Campylobacter coli e Campylobacter jejuni	POS DIG 009 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Listeria monocytogenes, Listeria ivanovii, Listeria spp.	POS DIG 014 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Isolamento ed identificazione di Streptococcus spp	POS DIG 019 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Isolamento ed identificazione di Staphylococcus spp	POS DIG 020 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Klebsiella spp (esame colturale)	POS DIG 021 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Salmonella spp (esame colturale)	POS DIG 012 NOR	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Brucella spp (esame colturale)	POS DIG 009 NOR	NO (Eseguito presso DIG RM)	NO
Mycobacterium spp (esame colturale)	POS DIG 010 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	NO
Lactococcus garvieae (esame colturale)	POS SIP 010 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Photobacterium damsela subsp. piscicida (esame colturale)	POS SIP 011 INT	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Brucellosi (RBPT, FdC)	POS SIE 010 NOR	NO (Eseguito presso SIE RM)	SI

Tabella 4 Metodi biomolecolari a regime

PROVA	POS	ROMA ACC	PISA
Identificazione di Giardia duodenalis (PCR)	Metodo non procedurato	NO	SI
Identificazione di Cryptosporidium (PCR)	Metodo non procedurato	NO	SI
Identificazione di Toxoplasmatidae (PCR)	Metodo non procedurato	NO (Eseguito presso DIG RM)	SI
Identificazione di Neospora (PCR)	Metodo non procedurato	NO (Eseguito presso DIG RM)	NO
Identificazione di Chlamydia (PCR)	Metodo non procedurato	NO (Eseguito presso DIG RM)	NO
Identificazione di Coxiella (PCR)	Metodo non procedurato	NO (Eseguito presso DIG RM)	NO
Identificazione di larve di Anisakis spp e Anisakidae (PCR/RFLP)	Metodo procedurato per alimenti	NO	SI

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primi semestre 2018:

- 1.2.A) Uniformare le procedure di analisi tra i due laboratori su animali spiaggiati (*Roma, Pisa*);
- 1.2.B) Acquisizione delle linee guida dal tavolo di coordinamento della ReNaSMM. (*Roma, Pisa*);
- 1.2.C) Organizzazione di almeno un incontro di formazione su spiaggiamenti (*Roma, Pisa*).

2. Sicurezza dei prodotti ittici

I controlli riguardano campioni provenienti dall'attività istituzionale delle ASL, dei PIF, degli UVAC (Uffici veterinari adempimenti comunitari), dall'attività di controllo e repressione dei NAS (Nucleo antisofisticazioni e sanità) e, in minor misura, dalle capitanerie di porto, dalle ARPA (Agenzie regionali per la protezione ambientale), altri enti (Enti parco, Province) e da attività legate all'autocontrollo in aziende private.

Nelle Tabelle 5 e 6 sono rappresentati i metodi classici e biomolecolari a regime in tale ambito.

Tabella 5 Metodi classici a regime

PROVA	POS	ROMA MIC	PISA	ACCREDITATA A ROMA	ACCREDITATA A PISA
Salmonella spp. (esame colturale)	POS MIC 001 NOR	SI	SI	SI	SI
Listeria spp, Listeria monocytogenes (esame colturale)	POS MIC 002 NOR	SI	SI	SI	SI
Escherichia coli O:157 (esame colturale)	POS MIC 005 NOR	SI	SI	SI	SI
Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae (esame colturale)	POS MIC 006 NOR	SI	SI	SI	SI
Listeria monocytogenes (esame colturale-MPN)	POS MIC 007 NOR	SI	SI	SI	SI

Stafilococchi coagulanti positivi (Staphylococcus aureus ed altre specie) (esame colturale - conta UFC)	POS MIC 008 NOR	SI	SI	SI	SI
Clostridium perfringens (esame colturale - conta UFC)	POS MIC 010 NOR	SI	SI	SI	SI
Listeria monocytogenes (esame colturale - UFC conta)	POS MIC 015 NOR	SI	SI	SI	SI
Escherichia coli beta-glucuronidasi positivi (esame colturale - UFC)	POS MIC 016 NOR	SI	NO	SI	NO
Enterotossine stafilococciche (ELFA-ricerca)	POS MIC 022 NOR	SI	SI	SI	SI
Attività dell'acqua (Aw) (prova chimico-fisica)	POS MIC 023 NOR	SI	SI	SI	SI
Clostridi produttori di tossine botuliniche, tossine botuliniche (esame colturale, prova biologica - ricerca)	POS MIC 024 NOR	SI	NO	SI	NO
Coliformi (esame colturale)	POS MIC 029 NOR	SI	NO	SI	NO
Listeria monocytogenes (ELFA)	POS MIC 031 NOR	SI	SI	SI	SI
Clostridi solfito riduttori (Esame colturale-UFC)	POS MIC 035 NOR	SI	NO	SI	NO
Enterobatteri (esame colturale-UFC)	POS MIC 036 NOR	SI	SI	SI	SI
Salmonella spp (ELFA/esame colturale)	POS MIC 042 NOR	SI	SI	SI	SI
pH (potenziometrica)	POS MIC 044 NOR	SI	SI	SI	SI
Paralytic shellfish poison (PSP) (prova biologica)	POS MIC 051 NOR	SI	Prova sospesa	SI	Prova sospesa
Escherichia coli beta-glucuronidasi positivi (esame colturale-MPN)	POS MIC 053 NOR	SI	SI	SI	SI
Larve di Anisakidae: anisakis, pseudoterranova, contracaemum, phocascaris, hysterothylacium (esame microscopico)	POS SIP 001 INT	NO	SI	NO	SI
Larve di Anisakis (esame microscopico)	POS SIP 004 NOR	NO	SI	NO	SI
Coliformi, Escherichia coli beta-glucuronidasi positivi (esame colturale UFC)	POS SPG 003 NOR	NO	SI	NO	SI

Tabella 6 Metodi molecolari a regime

PROVA	POS	ROMA MIC	PISA	ACCREDITATA A ROMA	ACCREDITATA A PISA
Fattori di patogenicità di Escherichia coli: verocitotossina 1, verocitotossina 2, intimina (PCR)	POS MIC 007 INT	SI	NO	SI	NO
Tossina botulinica tipo A, B,C,D,E,F (PCR MULTIPLEX)	POS MIC 012 INT	SI	NO	SI	NO
Identificazione specie (microarray)	POS MIC 014 INT	SI	NO	SI	NO
Norovirus genogruppo GI, noovirus genogruppo GII, virus epatite A (HAV) (PCR real time reverse trascription)	POS MIC 045 NOR	SI	NO	SI	NO
Identificazione di larve di Anisakis spp.: Anisakis simplex S.S., Anisakis pegreffii, Anisakis simplex C, Anisakis typica, Anisakis ziphidarum, Anisakis sp. A, Anisakis	POS SIP 007 INT	NO	SI	NO	SI

physeteris, Anisakis brevispiculata, Anisakis paggiae (PCR/RFLP)					
--	--	--	--	--	--

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primmo semestre 2018:

- 2.A) Verifica dei documenti di riferimento per la ricerca dei fattori di patogenicità dei *Vibrio* e redazione della bozza di procedura operativa standard (*Roma, Pisa*);
- 2.B) Validazione della prova di identificazione di specie ittiche mediante sequenziamento ed eventuale accreditamento (*Pisa*);
- 2.C) Messa a punto della metodica per la valutazione qualitativa di microcistine su tessuti di pesci mediante metodo immunoenzimatico (ELISA) (*Roma, Pisa*);
- 2.D) Organizzazione di un tavolo tecnico con le imprese del settore ittico (*Roma, Pisa*).

3. Qualità delle acque di allevamento dei pesci e dei molluschi

I campioni sono prelevati dalle ASL nelle attività di classificazione/monitoraggio di aree di produzione di molluschi bivalvi, da biologi liberi professionisti o da titolari di impianti di acquacoltura per controlli previsti dalla normativa di tutela ambientale.

Nella Tabella 7 sono rappresentati i metodi a regime in tale ambito.

Tabella 7 Metodi a regime

PROVA	POS	ROMA	PISA	ACCREDITATA A ROMA	ACCREDITATA A PISA
Diatomee bentoniche (Esame microscopico)	POS SIP 005 NOR	NO	SI	NO	NO
Fitoplancton potenzialmente tossico (esame microscopico)	POS SIP 006 NOR	SI	SI	NO	NO
Ammonio (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Nitrato (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Nitrito (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
BOD 5 (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
COD (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Conducibilità (potenziometrica)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Fosforo totale (spettrofotometria UV)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Solidi sedimentabili (gravimetrica)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO
Solidi sospesi (gravimetrica)	Metodo non procedurato	NO	SI	NO	NO

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primmo semestre 2018:

- 3.A) Condivisione della prova "Fitoplancton potenzialmente tossico" mediante verifica della procedura ed eventuale revisione (*Roma, Pisa*).

4. Classificazione e monitoraggio delle zone di produzione di molluschi bivalvi

Le attività svolte per la classificazione e monitoraggio sono le seguenti:

- "Sanitary survey" e revisione periodica a supporto e in collaborazione con l'autorità competente (AC);
- redazione di documenti per le attività in zone da classificare e per monitoraggio periodico in zone classificate a supporto e in collaborazione con l'AC;

- supporto all'elaborazione dei dati prodotti dall'AC per la riclassificazione delle zone di produzione;
- analisi di laboratorio;
- consulenza tecnico specialistica;
- sopralluoghi (collaborazione con AC).

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primmo semestre 2018:

- 4.A) Supporto all'AC per la classificazione di due nuove aree di produzione di molluschi bivalvi in Toscana: studio preliminare dell'area, sopralluogo, scelta dei punti di campionamento rappresentativi, stesura della relazione preliminare, avvio del programma di campionamento (*Pisa*);
- 4.B) Analisi dei campioni prelevati dall'AC nelle attività di classificazione e monitoraggio (*Roma, Pisa*);
- 4.C) Condivisione della metodica per la ricerca del fitoplancton potenzialmente tossico ed eventuale revisione della procedura (*Roma, Pisa*);
- 4.D) Supporto all'autorità competente secondo il mandato della task force regionale di cui alla Determinazione n. G04472 del 16 aprile 2015 (*Roma*).

5. Tirocini e tutoraggio

Presso i laboratori vengono svolte attività relative a tesi di laurea, specializzazione, master con studenti e professionisti provenienti da università o altri enti italiani e stranieri nell'ambito di accordi europei o con Paesi terzi.

In particolare, nel campo della sicurezza alimentare, si svolgono attività con medici veterinari provenienti dalla Repubblica Popolare Cinese, nell'ambito del protocollo di intesa sulla sicurezza alimentare tra la regione Toscana, la Facoltà di Medicina veterinaria di Pisa, IZSLT e la regione autonoma del Guangxi.

Si rappresenta di seguito l'attività da svolgere nel periodo 2017-primmo semestre 2018:

- 5.A) Formazione di personale tirocinante tecnico/laureato con rendicontazione di attività (*Roma, Pisa*).

Nella tabella 8 è rappresentato il Cronoprogramma del progetto secondo il Diagramma di Gantt per gli anni 2017-2018.

TABELLA 8 CRONOPROGRAMMA DEL PROGETTO SECONDO DIAGRAMMA DI GANTT

MESI	2017												2018					
	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu
Riunioni preliminari (RM, PI)																		
Redazione del documento esecutivo (RM, PI)																		
1.1.A) Analisi del flusso dei campioni diagnostici (RM, PI)																		
1.1.B) Condivisione delle metodiche mediante verifica delle procedure ed eventuale revisione e valutazione di altre attività non ancora procedurate (RM, PI)																		
1.1.C) Condivisione del protocollo per il recupero di fauna ittica da vasche, bacini idrici naturali o artificiali (RM, PI)																		
1.1.D) Condivisione delle Linee guida regionali per la gestione di morie di ittiofauna in acque libere (Decreto dirigenziale n. 6481 del 15/12/2009 - Regione Toscana) (RM, PI)																		
1.2.A) Uniformare le procedure di analisi tra i due laboratori su animali spiaggiati (RM, PI)																		
1.2.B) Acquisizione delle linee guida dal tavolo di coordinamento della ReNaSMM (RM, PI)																		
1.2.C) Organizzazione di almeno un incontro di formazione su spiaggiamenti (RM, PI)																		
2.A) Verifica dei documenti di riferimento per la ricerca dei fattori di patogenicità dei Vibrio e redazione della bozza di procedura operativa standard (RM, PI)																		
2.B) Validazione della prova di identificazione di specie ittiche mediante sequenziamento ed eventuale accreditamento (PI)																		
2.C) Messa a punto della metodica per la valutazione qualitativa di microcistine su tessuti di pesci mediante metodo immunoenzimatico (ELISA) (RM, PI)																		
2.D) Organizzazione di un tavolo tecnico con le imprese del settore ittico (Roma, Pisa)																		
3.A) Condivisione della Prova "Fitoplancton potenzialmente tossico" mediante verifica della procedura ed eventuale revisione (RM, PI)																		
4.A) Supporto all'AC per la classificazione di due nuove aree di produzione di molluschi bivalvi in Toscana: studio preliminare dell'area, sopralluogo, scelta dei punti di campionamento rappresentativi, stesura della relazione preliminare, avvio del programma di campionamento (PI)																		
4.B) Analisi dei campioni prelevati dall'AC nelle attività di classificazione e monitoraggio (RM, PI)																		
4.C) Condivisione della metodica per la ricerca del fitoplancton potenzialmente tossico ed eventuale revisione della POS (RM, PI)																		
4.D) Supporto all'autorità competente secondo il mandato della task force regionale di cui alla Determinazione n. G04472 del 16 aprile 2015 (RM)																		
5.A) Formazione di personale tirocinante tecnico/laureato con rendicontazione di attività (RM, PI)																		

