

**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) si articola sulle seguenti strutture dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna (IZSLER): Reparto Batteriologia, Reparto Genomica, Reparto Animali da Laboratorio, Laboratorio Istologia, Sezione Diagnostica Bergamo, Sezione Diagnostica Brescia, Sezione Diagnostica Mantova, Osservatori Epidemiologici Veterinari della Regione Lombardia (SEL) e dell'Emilia – Romagna (SEER). Concorrono alle attività le altre Sezioni Diagnostiche IZSLER.

**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 dell'anno 2016 sono di seguito elencate.

<b>STRUTTURA</b>	<b>QUALIFICA</b>	<b>PERCENTUALE</b>
Reparto Batteriologia	Dirigente veterinario	20
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	80
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	55
	Assistente tecnico	90
	Assistente tecnico	5
	Assistente tecnico	5
Reparto Genomica	Operatore tecnico specializzato	90
	Dirigente biologo	10
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	5
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	5
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	1
	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	1
Borsista	100	
Reparto Animali da Laboratorio	Dirigente veterinario	2
Laboratorio Istologia	Dirigente veterinario	2
Sezione Diagnostica Bergamo	Dirigente veterinario	5
Sezione Diagnostica Brescia	Dirigente veterinario	2
Sezione Diagnostica Mantova	Dirigente veterinario	5
Osservatorio Epidemiologico – SEL	Dirigente veterinario	5
	Dirigente veterinario	2
Osservatorio Epidemiologico – SEER	Dirigente veterinario	2

**RISORSE STRUMENTALI**

**Reparto Batteriologia:** 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.

**Reparto Genomica:** 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.

**Reparto Animali da Laboratorio:** si occupa della produzione di vaccini e di antisieri.

**Laboratorio Istologia:** esegue gli esami istologici.

**Sezione Diagnostica Bergamo:** partecipa alle attività del CRNL data l'esperienza maturata nella diagnostica delle infezioni dei bovini.

**Sezione Diagnostica Brescia:** fornisce supporto per la gestione in campo dei focolai sul territorio e, come le altre Sezioni Diagnostiche, svolge attività diagnostica di primo livello con prelievo di campioni che invia al Reparto Batteriologia.

**Sezione Diagnostica Mantova:** partecipa alle attività del CRNL data l'esperienza maturata nella diagnostica delle infezioni dei suini.

**Osservatori Epidemiologici:** collaborano alla gestione di focolai.

Il piano d'attività 2016 si riferisce al periodo 01/10/2015 – 30/09/2016; il periodo di riferimento della programmazione è 01/10/2016 – 30/09/2017.

#### **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**

Prove sierologiche: proseguire la collaborazione con tutti gli Istituti Zooprofilattici per favorire l'armonizzazione delle metodiche e, conseguentemente, rendere maggiormente efficace il confronto dei dati provenienti dalle diverse regioni italiane. Fornire supporto per approfondimenti diagnostici mediante l'impiego di un numero di sistemi di saggio più ampio rispetto a quello utilizzato nella routine diagnostica.

Prove microbiologiche: migliorare le tecniche colturali per l'isolamento, oltre che ai fini diagnostici, per poter disporre di isolati per la produzione di vaccini stabulogeni e per futuri utilizzi, quali sistemi di saggio, nelle prove sierologiche per migliorarne la sensibilità.

Utilizzare le tecniche di caratterizzazione sierologica (basata sull'impiego di anticorpi monoclonali) per la caratterizzazione delle sierovarianti.

Prove bio – molecolari: consolidato il metodo per la ricerca, mediante PCR Real Time, in matrici animali, proseguire nello sviluppo delle metodiche identificative (Multi Locus Sequence Typing, Variable Number Tandem Repeat) dei ceppi.

##### **– Attività di campo**

Attuare, previa approvazione del Ministero della Salute, il protocollo per la gestione dei focolai e verificarne l'efficacia collaborando a stretto contatto con i veterinari di campo mediante il supporto diretto nei singoli episodi d'infezione e la consulenza nelle operazioni di prelievo e trasporto dei campioni al fine di incrementare l'accuratezza della diagnosi.

##### **– Altre attività**

Biobanca: migliorare l'organizzazione della collezione da inserire nella biobanca IZSLER approfondendo la caratterizzazione dei ceppi.

#### **ATTIVITÀ DIAGNOSTICA**

##### **1) Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche**

Vengono impiegati i seguenti metodi di prova (MP):

- 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 (LipL32) in matrici di origine animale (MP 09/164);
- MP interno per la caratterizzazione sierologica degli isolati del genere *Leptospira* (MP 01/214);
- MP interno per la messa in evidenza di antigeni, in campioni di tessuto inclusi in paraffina. Colorazione immunostochimica (MP 07/003, accreditato).

##### **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 8 forniture agli Istituti Zooprofilattici per un totale di 25 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT, 5 antisieri e 9 estratti di DNA batterico da utilizzare per prove di validazione di prove di biologia molecolare.

<b>IZS DESTINATARIO</b>	<b>FORNITURA</b>	<b>N° PROTOCOLLO IZSLER</b>	<b>DATA</b>
PLV	2 colture	24584/2015	27/10/2015
	1 antisiero		
SI	1 coltura	1206/2016	18/01/2016
SI	4 estratti DNA	2660/2016	01/02/2016
ME	5 estratti DNA	2661/2016	01/02/2016

IZS DESTINATARIO	FORNITURA	N° PROTOCOLLO IZSLER	DATA
SA	1 coltura	3120/2016	05/02/2016
	2 antisieri		
AM	8 colture	14345/2016	31/05/2016
PLV	4 colture	14812/2016	06/06/2016
	2 antisieri		
PB	9 colture	18653/2016	12/07/2016

### 3) Attività analitica

L'attività sui campioni biologici è rivolta alle richieste provenienti dalle Sezioni Diagnostiche provinciali 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 SEZIONI DIAGNOSTICHE IZSLER				
TIPO PROVA	TECNICA	N° PROVE	N° POSITIVITÀ	NOTE
Esame sierologico	MAT	72.496	1.894 <sup>(A)</sup>	Prove su 9.062 campioni
Esame colturale	Microbiologica	22	9	
Caratterizzazione	Sierologica	9		
Esame bio – molecolare	PCR real time	199	2	Ricerca di <i>Leptospira spp.</i>
Esame istologico	Immunoistochimica	21	21	

<sup>(A)</sup> Ordine di sieroprevalenza tra i sierogruppi: Australis, Sejroe, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Grippotyphosa, Canicola, Ballum

CAMPIONI CONFERITI DA ISTITUTI ZOOPROFILATTICI				
TIPO PROVA	TECNICA	N° PROVE	N° POSITIVITÀ	NOTE
Esame sierologico	MAT	2.312	249	Prove su 289 campioni
Caratterizzazione	Sierologica	11		
Esame bio – molecolare	PCR real time	13	4	Ricerca di <i>Leptospira spp.</i>

### 4) Circuiti interlaboratorio organizzati dal CdR

Ricerca di anticorpi anti – *Leptospira* mediante agglutinazione microscopica (MAT): hanno aderito 8 laboratori, appartenenti agli Istituti Zooprofilattici; i campioni sono stati inviati il 18/01/2016. 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 29/02/2016.

Considerando i singoli laboratori è possibile formulare per tutti i partecipanti, ad eccezione di un solo laboratorio, una valutazione di concordanza eccellente con gli esiti di riferimento. Inoltre la performance complessiva ottenuta dai partecipanti evidenzia una concordanza statisticamente significativa tra i laboratori.

### 5) Ring test a cui ha partecipato il personale del CdR

International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis MAT, Round 13 (organizzato da National Serology Reference Laboratory – Victoria, Australia) riservato ai laboratori che eseguono il test di agglutinazione microscopica (MAT) per la diagnosi in campo umano o veterinario. L'esito è stato favorevole, a conferma della validità delle procedure e dei sistemi di saggio impiegati.

### 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 gli isolati e campioni biologici positivi viene eseguita l'identificazione tramite tecniche bio – molecolari (MLST).

## EPIDEMIOLOGIA

### 1) Creazione di banca dati

Con l'ausilio del sistema informatizzato, è continuata la raccolta dei dati di laboratorio da rielaborare in forma di report.

### 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.

A quest'attività si vanno affiancando progressivamente le tecniche di indagine di tipo bio – molecolare al fine di una sempre maggiore comprensione della tipologia dei ceppi batterici circolanti (progetto di ricerca in corso).

### 4) Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

Dai dati di sierologici viene la conferma che 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*: Altre sierovarianti, come *Leptospira tarassovi*, hanno trovato altri ospiti di mantenimento (tartaruga) nei quali la sieroprevalenza appare ormai significativa.

Nella specie bovina prevale sempre il sierogruppo Sejroe, legato alla circolazione di *Leptospira hardjo* che continua a rappresentare, negli allevamenti da riproduzione, una fonte non trascurabile di perdite economiche.

Più difficile è la valutazione nella specie canina: l'utilizzo di un nuovo vaccino tetravalente ha incrementato le positività ai sierogruppi Australis e Gryppotyphosa, ma la sporadicità con cui vengono forniti dati anamnestici sulle vaccinazioni non consente una stima corretta della sieroprevalenza.

## RICERCA E SPERIMENTAZIONE

### 1) Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute

PRC2012102 (CUP: B28C13000510001) "La Leptosirosi negli animali da compagnia e il suo impatto sulla Sanità Animale" (capofila: IZS delle Venezie): il progetto si è concluso il 31/07/2016 con il completamento delle indagini sierologiche su sieri e delle prove per l'identificazione di ceppi isolati.

PRC2013006 (CUP: E52I14000390001) "Caratterizzazione molecolare di ceppi di leptospire patogene tramite MLST e MLVA: nuove strategie per una corretta identificazione e per le indagini" (capofila: CRNL): il progetto è stato avviato il 16/12/2014 e si inserisce nell'obiettivo di adottare metodi innovativi che consentano al CRNL di rispondere alle richieste degli altri Istituti Zooprofilattici in modo sempre più approfondito dal punto di vista diagnostico e di comprendere meglio la situazione epidemiologica attuale e la sua evoluzione. In particolare il progetto si prefigge di sviluppare metodi di identificazione molecolare anche su campioni biologici, considerate le difficoltà dell'isolamento culturale.

## AGGIORNAMENTO E FORMAZIONE PROFESSIONALE

### 1) Corsi che il CdR ha organizzato o a cui ha partecipato

Nel periodo di riferimento non sono stati organizzati corsi.

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

Partecipazioni:

– XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V, Pacengo di Lazise (VR), 28-30 Settembre 2016

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

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

Non sono stati formalmente richiesti, nel periodo di riferimento, consulenze o pareri tecnici. I veterinari di campo richiedono comunque, informalmente, con una certa frequenza, pareri su problematiche incontrate nello svolgimento della propria attività professionale.

### 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

- Tagliabue S.; Figarolli B.M.; D'Incau M.; Foschi G.; Gennero M.S.; Giordani R.; Natale A.; Papa P.; Ponti N.; Scaltrito D.; Spadari L.; Vesco G.; Ruocco L. **Serological surveillance of leptospirosis in Italy: two-year national data (2010-2011)** Veterinaria Italiana 52: 129-138; 2016
- Bertasio C.; Papetti A.; D'Incau M.; Tagliabue S.; Boniotti M.B. **Leptosirosi nella popolazione suina del nord Italia: sieroprevalenza e caratterizzazione molecolare.** Atti del XVII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V – Pacengo di Lazise (VR), 28-30 settembre 2016

#### 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: <http://www.bs.izs.it/Referenza/Lepto/Lepto.htm>).

#### ALLEGATI

- 1) Riepilogo delle spese sostenute dal Centro (01/10/2015 – 30/09/2016)
- 2) Risorse ritenute necessarie per la realizzazione delle iniziative di intervento 2017

**BRESCIA, 18/11/2016**

**IL DIRETTORE DEL CRNL**

Mario D'Incau

**ALLEGATO 1: RIEPILOGO DELLE SPESE SOSTENUTE DAL CENTRO (01/10/2015 – 30/09/2016)**
**1. Spese personale**

A	B	C	D	E	F	E x F
PERSONALE IN SERVIZIO (NOMINATIVO)	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	<b>Reparto Batteriologia:</b> responsabile del CRNL	€ 125.484,90	20	€ 25.096,98
605 (MF)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Batteriologia:</b> diagnostica sierologica, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 42.857,42	80	€ 34.285,94
267 (AS)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Batteriologia:</b> diagnostica sierologica e biologico-molecolare, produzione diagnostici, coordinamento tecnici, collaborazione a ricerca e sviluppo	€ 45.214,01	55	€ 24.867,71
429 (CT)	Assistente tecnico	Tempo indeterminato Comparto tecnico	<b>Reparto Batteriologia:</b> terreni colturali, accettazione, diagnostica sierologica, raccolta dati, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 37.441,93	90	€ 33.697,74
398 (GC)	Assistente tecnico	Tempo indeterminato Comparto tecnico	<b>Reparto Batteriologia:</b> accettazione	€ 36.292,24	5	€ 1.814,61
1136 (PT)	Assistente tecnico	Tempo indeterminato Comparto tecnico	<b>Reparto Batteriologia:</b> accettazione	€ 34.376,67	5	€ 1.718,83
432 (DL)	Operatore tecnico specializzato	Tempo indeterminato Comparto tecnico	<b>Reparto Batteriologia:</b> terreni colturali, accettazione, diagnostica sierologica	€ 33.914,09	90	€ 30.522,68
1416 (BB)	Dirigente Biologo	Tempo indeterminato	<b>Reparto Genomica:</b> ricerca e sviluppo, supporto diagnostico settore biologia molecolare	€ 93.112,68	10	€ 9.311,27
558 (AM)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Genomica:</b> diagnostica biologico molecolare, collaborazione a ricerca e sviluppo	€ 43.627,64	5	€ 2.181,38
1124 (DL)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Genomica:</b> diagnostica biologico molecolare, collaborazione guidata a ricerca e sviluppo	€ 38.433,08	5	€ 1.921,65
991 (SM)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Genomica:</b> diagnostica biologico molecolare	€ 39.110,07	1	€ 391,10
1196 (DC)	Tecnico sanitario di laboratorio biomedico	Tempo indeterminato Comparto sanitario	<b>Reparto Genomica:</b> diagnostica biologico molecolare	€ 37.338,59	1	€ 373,39

A	B	C	D	E	F	E x F
PERSONALE IN SERVIZIO (NOMINATIVO)	QUALIFICA	TIPO DI CONTRATTO	BREVE DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA ALL'INTERNO DEL CENTRO	COSTO MEDIO ANNUO	PERCENTUALE UTILIZZO	COSTO FINALE
5599 (CB)	Laureato Biologo	Borsista	<b>Reparto Genomica:</b> ricerca e sviluppo	€ 21.000,00	100	€ 21.000,00
515 (GL)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>Reparto Animali da Laboratorio:</b> produzioni	€ 172.235,85	2	€ 3.444,72
841 (FP)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>Sezione Diagnostica Bergamo</b>	€ 161.252,02	5	€ 8.062,60
773 (LA)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>Sezione Diagnostica Brescia</b>	€ 172.852,22	2	€ 3.457,04
821 (AN)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>Sezione Diagnostica Mantova</b>	€ 179.581,96	5	€ 8.979,10
909 (MT)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>SEER:</b> epidemiologia	€ 137.586,82	2	€ 2.751,74
1414 (DA)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>SEL:</b> epidemiologia	€ 119.845,59	5	€ 5.992,28
1014 (MZ)	Dirigente Veterinario	Tempo indeterminato	<b>SEL:</b> epidemiologia	€ 130.833,09	2	€ 2.616,66
<b><u>Totale spese personale</u></b>						<b>€ 222.487,42</b>

## 2. Spese apparecchiature, tecnologie, arredi

A	B	C	D	C x D
APPARECCHIATURA	QUANTITÀ	COSTO	PERCENTUALE UTILIZZO	COSTO FINALE
//	//	//	//	//
<b><u>Totale spese apparecchiature, tecnologie, arredi</u></b>				//

## 3. Altri costi sostenuti per le attività

Per la realizzazione delle iniziative volte al conseguimento degli obiettivi del programma operativo 2016, il CRNL ha sostenuto le seguenti spese:

VOCI DI COSTO	COSTO	ENTE FINANZIATORE
Materiali di consumo	€ 40.362,91	
Servizi	€ 6.496,59	
Riparazioni e manutenzioni	€ 7.638,21	
Ammortamenti	€ 7.741,73	
<b><u>Totale altre voci di costo</u></b>	<b>€ 62.239,44</b>	

## 4. Spese generali

**Totale altre spese generali: € 28.472,69**

**Consuntivo spese anno 2016 (1. + 2. + 3. + 4.): € 313.199,55**

<b>Ricavi 2016</b>
--------------------

**1. Prestazioni a pagamento (breve descrizione)**

Prestazioni standard e convenzioni; profilassi e compravendita

**Fatturato: € 30.799,32**

**2. Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute**

Finanziamento: € 37.500,00

**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 2017**

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

### **1. Personale**

**Totale spese personale: € 200.000,00**

### **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: € 2.000,00**

### **3. Altri costi previsti per le attività**

Per la realizzazione delle iniziative volte al conseguimento degli obiettivi del programma operativo 2017, il Centro prevede di sostenere i seguenti costi:

**Totale altre voci di costo: € 65.000,00**

### **4. Spese generali**

**Totale altre spese generali: € 25.000,00**

**Previsione totale costi anno 2017 (1. + 2. + 3. + 4.): € 292.000,00**