

## Titolo del progetto:

Studio epidemiologico delle infezioni da *Leptospira* sostenute dalle sierovarianti Bratislava e Hardjo negli animali da reddito

### Abstract

L'infezione da *Leptospira* è un processo dinamico e l'analisi dei dati derivati dalle indagini sierologiche, microbiologiche e bio-molecolari definisce un quadro, nelle specie bovina e suina, che si presenta simile (pur considerando che l'ambito territoriale in cui si è svolta la ricerca è limitato alle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna) a quello riscontrato nelle indagini risalenti ai dieci anni precedenti la ricerca ma sicuramente mutato, almeno in parte, rispetto a quello dei precedenti venti anni (1990 – 2010).

I campioni inclusi nello studio sono stati prelevati nel periodo dal 01/01/2018 al 31/12/2020, ad eccezione dei campioni sottoposti a genotipizzazione che, con lo scopo di avere una maggior quantità di dati per valutare il potenziale discriminatorio delle tecniche molecolari, includono anche isolati ed estratti di acidi nucleici di anni precedenti.

Sono stati sottoposti al controllo sierologico 6.816 sieri di bovino e 7.056 sieri di suino tramite micro-agglutinazione (MAT) in accordo con le linee guida descritte dall'OIE. Inoltre è stata effettuata la ricerca dell'agente eziologico mediante tecniche bio-molecolari (PCR Real-Time) su 50 campioni di origine bovina e 558 di origine suina. Su 29 campioni di origine bovina e 80 campioni di origine suina è stato effettuato anche l'isolamento mediante tecniche microbiologiche. Su 62 campioni bovini (40 isolati e 22 DNA) e 79 campioni suini (51 isolati e 28 DNA) è stata effettuata la genotipizzazione: in particolare su tali campioni è stata operata una selezione sottoponendo a prova un solo isolato per allevamento.

Le prove sierologiche hanno evidenziato, nel bovino, che il sierogruppo Sejroe (che include il serovar Hardjo), comprende altre i due terzi del totale delle positività (64,57%). Nel caso del suino, il sierogruppo Australis (comprendente il serovar Bratislava) costituisce il sierogruppo prevalente: su 1514 positività sono state riscontrate 587 positività (38,77%); il 26,62% delle positività è ascrivibile al sierogruppo Pomona.

La ricerca dell'agente eziologico ha evidenziato, nei campioni di origine bovina, una percentuale di positività pari al 34,00% dei casi. In particolare nei campioni originati da suino, a fronte di un elevato numero di prelievi, la percentuale di positività riscontrata nei feti è risultata ridotta (1,74%) mentre, viceversa, sono stati ottenuti dei risultati migliori nel caso di prelievi da urina (26 campioni su 30, pari allo 86,67%) e da rene (36 campioni su 44 pari allo 81,81%); è stata tentata la ricerca anche da altri visceri con percentuali di positività ridotte (2 campioni su 24 pari allo 8,33%). La percentuale complessiva dei campioni risultati positivi è stata del 12,90% ma, se si escludono, quale fonte di ricerca, i feti, la percentuale sale al 64,65% (64 campioni su 99). L'impiego delle tecniche microbiologiche ha permesso, su di un totale di 109 campioni esaminati (29 di origine bovina e 80 di origine suina) di isolare in coltura pura 25 ceppi di *Leptospira*, di cui 23 da suino e due da bovino. Dei 23 ceppi originati da suino, 21 sono stati isolati da urina e due da rene, mentre entrambi i ceppi originati da bovino sono stati isolati da urina.

I ceppi isolati sono stati identificati a livello di sierogruppo, con l'utilizzo di anti-sieri policlonali, e di serovar, mediante l'impiego di anticorpi monoclonali (mAbs). I due ceppi isolati da bovino sono stati identificati come *L. borgpetersenii* serovar Hardjo genotipo Hardjobovis, mentre tutti i ceppi isolati da suino sono stati identificati come *L. interrogans* serovar Pomona.

La tipizzazione molecolare con l'utilizzo della tecnica Multilocus Sequence Typing (MLST) ha permesso di definire il pattern allelico di 62 campioni di origine bovina. Tra questi, per 7 campioni è stato ottenuto un pattern parziale che ha consentito comunque la loro classificazione in un *sequence type* (ST) noto; per altri 5 campioni non è stato possibile ottenere prodotti di PCR per 4 o più geni MLST e sono stati pertanto definiti come "non amplificabili". La maggioranza dei ceppi (39) è risultata appartenere al ST 152 (corrispondente al serovar Hardjo, genotipo Hardjobovis); 16 sono risultati inclusi nel ST 140 (serovar Pomona) e due nel ST 17 (sierogruppo Icterohaemorrhagiae). I campioni identificati come ST152, ad eccezione di due, sono stati tipizzati con lo stesso profilo MLVA; lo stesso profilo è stato rilevato tra i campioni identificati come ST140.

La tipizzazione molecolare ha permesso di definire il pattern allelico completo di 65 campioni di origine suina. Per un campione è stato ottenuto un pattern parziale ed è stato comunque considerato perché è stato possibile classificarlo in modo univoco in un *sequence type* noto. Per 11 campioni non è stato possibile ottenere prodotti di PCR per 4 o più geni MLST e sono stati definiti come "non amplificabili". La maggior parte dei ceppi isolati (63 campioni su 79 pari al 79,75%) e tutti gli estratti sono stati identificati come ST140, genotipo condiviso tra *L. interrogans* serovar Pomona, *L. interrogans* sierogruppo Grippotyphosa e *L. interrogans* serovar Guaratuba. Nonostante l'identificazione del *sequence type* non sia di aiuto nella definizione univoca del sierogruppo e della sierovariante, la disponibilità di anticorpi monoclonali specifici per le diverse sierovarianti ha permesso di assegnare i ceppi isolati al serovar Pomona.

La genotipizzazione con MLVA è stata applicata a tutti gli isolati e a 10 campioni di DNA tipizzati con MLST. Tutti gli isolati tipizzati come ST140 hanno presentato lo stesso pattern allelico ad eccezione di due campioni dell'anno 2016 che hanno mostrato un differente profilo VNTR. Nel dettaglio, questa analisi ha permesso di identificare un nuovo genotipo VNTR (2-2-10-neg-5) riscontrato, in due diverse Regioni: uno nell'anno 2016 e, successivamente, nell'anno 2019.

Quanto sopra evidenzia che il ricorso a prove basate su tecniche tradizionali (microbiologiche) mantiene la sua importanza, per ragioni legate alla diagnostica (allestimento di antigeni per le prove sierologiche) e alla profilassi (preparazione di vaccini): la ricerca ha permesso in particolare di perfezionare i protocolli del prelievo e definire con maggior precisione le modalità di conservazione dei campioni durante il trasporto. Va ricordato che, comunque, non è sempre possibile ottenere delle condizioni ideali nel prelievo e che eventuali imperfezioni non possono essere compensate in fase di allestimento delle prove diagnostiche. I terreni di coltura utilizzati, sebbene addizionati di fattori di crescita per le leptospire e di selezione sulla flora batterica contaminante, non sempre sono in grado di compensare ridotte cariche, all'origine, dell'agente eziologico ricercato o di limitare la crescita di microrganismi indesiderati che, anche se presenti in proporzioni ridotte, possono condizionare la crescita dei batteri del genere *Leptospira*.

Le prove basate su tecniche innovative rappresentano uno strumento che aumenta le potenzialità diagnostiche e consente maggiori approfondimenti sugli stipti circolanti.

L'impiego degli anticorpi monoclonali per la caratterizzazione sierologica dei ceppi isolati si è definitivamente consolidato nel corso di questa ricerca e permette l'identificazione a livello di serovar superando l'identificazione, parziale e al solo livello di sierogruppo, attuata in precedenza. L'utilizzo di tali reagenti risulta inoltre complementare alle prove di genotipizzazione quando queste non riescano a definire in modo univoco la sierovariante.

La tipizzazione mediante MLST e MLVA ha fornito dati sui genotipi di appartenenza dei ceppi isolati e dei DNA estratti direttamente da materiale biologico, fornendo da una parte una verifica all'identificazione sierologica (per i ceppi isolati) e, dall'altra, informazioni essenziali sull'agente in causa quando non caratterizzabile con altri metodi per l'assenza dell'isolato. Infatti, la tecnica MLST, da tempo utilizzata presso il Centro di Referenza Nazionale nella tipizzazione degli isolati in coltura, è stata ottimizzata per essere applicata anche a DNA estratto da materiale biologico, fornendo uno strumento importante nell'identificazione di leptospire patogene non coltivabili o difficilmente isolabili (per le caratteristiche della matrice biologica), oltre che rappresentare un mezzo utile per un'identificazione più rapida rispetto all'isolamento.

La tecnica MLVA, affiancata in occasione di questa ricerca alla tecnica MLST, ha lo scopo di ottenere una maggiore risoluzione nell'identificazione di ceppi con lo stesso profilo MLST. Nel complesso la tecnica si è dimostrata uno strumento affidabile ma vanno apportati comunque dei miglioramenti dato che ha mostrato ridotta sensibilità quando applicata al DNA estratto da campione biologico.