

D.M. 4 ottobre 1999 – Centri di Referenza Nazionali nel Settore Veterinario**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LA LEPTOSPIROSI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna “Bruno Ubertini”****RELAZIONE ANNUALE**

Il Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi (CRNL) è inserito all'interno del Reparto Tecnologie Biologiche Applicate dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna (IZSLER) e in particolare nei Laboratori di Batteriologia Specializzata e di Diagnostica Molecolare. Concorrono alle attività le altre Sedi Territoriali IZSLER e gli Osservatori Epidemiologici Veterinari della Regione Lombardia (SEL) e dell'Emilia – Romagna (SEER).

RISORSE UMANE

Le risorse umane (con impegno orario di seguito specificato in percentuale) e strumentali delle strutture che hanno partecipato alle attività del CRNL, nel corso del periodo oggetto della relazione, sono di seguito elencate.

STRUTTURA	QUALIFICA	PERCENTUALE
Laboratorio Batteriologia Specializzata	Dirigente veterinario	25
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	90
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	20
	Assistente tecnico	90
	Borsista (mesi 12)	100
Laboratorio Diagnostica Molecolare	Dirigente biologo	10

RISORSE STRUMENTALI

Laboratorio Batteriologia Specializzata: dispone delle attrezzature necessarie per l'attività di diagnostica sierologica, batteriologica e bio – molecolare, per la produzione e la conservazione di ceppi di riferimento e di campo e per le attività di ricerca.

Laboratorio Diagnostica Molecolare: mette a disposizione strutture, attrezzature e competenze per l'attività diagnostica e opera per lo sviluppo di metodiche innovative di biologia molecolare per la caratterizzazione dei ceppi isolati e per l'evidenziazione e caratterizzazione di leptospire patogene nei campioni biologici.

Sedi Territoriali IZSLER: forniscono supporto per la gestione in campo dei focolai sul territorio, svolgono attività diagnostica di primo livello con prelievo di campioni che inviano ai laboratori del CRNL.

Osservatori Epidemiologici: collaborano alla gestione di focolai.

Il piano d'attività 2020 si riferisce al periodo 01/10/2019 – 30/09/2020; il periodo di riferimento della programmazione è 01/10/2020 – 30/09/2021.

OBIETTIVI STRATEGICI

Vengono di seguito riportati i principali obiettivi nell'ambito dell'attività di laboratorio e di quella di campo: questi si collegano a quelli già riportati nelle relazioni precedenti e ne rappresentano il proseguimento.

– Attività di laboratorio

Oltre che nel continuo miglioramento delle tecniche tradizionali, già in atto, l'obiettivo è quello di migliorare e ampliare le competenze in materia di diagnosi mediante tecniche bio – molecolari. Tra gli scopi principali di tale attività l'identificazione di nuovi stipti batterici con possibilità di elaborare i dati in modo da stabilire eventuali correlazioni evolutive e comprendere meglio le conseguenze epidemiologiche legate alla circolazione di determinati ceppi sul territorio.

– Attività di campo

La collaborazione con i veterinari di campo prosegue sia attraverso il supporto diretto nei singoli episodi d'infezione sia tramite consulenze su quesiti inerenti le caratteristiche dell'infezione.

Permane (come riportato nella precedente relazione) tra i veterinari che operano nel settore degli animali da reddito, anche a causa della legislazione vigente (che comporta tempi lunghi d'intervento una volta che è stata confermata l'infezione), la tendenza a ridurre i controlli per leptospirosi ovvero a escludere l'infezione dall'elenco delle patologie da monitorare. La conseguenza è un monitoraggio ridotto nelle specie bovina e suina sebbene, specie dai contatti con i veterinari del territorio (in particolar modo veterinari ufficiali), sia

stata riscontrata un'ampia consapevolezza circa le problematiche legate all'infezione nonché un corretto approccio nell'affrontarle.

– **Altre attività**

Biobanca: migliorare l'organizzazione della collezione da inserire nella biobanca IZSLER approfondendo la caratterizzazione dei ceppi. Continuano i controlli sul posseduto sia mediante metodiche tradizionali che innovative.

ATTIVITÀ DIAGNOSTICA

1) Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche

Metodi di prova (MP) codificati:

- MP interno per la ricerca di anticorpi anti – *Leptospira* mediante agglutinazione microscopica (MAT) (MP 04/019, accreditato);
- MP interno per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante esame colturale (MP 01/127);
- MP interno per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante PCR Real Time in matrici di origine animale (MP 09/164, validato);
- MP interno per la caratterizzazione sierologica degli isolati del genere *Leptospira* (MP 01/214);
- MP interno per la genotipizzazione e verifica di identità di leptospire patogene mediante MLST (MP 09/279);
- MP interno per la messa in evidenza di antigeni, in campioni di tessuto inclusi in paraffina. Colorazione immunostochimica (MP 07/003, accreditato).

Note ai metodi di prova codificati:

- Il saggio PCR real time permette l'identificazione di leptospire patogene, patogene intermedie e saprofiti.
- La genotipizzazione tramite MLST è applicabile sia ai ceppi isolati che ai campioni biologici. (caratterizzazione anche in assenza di isolamento).

Metodi di prova non codificati:

- sequenziamento gene RNA 16s: identificazione a livello di specie (qualora l'identificazione con MLST non sia possibile);
- sequenziamento di una regione del gene lic12008: differenziazione tra i serovar Icterohaemorrhagiae e Copenhageni;
- analisi MLVA (Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis);
- sequenziamento dell'intero genoma: tramite tecniche NGS e analisi del core genome MLST (identificazione di nuovi ceppi e correlazioni evolutive ed epidemiologiche dei ceppi circolanti).

2) Produzione e distribuzione di reagenti

Il CRNL ha mantenuto una collezione di oltre 400 ceppi, di referenza e di campo, mediante conservazione sia a temperatura ambiente sia in azoto liquido.

Nel periodo considerato sono state effettuate 7 forniture agli Istituti Zooprofilattici per un totale di 40 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT.

IZS DESTINATARIO	FORNITURA	N° PROTOCOLLO IZSLER	DATA
VE	1 coltura	31736/2019	29/11/2019
SA	9 colture	1152/2020	21/01/2020
SA	3 colture	//	02/03/2020
UM	8 colture	7226/2020	17/04/2020
LT	10 colture	15048/2020	03/08/2020
LT	1 coltura	15479/2020	10/08/2020
SI	8 colture	19379/2020	29/09/2020

3) Attività analitica

L'attività sui campioni biologici è rivolta alle richieste provenienti dalle Sedi Territoriali dell'IZSLER e, per conferma diagnostica, a quelle provenienti dagli Istituti Zooprofilattici.

Il CRNL assicura inoltre, su richiesta, il controllo d'identità dei ceppi, in uso come antigeni MAT, presso i laboratori degli Istituti Zooprofilattici.

CAMPIONI CONFERITI DA SEDI TERRITORIALI IZSLER				
TIPO PROVA	TECNICA	N° PROVE	N° POSITIVITÀ	NOTE
Esame sierologico	MAT	40.283	1.215 ^(A)	Prove su 5035 campioni
Esame colturale	Microbiologica	11		

CAMPIONI CONFERITI DA SEDI TERRITORIALI IZSLER				
TIPO PROVA	TECNICA	N° PROVE	N° POSITIVITÀ	NOTE
Caratterizzazione serovar	Sierologica	2		
Esame bio – molecolare	PCR real time	244	33	Ricerca di <i>Leptospira spp.</i>
Esame bio – molecolare	Genotipizzazione – MLST	29		
^(A) Ordine di sieroprevalenza tra i sierogruppi: Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Sejroe, Tarassovi, Ballum				

CAMPIONI CONFERITI DA ISTITUTI ZOOPROFILATTICI				
TIPO PROVA	TECNICA	N° PROVE	N° POSITIVITÀ	NOTE
Esame sierologico	MAT	248	9	Prove su 31 campioni
Esame colturale	Microbiologica	6		
Caratterizzazione serovar	Sierologica	26		
Esame bio – molecolare	PCR real time	14	9	Ricerca di <i>Leptospira spp.</i>
Esame bio – molecolare	Genotipizzazione – MLST	58		

Nota: due Istituti Zooprofilattici (Abruzzo – Molise e Mezzogiorno), per scelta organizzativa, non eseguono più la prova sierologica e inviano i campioni, per le relative indagini, al CRNL.

Altre prove eseguite sono riportate nella tabella seguente:

CAMPIONI SOTTOPOSTI AD ANALISI BIO-MOLECOLARI (METODI DI PROVA NON CODIFICATI)				
TECNICA	MATERIALE	N° PROVE	N° ESITI COMPLETI	N° ESITI PARZIALI
Sequenziamento gene LIC12008	DNA	4		
NGS	Ceppo isolato	5	5	

4) Circuiti interlaboratorio organizzati dal CRNL

Ricerca di anticorpi anti – *Leptospira* mediante agglutinazione microscopica (MAT): hanno aderito 8 laboratori, appartenenti agli Istituti Zooprofilattici; i campioni sono stati inviati il 24/02/2020. Ciascun laboratorio partecipante ha ricevuto 5 campioni di siero di sangue da analizzare mediante agglutinazione microscopica. Il termine per l'invio dei risultati, da inserire direttamente sul sito IZSLER, utilizzando i dati di accesso forniti in fase di registrazione, è stato fissato al 06/04/2020.

Considerando l'aspetto qualitativo della prova (identificazione di sierogruppo) la performance complessiva ottenuta dai laboratori partecipanti indica una concordanza statisticamente significativa tra i laboratori. Per quanto riguarda l'aspetto quantitativo, i titoli forniti sono risultati pressoché omogenei con scostamenti che rientrano nel *range* di accettabilità per questa prova.

5) Ring test a cui ha partecipato il personale del CRNL

International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis MAT, Round 17 (organizzato da International Leptospirosis Society) riservato ai laboratori che eseguono il test di agglutinazione microscopica (MAT) per la diagnosi in campo umano o veterinario. L'esito non è (al momento della compilazione della presente relazione) ancora pervenuto.

6) Altre attività

Tutti i sieri di campo risultati positivi e gli isolati vengono regolarmente conservati. Quando possibile vengono conservati anche gli organi risultati positivi alle prove bio – molecolari.

Su tutti i ceppi isolati viene eseguita la caratterizzazione sierologica; sugli isolati, sui campioni di DNA e sui campioni biologici positivi viene eseguita, ove applicabile, l'identificazione tramite tecniche bio – molecolari.

EPIDEMIOLOGIA

1) Creazione di banca dati

Con l'ausilio del sistema informatizzato, è continuata la raccolta dei dati di laboratorio.

2) Sviluppo e gestione di sistemi informativi

Vedi punto 1

3) Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo

L'implementazione della banca dati consente, attraverso i dati di laboratori, di mappare la diffusione (principalmente attraverso i dati sierologici) dell'infezione a livello nazionale.

4) Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

Dai dati di sierologici il sierogruppo Australis risulta quello prevalente e in particolare nella specie suina dove le sierovarianti un tempo tipiche di questa specie sono relegate a percentuali ridotte, con l'eccezione di *Leptospira* Pomona.

Nella specie bovina prevale sempre il sierogruppo Sejroe, legato alla circolazione di *Leptospira* Hardjo che continua a rappresentare il serovar tipico per questa categoria di animali.

Nella specie canina risulta prevalente il sierogruppo Icterohaemorrhagiae a conferma di quanto già rilevato nelle annate precedenti.

Nel periodo 01/10/2019 – 30/09/2020, sono stati inseriti nel sistema SIMAN 28 focolai di cui, di seguito, viene riportato il riepilogo.

REGIONE	BOVINO	CANE	CAVALLO	SUINO	TOTALE
Veneto		8			8
Campania		7			7
Friuli Venezia-Giulia		3			3
Lazio	2		1		3
Emilia-Romagna	1			1	2
Lombardia	1	1			2
Basilicata		1			1
Valle d'Aosta	1				1
Toscana	1				1
Totale	6	20	1	1	28

Dai dati esposti si osserva (come già evidenziato nella precedente relazione) una differente sensibilità, tra le diverse regioni, nelle segnalazioni e, considerando le specie animali, risulta che oltre due terzi dei casi registrati sono relativi al cane. Il numero di focolai registrati nella specie bovina rimane analogo a quello dello scorso anno, mentre per quanto riguarda la specie suina il dato non rispecchia, visti i dati diagnostici, la realtà. Il personale del CRNL, nei contatti con i veterinari ufficiali e liberi professionisti, richiama, in ogni occasione possibile, la necessità della registrazione dei dati nel sistema SIMAN ma, evidentemente, in molti casi, sebbene il problema dell'infezione venga affrontato dai veterinari sul campo, non vi è al contempo la consapevolezza dell'utilità di inserire i dati nel sistema.

RICERCA E SPERIMENTAZIONE

1) Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute

PRC2017102 (CUP: B23C17000080001) "Valutazione e distribuzione dei determinanti di rischio ambientali per la leptospirosi canina" (capofila: IZS delle Venezie): il progetto, a cui il CRNL partecipa come Unità Operativa, è stato avviato il 20/12/2017 e avrà termine il 19/05/2021.

PRC2017016 (CUP: E89I17000260001) "Studio epidemiologico delle infezioni da *Leptospira* sostenute dalle sierovarianti Bratislava e Hardjo negli animali da reddito" (capofila: CRNL): il progetto è stato avviato il 29/12/2017 e avrà termine il 28/05/2021.

AGGIORNAMENTO E FORMAZIONE PROFESSIONALE

1) Corsi che il CRNL ha organizzato o a cui ha partecipato

Nel periodo di riferimento è stato organizzato per il 30 e 31 marzo 2020 l'incontro di aggiornamento destinato ai laboratori degli Istituti Zooprofilattici. Per le note ragioni, tale incontro è stato rinviato al 28 e 29 settembre e, quindi, definitivamente, a data da destinarsi.

2) Convegni/congressi che il CRNL ha organizzato o a cui ha partecipato

Nel periodo di riferimento non vi sono state partecipazioni.

3) Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del CRNL

Nel periodo di riferimento non vi sono state partecipazioni.

CONSULENZE, ATTIVITÀ DI DOCENZA, COLLABORAZIONI NAZIONALI

1) Consulenze richieste a esterni

Non sono stati richiesti, nel periodo di riferimento, consulenze o pareri tecnici a enti esterni.

2) Consulenze e pareri tecnici forniti a esterni

Sono stati formalmente seguiti i seguenti focolai:

- Leptosirosi bovina da *Leptospira* Hardjo (azienda 21AO046): contatto con il veterinario ufficiale per la gestione e il controllo dei soggetti infetti.
- Leptosirosi bovina da *Leptospira* Hardjo (azienda 024BI991): contatto con il veterinario ufficiale, per la gestione e il controllo dei soggetti infetti, e con l'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per la conferma diagnostica e la preparazione di un autovaccino.
- Leptosirosi suina da *Leptospira* Pomona (azienda 020FO002): contatto con il veterinario ufficiale per la gestione e il controllo dei soggetti infetti.
- Leptosirosi bovina da *Leptospira* Pomona (azienda 042SS001): contatto con il veterinario ufficiale per la gestione e il controllo dei soggetti infetti e con l'IZS della Sardegna per la conferma diagnostica e la preparazione di un autovaccino.

3) Attività di docenza

Nel periodo di riferimento non sono state richieste docenze.

CONSULENZE E COLLABORAZIONI EUROPEE

Nel periodo di riferimento non sono formalmente attive consulenze e collaborazioni a livello europeo.

CONSULENZE E COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI

Nel periodo di riferimento non sono formalmente attive consulenze e collaborazioni a livello internazionale.

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE E BROCHURE DIVULGATIVE

- Lucchese L.; Boniotti MB.; Bertasio C.; Ceglie L.; Bellinati L.; Marchione S.; Mulatti P.; Mazzucato M.; Furlanello T.; D'Incau M.; Natale A. Leptosirosi nel cane: genotipizzazione dei ceppi e localizzazione dei casi per creare mappe di rischio. Congresso Internazionale Multisala SCIVAC – Rimini, 24-26 maggio 2019. Veterinaria (Cremona) 33: 230; 2019
- Bregoli, M.; Pesaro, S.; Beraldo, P.; Benedetti, P.; Lapini, L.; Galeotti, M.; Cocchi, M.; Ustulin, M.; Bertasio, C.; Boniotti, M.B.; Vio, D.; Natale, A. Leptosirosi nel primo esemplare di lupo (*Canis lupus*) rinvenuto in Friuli Venezia Giulia. 37emes Rencontres du GEEFSM (Groupe d'Etude sur l'Ecopathologie de la Faune Sauvage de Montagne) – Etroubles, 13-16 giugno 2019. Atti del convegno: 8; 2019
- Bertasio C.; Papetti A.; Scaltriti E.; Tagliabue S.; D'Incau M.; Boniotti M.B. Serological survey and molecular typing reveal new *Leptospira* serogroup Pomona strains among pigs of Northern Italy Pathogens 9: 332 (doi:10.3390/pathogens9050332); 2020
- Bertasio C.; Boniotti M.B.; Lucchese L.; Ceglie L.; Bellinati L.; Mazzucato M.; Furlanello T.; D'Incau M.; Natale A. Detection of new *Leptospira* genotypes infecting symptomatic dogs: is a new vaccine formulation needed? Pathogens 9: 484 (doi:10.3390/pathogens9060484); 2020
- Piredda, I.; Palmas, B.; Noworol, M.; Tola, S.; Longheu, C.; Bertasio, C.; Scaltriti, E.; Denurra, D.; Cherchi, M.; Picardeau, M.; Boniotti, M.B.; Ponti, M;N. Isolation of *Leptospira interrogans* from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Mediterranean sea. J Wild Dis 56: 727-729; 2020
- D'Incau M.; Bertasio C.; Boniotti M.B. Leptospirosis in Wild Ruminants In: Fratini F.; Bertelloni F.; Cilia G.(eds.) *Leptospira* infections in wild animals. New York: Nova Science Publishers; 2020

SITO WEB

È attivo sul sito web istituzionale IZSLER, nell'ambito della sezione dedicata ai Centri di Referenza Nazionali, quello di pertinenza del Centro di Referenza Nazionale per la Leptosirosi (indirizzo: https://www.izsler.it/izs_bs/s2magazine/index1.jsp?idPagina=371).

ALLEGATI

- 1) Riepilogo delle spese sostenute e dei ricavi (01/10/2019 – 30/09/2020)
- 2) Risorse ritenute necessarie per la realizzazione delle iniziative di intervento nel 2021

BRESCIA, 18/11/2020

IL DIRETTORE DEL CRNL

Mario D'Incau

DOCUMENTO PRODOTTO IN ORIGINALE INFORMATICO E FIRMATO DIGITALMENTE AI SENSI DEL "CODICE DELL'AMMINISTRAZIONE DIGITALE" (D. L.vo 82/2005 E S.M.I.)

ALLEGATO 1: RIEPILOGO DELLE SPESE SOSTENUTE E DEI RICAVI (01/10/2019 – 30/09/2020)
SPESE
1. Spese personale

A	B	C	D	E	F	E x F
PERSONALE IN SERVIZIO (MATICOLA E INIZIALI)	QUALIFICA	TIPO DI CONTRATTO	BREVE DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA ALL'INTERNO DEL CENTRO	COSTO MEDIO ANNUO	PERCENTUALE UTILIZZO	COSTO FINALE
1041 (MD)	Dirigente veterinario	Tempo indeterminato Dirigenza	Laboratorio Batteriologia Specializzata: responsabile del CRNL	€ 122.681,09	25%	€ 30.670,27
1169 (EP)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	Laboratorio Batteriologia Specializzata: diagnostica sierologica, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 32.378,02	90%	€ 29.140,22
605 (MF)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	Laboratorio Batteriologia Specializzata: diagnostica sierologica, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 42.168,63	20%	€ 8.433,73
429 (CT)	Assistente tecnico	Tempo indeterminato Comparto tecnico	Laboratorio Batteriologia Specializzata: accettazione, diagnostica sierologica, raccolta dati, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 40.624,39	90%	€ 36.561,95
5685 (CB)	Laureato Biologo	Borsista	Laboratorio Batteriologia Specializzata: ricerca e sviluppo	€ 22.567,88	100%	€ 22.567,88
1416 (BB)	Dirigente Biologo	Tempo indeterminato Dirigenza	Laboratorio Diagnostica Molecolare: ricerca e sviluppo, supporto diagnostico settore biologia molecolare	€ 98.372,93	10%	€ 9.837,29
Totale spese personale						€ 137.211,34

2. Spese apparecchiature, tecnologie, arredi

A	B	C	D	C x D
APPARECCHIATURA	QUANTITÀ	COSTO	PERCENTUALE UTILIZZO	COSTO FINALE
//	//	//	//	//
Totale spese apparecchiature, tecnologie, arredi				€ 0,00

3. Altri costi sostenuti per le attività

Per la realizzazione delle iniziative volte al conseguimento degli obiettivi del programma operativo 2020, il CRNL ha sostenuto le seguenti spese:

VOCI DI COSTO	COSTO	ENTE FINANZIATORE
Materiali di consumo	€ 17.476,25	
Servizi	€ 2.187,75	
Riparazioni e manutenzioni	€ 4.832,00	
<u>Totale altre voci di costo</u>	€ 24.496,00	

4. Spese generali

Totale altre spese generali: € 16.170,73

Consuntivo spese 2019 – 2020 (1. + 2. + 3. + 4.): €177.878,07

RICA VI

1. Prestazioni a pagamento (breve descrizione)

Fatturato: € 0,00

2. Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute

Finanziamento: € 20.000,00

3. Progetti di ricerca finanziati da altri Enti

//

4. Finanziamento specifico del Ministero della Salute (specificare quale)

//

ALLEGATO 2: RISORSE RITENUTE NECESSARIE PER LA REALIZZAZIONE DELLE INIZIATIVE DI INTERVENTO NEL 2021

Il CRNL per svolgere l'attività prevede di sostenere i seguenti costi:

1. Personale

Totale spese personale: € 120.000,00

2. Apparecchiature, tecnologie, arredi

Apparecchiature, tecnologie, arredi adibiti solo ed esclusivamente al servizio del Centro e quelli condivisi con altri laboratori.

Totale spese apparecchiature, tecnologie, arredi: € 10.000,00

3. Altri costi previsti per le attività

Per la realizzazione delle iniziative volte al conseguimento degli obiettivi del programma operativo 2021, il Centro prevede di sostenere i seguenti costi:

Totale altre voci di costo: € 5.000,00

4. Spese generali

Totale altre spese generali: € 5.000,00

Previsione totale costi anno 2021 (1. + 2. + 3. + 4.): € 140.000,00