



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE

LEGNARO (PD)

DELIBERAZIONE

DEL DIRETTORE GENERALE

N. 323 del 18/10/2023

OGGETTO: Delibera a contrarre, ai sensi dell'art. 17, comma 1 del d.lgs. n. 36/2023, per l'avvio di una procedura negoziata, senza previa pubblicazione di un bando di gara, per l'affidamento della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria ``Illumina NextSeq`` e ``Illumina MiSeq`` con durata quadriennale (Numero gara: 9370607; CIG: A01C0D5420)

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del D.Lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE

LEGNARO (PD)

DELIBERAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE

OGGETTO: Delibera a contrarre, ai sensi dell'art. 17, comma 1 del d.lgs. n. 36/2023, per l'avvio di una procedura negoziata, senza previa pubblicazione di un bando di gara, per l'affidamento della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria "Illumina NextSeq" e "Illumina MiSeq" con durata quadriennale (Numero gara: 9370607; CIG: A01C0D5420)

Si sottopone al Direttore generale la seguente relazione del Responsabile della SCA2 – Servizio Acquisti e Logistica.

In data 01/09/2023 con richiesta formulata a mezzo Intranet aziendale (Ticket n. 205001), conservata agli atti, il Direttore della SCS1 dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (di seguito, per brevità, "IZSVe" o "Istituto"), richiedeva allo scrivente Servizio di procedere all'acquisizione della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria "Illumina NextSeq" e "Illumina MiSeq", con durata quadriennale, indicando quale importo presunto dell'acquisizione in parola il valore di € 1.362.901,80, IVA esclusa.

Come motivazione a supporto della propria richiesta, come riportato nella relazione allegata al presente provvedimento (Allegato 1), il citato Direttore dichiarava che, per soddisfare le necessità laboratoristiche dell'Istituto, è necessario utilizzare reagenti prodotti e commercializzati da Illumina Italy S.r.l., avente sede legale in Milano, Via Senigallia n. 18/2, in quanto permettono di rispondere alle seguenti necessità diagnostiche:

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

1. Standardizzazione del dato prodotto. Le analisi da espletarsi mediante l'utilizzo dei reagenti in parola rientrano nell'ambito della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare (MTA), la quale richiede la massima condivisibilità e confrontabilità dei dati di sequenziamento, e delle loro successive analisi, prodotti dai diversi centri a livello nazionale e internazionale. Questo requisito di intercambiabilità è ampiamente favorito dalla condivisione e armonizzazione dei protocolli di sequenziamento in quanto le procedure di produzione, e analisi dei dati sono particolarmente dipendenti dalla tecnologia di sequenziamento e dai reagenti utilizzati. La condivisione e l'uso congiunto di dati di sorveglianza originati da tecnologie diverse richiede l'utilizzo di tecniche differenziate per la loro analisi e l'adattamento dei dati stessi (grezzi o processati) per renderli confrontabili, costringendo ad attivare complessi protocolli di standardizzazione crociata tra tecnologie diverse. Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, non è garantita una intercambiabilità assoluta e certa dei risultati (ovvero, non è garantita una riproducibilità al 100% dei risultati). Per queste ragioni, attualmente, la maggior parte dei centri primari che svolgono sorveglianza in routine WGS utilizzano la tecnologia di sequenziamento e, conseguentemente, i reagenti prodotti da Illumina Italy S.r.l. Questa evidenza è emersa anche dalle survey condotte al livello europeo dal EURLS e al livello nazionale dal CRNS, dalle quali emerge che il 95% dei laboratori afferenti ai rispettivi network di competenza utilizzano la tecnologia Illumina per la produzione dei dati di genomica. In caso di acquisizione di tecnologie differenti, dunque, le strutture coinvolte dovrebbero mettere in atto complessi e costosi studi di validazione crociata dei dati prodotti a partire dalle diverse tecnologie di sequenziamento. Tali attività rischierebbero di essere altamente impattanti, in termini di tempi e costi, per due laboratori di piccole dimensioni, in cui il personale dedicato a tali attività (generazione ed analisi dei dati) è al momento ridotto a poche unità.
2. Accuratezza dei dati prodotti. Tra le tecnologie di sequenziamento genomico esistenti, Illumina Italy S.r.l., attualmente pressoché esclusiva nei centri di sorveglianza delle MTA, è quella accreditata della migliore accuratezza del dato prodotto. La particolare accuratezza del dato di sequenza prodotto da Illumina Italy S.r.l. deriva da una specifica tecnologia impiegata in esclusiva da questo produttore (sequencing by synthesis basata sull'utilizzo di ddNTP con terminatori reversibili e marcati con più fluorofori). Il principio alla base di questa tecnologia (uso di terminatori reversibili) è protetto da brevetto (EP1560838B1).
3. Controllo delle corse da parte di Illumina Italy S.r.l. e possibile sostituzione di reagenti fallati. I reagenti Illumina Italy S.r.l. sono coperti dalla garanzia di funzionamento e possono essere sostituiti in caso di fallo per il fatto che ogni reagente può essere tracciato da una piattaforma interattiva gestita da tecnici Illumina Italy S.r.l. che offrono anche consulenza scientifica e corsa in fase sperimentale.

Preso atto di quanto suesposto, sono state effettuate le verifiche preliminari previste dalla normativa vigente, constatando la sussistenza delle condizioni per procedere all'approvvigionamento in via autonoma, in quanto:

- ai sensi dell'art. 1, comma 449, della Legge n. 296/2006 e dell'art. 15, comma 13, lett. d), del D.L. 95/2012, è stata rilevata l'assenza di convenzioni attive stipulate dalla centrale di committenza regionale o da Consip S.p.A. per la tipologia di beni da acquisire;
- è stato riscontrato che il bene da acquisire non rientra tra le categorie merceologiche previste dal DPCM dell'11.07.2018, adottato ai sensi dell'art. 9, comma 3, primo periodo, del D.L. n. 66/2014, convertito con Legge n. 89/2014, per le cui procedure d'acquisto gli enti del Servizio Sanitario Nazionale sono obbligati a ricorrere a Consip S.p.A. o agli altri soggetti aggregatori;

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

E' stato, inoltre, verificato che:

- ai sensi dell'art. 15, comma 13, lett. d) del D.L. n. 95/2012, convertito in Legge n. 135/2012 e dell'art. 1, comma 450, della Legge n. 296/2006, si deve procedere all'approvvigionamento dei beni mediante il MePA ovvero mediante la piattaforma telematica per l'e-procurement SinTel costituente mercato elettronico della stazione appaltante;
- ai sensi dell'art. 9, comma 7, del D.L. n. 66/2014, convertito con Legge n. 89/2014, è stata constatata l'insussistenza, per la categoria merceologica cui l'acquisizione in parola afferisce, di specifici limiti di spesa e di prezzi di riferimento;
- ai sensi dell'art. 48, comma 2, del D.lgs. n. 36/2023, non è emersa l'esistenza effettiva e comprovata di un interesse transfrontaliero certo, considerate le caratteristiche dell'appalto, il luogo di esecuzione e l'assenza, nel recente passato, di manifestazioni di interesse alla partecipazione ad analoghe procedure di affidamento di questo Istituto da parte di operatori economici di altri paesi UE;
- la fornitura da acquisire non rientra nell'ambito di applicazione dei criteri ambientali minimi adottati ed in vigore in base al Piano per la sostenibilità ambientale dei consumi del settore della pubblica amministrazione;
- l'indizione della procedura di gara in parola è stata prevista nel programma biennale degli acquisti di beni e servizi per l'IZS.Ve, relativo al biennio 2023-2024, adottato, ai sensi dell'allora vigente art. 21 del d.lgs. n. 50/, nonché nell'Avviso di Preinformazione adottato con il medesimo provvedimento (Codice Unico Identificativo – CUI 00206200289202200063).

L'art. 17, comma 1, del d.lgs. 36/2023 dispone che: *“Prima dell'avvio delle procedure di affidamento dei contratti pubblici, le stazioni appaltanti ..., con apposito atto, adottano la decisione di contrarre individuando gli elementi essenziali del contratto e i criteri di selezione degli operatori economici e delle offerte.”*

La procedura sarà espletata mediante procedura negoziata, senza previa pubblicazione di un bando, ai sensi dell'art. 76, comma 2, lettera b), n. 2 del d.lgs. n. 36/2023, mediante utilizzo della piattaforma telematica per l'e-procurement costituente mercato elettronico della stazione appaltante.

Tale procedura, la cui base d'asta è determinata in € 1.362.901,80, IVA esclusa, sarà aggiudicata a lotto unico e indivisibile: in conformità all'art. 58, comma 2 del D.lgs. n. 36/2023 si precisa che, considerata la natura dei beni richiesti e le conseguenti prestazioni, un frazionamento in lotti funzionali o prestazionali o quantitativi risulterebbe contrario ai principi di cui all'art. 1, comma 3 del D.lgs. n. 36/2023.

Il contratto che seguirà l'aggiudicazione della procedura avrà durata quadriennale.

Considerata la tipologia di acquisizione non risultando presenti rischi da interferenza e conseguenti oneri per la sicurezza, non risultando presenti rischi da interferenza e conseguenti oneri per la sicurezza, non risulta necessaria la predisposizione del D.U.V.R.I.

In conformità all'art. 108, comma 9, del D.lgs n. 36/2023 trattandosi, nel caso di specie, di fornitura senza posa in opera, non risulta obbligatoria l'espressa indicazione nell'offerta economica del costo della manodopera e degli oneri aziendali per l'adempimento delle disposizioni in materia di salute e sicurezza sui luoghi di lavoro.

Ai sensi dell'art. 86 del d.lgs. n. 36/2023 l'avviso volontario sulla trasparenza preventiva sarà pubblicato all'esito della presente procedura.

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

Atteso l'importo posto a base d'asta dell'affidanda procedura di gara, è previsto il pagamento di un contributo in favore dell'Autorità da parte degli operatori economici pari ad € 165,00, in conformità a quanto disposto con la deliberazione ANAC n. 621 del 20 dicembre 2022, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 58 del 9 marzo 2023.

Tutto ciò premesso, sulla base degli elementi riportati dal referente dell'istruttoria, si propone al Direttore generale quanto segue:

1. di autorizzare, *ex art.* 17, comma 1 del d.lgs. n. 36/2023, l'avvio di una procedura negoziata senza pubblicazione di un bando, ai sensi dell'art. 76, comma 2, lettera b), n. 2 del medesimo decreto, mediante ricorso alla piattaforma telematica per l'*e-procurement* costituente mercato elettronico della stazione appaltante, volta all'aggiudicazione della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria "*Illumina NextSeq*" e "*Illumina MiSeq*", di durata quadriennale;
1. di espletare la procedura facendo ricorso alla piattaforma telematica per l'*e-procurement*, costituente mercato elettronico della stazione appaltante;
2. di dare atto che l'importo dell'appalto, calcolato ai sensi dell'art. 14, comma 4 del D.lgs. n. 36/2023 ammonta a € 1.362.901,80, IVA esclusa ;
3. di dare atto che la procedura sarà aggiudicata a lotto unico e indivisibile;
4. di autorizzare, ai sensi dell'art. 86 del d.lgs. n. 36/2023, la pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (G.U.E.E.) dell'avviso volontario sulla trasparenza preventiva all'esito della presente procedura;
5. di dare atto che alla luce del valore stimato dell'acquisizione in parola è previsto il pagamento di un contributo in favore dell'A.N.A.C., in conformità a quanto disposto con la deliberazione A.N.A.C. n. 621 del 20 dicembre 2022, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 58 del 9 marzo 2023 da parte degli operatori economici concorrenti, di importo pari ad € 165,00;
6. di imputare l'importo complessivamente dovuto dall'IZSVe in qualità di stazione appaltante a titolo di contributo A.N.A.C. pari a € 660,00 alla voce di budget "*PRO/4400200500/CONTRIBUTO GARE AUTORITA' DI VIGILANZA*" – anno 2023;
7. di dare atto che le funzioni di Responsabile unico del progetto, ai sensi dell'art. 15 del D.lgs. n. 36/2023, sono svolte dal dott. Stefano Affolati, Direttore della SCA2 – Acquisti e Logistica;
8. di nominare collaboratore del RUP e referente dell'istruttoria, il dott. Stefano Berti, Assistente amministrativo presso la SCA2 – Acquisti e Logistica;
9. di delegare al medesimo Direttore della SCA2, qualora si renda necessario nel corso di espletamento della procedura, l'adozione dei provvedimenti di esclusione degli operatori economici concorrenti, mediante apposita Determinazione Dirigenziale, nonché la stipula del contratto di appalto successivamente all'aggiudicazione;
10. di destinare, ai sensi dell'art. 45 del d.lgs. n. 36/2023, una quota pari a 2% del valore dell'importo posto a base d'asta (al netto dell'IVA e delle opzioni), pari a € 27.258,04, per

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

gli incentivi delle funzioni tecniche relative alla procedura di gara in oggetto, quota che potrà essere distribuita tra il personale che ha svolto tali funzioni;

11. di demandare all'approvazione del provvedimento di aggiudicazione la nomina del Direttore dell'Esecuzione del Contratto e degli incaricati della verifica di conformità dello stesso, ai sensi dell'art. 114 del d.lgs. n. 36/2023.

IL DIRETTORE GENERALE

ESAMINATA la proposta di deliberazione del Responsabile della SCA2 - Servizio Acquisti e Logistica che attesta la regolarità della stessa in ordine ai contenuti sostanziali, formali e di legittimità dell'atto, attestazione allegata al presente provvedimento.

VISTO il decreto del Presidente della Giunta regionale del Veneto n. 102 del 22 settembre 2020 con il quale è stata nominata la dott.ssa Antonia Ricci quale Direttore generale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

VISTA la delibera del Direttore generale n. 141 del 19 aprile 2023 con la quale il dott. Giovanni Cattoli è stato nominato Direttore sanitario dell'Istituto.

VISTA la delibera del Direttore generale n. 101 del 10 marzo 2021 con la quale il dott. Massimo Romano è stato nominato Direttore amministrativo dell'Istituto.

ACQUISITO il parere favorevole del Direttore amministrativo e del Direttore sanitario per quanto di competenza, espresso ai sensi dell'art. 15 dello Statuto dell'Istituto, adottato con delibera del CdA n. 12 del 24 maggio 2021 e approvato con delibera della Giunta regionale del Veneto n. 1308 del 28 settembre 2021.

VISTO l'Accordo per la gestione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie tra la Regione del Veneto, la Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia e le Province Autonome di Trento e Bolzano, approvato dai suddetti Enti, rispettivamente, con leggi n. 5/2015, n. 9/2015, n. 5/2015 e n. 5/2015.

D E L I B E R A

1. di autorizzare, ex art. 17, comma 1 del d.lgs. n. 36/2023, l'avvio di una procedura negoziata senza pubblicazione di un bando, ai sensi dell'art. 76, comma 2, lettera b), n. 2 del medesimo decreto, mediante ricorso alla piattaforma telematica per l'*e-procurement* costituente mercato elettronico della stazione appaltante, volta all'aggiudicazione della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria "*Illumina NextSeq*" e "*Illumina MiSeq*", di durata quadriennale;
2. di espletare la procedura facendo ricorso alla piattaforma telematica per l'*e-procurement*, costituente mercato elettronico della stazione appaltante;

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

3. di dare atto che l'importo dell'appalto, calcolato ai sensi dell'art. 14, comma 4 del D.lgs. n. 36/2023 ammonta a € 1.362.901,80, IVA esclusa ;
4. di dare atto che la procedura sarà aggiudicata a lotto unico e indivisibile;
5. di autorizzare, ai sensi dell'art. 86 del d.lgs. n. 36/2023, la pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (G.U.E.E.) dell'avviso volontario sulla trasparenza preventiva all'esito della presente procedura;
6. di dare atto che alla luce del valore stimato dell'acquisizione in parola è previsto il pagamento di un contributo in favore dell'A.N.A.C., in conformità a quanto disposto con la deliberazione A.N.A.C. n. 621 del 20 dicembre 2022, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 58 del 9 marzo 2023 da parte degli operatori economici concorrenti, di importo pari ad € 165,00;
7. di imputare l'importo complessivamente dovuto dall'IZS.Ve in qualità di stazione appaltante a titolo di contributo A.N.A.C. pari a € 660,00 alla voce di budget "PRO/4400200500/CONTRIBUTO GARE AUTORITA' DI VIGILANZA" – anno 2023;
8. di dare atto che le funzioni di Responsabile unico del progetto, ai sensi dell'art. 15 del D.lgs. n. 36/2023, sono svolte dal dott. Stefano Affolati, Direttore della SCA2 – Acquisti e Logistica;
9. di nominare collaboratore del RUP e referente dell'istruttoria, il dott. Stefano Berti, Assistente amministrativo presso la SCA2 – Acquisti e Logistica;
10. di delegare al medesimo Direttore della SCA2, qualora si renda necessario nel corso di espletamento della procedura, l'adozione dei provvedimenti di esclusione degli operatori economici concorrenti, mediante apposita Determinazione Dirigenziale, nonché la stipula del contratto di appalto successivamente all'aggiudicazione;
11. di destinare, ai sensi dell'art. 45 del d.lgs. n. 36/2023, una quota pari a 2% del valore dell'importo posto a base d'asta (al netto dell'IVA e delle opzioni), pari a € 27.258,04, per gli incentivi delle funzioni tecniche relative alla procedura di gara in oggetto, quota che potrà essere distribuita tra il personale che ha svolto tali funzioni;
12. di demandare all'approvazione del provvedimento di aggiudicazione la nomina del Direttore dell'Esecuzione del Contratto e degli incaricati della verifica di conformità dello stesso, ai sensi dell'art. 114 del d.lgs. n. 36/2023.

Il presente provvedimento non è soggetto al controllo previsto dall'Accordo per la gestione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie approvato dagli Enti cogherenti con le leggi regionali e provinciali citate nelle premesse.

IL DIRETTORE GENERALE
dott.ssa Antonia Ricci

Sul presente atto deliberativo ha espresso parere favorevole

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

Il Direttore amministrativo
dott. Massimo Romano

Il Direttore sanitario
dott. Giovanni Cattoli

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

ATTESTAZIONI ALLEGATE ALLA DELIBERAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE

Il Responsabile della Struttura proponente attesta la regolarità della proposta di deliberazione, presentata per l'adozione, in ordine ai contenuti sostanziali, formali e di legittimità dell'atto e che la stessa:

Comporta spesa	<input checked="" type="checkbox"/>	su	Finanziamento istituzionale	<input checked="" type="checkbox"/>
			Finanziamento vincolato	<input type="checkbox"/>
			Altri finanziamenti	<input type="checkbox"/>
Non comporta spesa	<input type="checkbox"/>			

ATTESTAZIONE DI COPERTURA ECONOMICA DELLA SPESA

Il Responsabile del Budget attesta l'avvenuto controllo sulla disponibilità di budget

Evidenziato infine che il responsabile della Struttura proponente, con la sottoscrizione della proposta di cui al presente atto, dichiara, sotto la propria responsabilità ed ai sensi e agli effetti degli artt. 47 e 76 del DPR 28 dicembre 2000, n. 445, che, in relazione alla presente procedura, non si trova in condizioni di incompatibilità di cui all'art. 35 bis del d.lgs. n. 165/2001, né sussistono conflitti di interesse di cui all'art. 6 bis della legge n. 241/1990 e agli artt. 6, 7 e 14 del DPR n. 62/2013.

dott. Stefano Affolati

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del d.lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE

Viale dell'Università 10 – 35020 LEGNARO (PD)

DELIBERAZIONE DEL DIRETTORE GENERALE

N. 323 del 18/10/2023

OGGETTO: Delibera a contrarre, ai sensi dell'art. 17, comma 1 del d.lgs. n. 36/2023, per l'avvio di una procedura negoziata, senza previa pubblicazione di un bando di gara, per l'affidamento della fornitura di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria "Illumina NextSeq" e "Illumina MiSeq" con durata quadriennale (Numero gara: 9370607; CIG: A01C0D5420)

Publicata dal 18/10/2023 al 02/11/2023

Atto immediatamente esecutivo

Il Responsabile della Pubblicazione
Barbetta Michela

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del D.Lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

Elenco firmatari

Questo documento è stato firmato da:

dott. Stefano Affolati - SCA2 - Acquisti e Logistica
Dott. Massimo Romano - Direzione Amministrativa
Dott. Giovanni Cattoli - Direzione Sanitaria
Dott.ssa Antonia Ricci - Direzione Generale
Barbetta Michela - Gestione Atti

Atto sottoscritto digitalmente ai sensi del D.Lgs. 82/2005 s.m.i. e norme collegate e sostituisce il documento cartaceo e la firma autografa

Relazione tecnica l'affidamento della gara per l'acquisto di materiale consumabile da utilizzare per le attività di sequenziamento con i due sequenziatori genomici ad alta produttività e basso costo di esercizio compatibili con i requisiti della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare e delle attività di genomica microbiologica veterinaria Illumina NextSeq e MiSeq

Contesto e fabbisogno

Il miglioramento delle tecnologie di sequenziamento NGS ha segnato una svolta rivoluzionaria nella possibilità da parte dei laboratori preposti alla sorveglianza epidemiologica di implementare il sequenziamento genomico di nuova generazione (WGS) come mezzo per caratterizzare i genomi dei patogeni isolati da alimenti e da animali, offrendo innumerevoli opportunità di approfondimento scientifico nell'ambito della salute pubblica. Il WGS, quando associato ad informazioni di tipo epidemiologico, rappresenta infatti la metodologia più avanzata per identificare e analizzare le rotte di diffusione dei microrganismi patogeni e per collegare i focolai zoonosici alle fonti di infezione. La tipizzazione dei microrganismi patogeni e la possibilità di predirne il fenotipo sulla base dell'analisi della composizione dell'intero genoma rappresentano strumenti essenziali per la sorveglianza delle zoonosi.

L'importanza e la centralità del WGS, per la sorveglianza delle Malattie a Trasmissione Alimentare (MTA), è ormai riconosciuta a livello globale, con l'espressione ufficiale in tal senso delle organizzazioni internazionali preposte alla salute pubblica e alla sicurezza alimentare (ref. 1, 2, 3). In questo contesto, istituzioni sanitarie e di sicurezza alimentare Europee ed extraeuropee, che rappresentano il riferimento del settore, quali US Food and Drug Administration (FDA), US Center for Disease Control (CDC), Public Health England (PHE), European Reference Laboratory for Salmonella (EURLS), European Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURLAR) e i Laboratori di Riferimento Nazionali per i vari patogeni zoonosici dei paesi membri, tra i quali Salmonella, hanno attivato e in alcuni casi già completato percorsi di pieno utilizzo del WGS per la routine della sorveglianza delle MTA e almeno in parte per la AMR (ref. 4, 5, 6, 7, 8).

Dal 2013 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) ha avuto accesso diretto alla tecnologia NGS su **piattaforma Illumina** (Illumina MiSeq e NextSeq) e ha acquisito e sviluppato infrastrutture informatiche volte alla gestione ed analisi dei dati NGS. La disponibilità tecnologica e computazionale, unita alla presenza di team specializzati multidisciplinari afferenti alle Strutture Complesse SCS1 ed SCS5 di IZSve, consente di offrire agli enti preposti al controllo delle zoonosi ma anche all'utenza interna ed esterna, un servizio di sequenziamento NGS completo, che spazia dalla progettazione dell'esperimento all'analisi bioinformatica del dato generato.

In particolare, **nell'ambito della SCS1, il Centro di Riferenza Nazionale e OIE per le Salmonellosi (CRNS)** di IZSve, organo tecnico del Ministero della Salute nel coordinamento a livello nazionale delle attività di monitoraggio e sorveglianza delle salmonelle a livello di produzione primaria e lungo la filiera di produzione degli alimenti, svolge le analisi di laboratorio finalizzate all'identificazione e caratterizzazione degli isolati di Salmonella.

Il CRNS rappresenta inoltre il punto di riferimento per i laboratori degli IZZSS e altri laboratori del SSN che possono inviare i ceppi al CRNS per approfondimenti diagnostici.

Inoltre, il CNRS ha acquisito la competenza di centro di riferimento regionale (Veneto) per le Salmonellosi di origine umana, con conseguente costante sostanziale aumento dell'attività diagnostica.

Tra le altre attività il CNRS sono incluse:

- Il coordinamento la rete di sorveglianza *Enter-vet*, finalizzata a raccogliere informazioni sugli isolati di *Salmonella* di origine veterinaria identificati da parte degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali presenti nell'intero territorio nazionale;
- La conferma della tipizzazione di ceppi di *Salmonella* isolati da diverse matrici;
- Il supporto tecnico-scientifico in caso di tossinfezioni alimentari da *Salmonella*

In aggiunta l'analisi della composizione del genoma ha permesso al CNRS di approfondire lo studio di caratteristiche associate alla specificità di ogni isolato di *Salmonella*, quali tra gli altri la virulenza, l'invasività, l'antibiotico resistenza, la capacità di formare biofilm, la tolleranza ai metalli e la persistenza nell'ambiente. Questo ha consentito al CNRS di sviluppare numerosi progetti di ricerca, finanziati dal Ministero della Salute nell'ambito del bando per la Ricerca Corrente e per la Ricerca Finalizzata (anni 2015-2016-2017-2018-2019-2020-2021-2022-2023).

La diffusione dell'utilizzo del WGS a servizio del monitoraggio e del controllo dei batteri patogeni a trasmissione alimentare in Europa ha portato alla necessità, globalmente condivisa, di **standardizzazione e di armonizzazione delle procedure sia per la generazione del dato genomico che della relativa analisi**. A questo processo il CNRS ha contribuito attivamente attraverso la partecipazione alle attività dei consorzi internazionali ENGAGE ed INNUENDO, costituitisi a seguito di adesione ad un bando dedicato finanziato da EFSA (ref. 9,10) nel 2015, nonché prendendo parte ai *proficiency test* (PT) organizzati dalla piattaforma internazionale Global Microbial Identifier (GMI) (ref.11), che hanno dato esito positivo sia per la parte di produzione del dato genomico che per quella dell'analisi. Tali iniziative, oltre a fornire una analisi comparativa delle prestazioni del laboratorio rispetto agli altri laboratori nazionali ed alle istituzioni di riferimento, hanno avviato un processo di armonizzazione e standardizzazione delle procedure di preparazione del campione e di alcuni tipi di analisi, mediante confronto e formazione presso i laboratori internazionali capofila. Tale confronto ha inevitabilmente fornito uno standard *de-facto* anche in termini di scelte tecnologiche, tecniche e procedurali per la generazione e analisi dei dati WGS che consentissero la comparabilità dei risultati ottenuti.

In aggiunta, similmente a quanto sta accadendo nelle analoghe realtà internazionali sopra citate e per ragioni di comparazione dei risultati ottenuti, **il CNRS** sta completando il processo di "messa in routine" del WGS per le proprie attività di competenza. Questo comporterà, a processo ultimato, la necessità di sequenziare circa 2500 genomi batterici/anno cui sono da aggiungere altri circa 3000 genomi batterici/anno per attività di routine, studio e servizio per altre attività di Istituto o per collaborazioni esterne nel caso del CNRS.

Il passaggio alla routine di sorveglianza sopra descritta, unitamente ad ulteriori e crescenti necessità d'uso della tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (che non si limitano al WGS) per studi di metagenomica e di espressione genica, richiedono la disponibilità di reagenti Illumina, che sono stati utilizzati per il test delle procedure e per la redazione delle procedure di prova negli anni

precedenti. Non è infatti contemplabile dedicare tempo e risorse al test di nuovi reagenti derivanti da altre filiere di produzione.

Un incremento delle esigenze di produttività "omica" si prevede in IZSVe anche come conseguenza della attività del **Centro di Referenza Comunitario (CRC) per l'Influenza Aviaria (AI) e la Malattia di Newcastle (NDV)**, che ha tra i compiti, quello di rispondere alle esigenze di caratterizzazione genetica dei virus AI ed ND di tutti i paesi membri della Comunità Europea. Tale attività risulterà nella necessità di caratterizzare centinaia di viromi ogni anno.

Le attività di standardizzazione dei protocolli fin ora perseguite in IZSVe hanno già portato alla redazione di Procedure di Prova (PdP) ed Istruzioni Operative (IOp) che sono entrate a far parte del sistema qualità di Istituto e che sono state oggetto di progetti obiettivo interdipartimentali. Di seguito si riporta un elenco:

- PdP Produzione dati di Whole Genome Sequencing batterico su piattaforma Illumina
- PdP Produzione di sequenze 16S rDNA per la generazione di tabelle OTU per lo studio di metagenomica batterica su piattaforma Illumina
- PdP_Generazione di sequenza consenso da file FastQ generati da Illumina MiSeq mediante l'utilizzo di una sequenza di riferimento.
- PdP_Analisi metagenomica da file FastQ generati da Illumina MiSeq mediante l'utilizzo di un database di sequenze conosciute.
- PdP Progettazione target amplification per la caratterizzazione di genomi virali mediante Next Generation Sequencing (NGS)
- PdP Preparazione di librerie di DNA mediante "Nextera XT DNA sample preparation kit" per sequenziamento su Illumina MiSeq
- PdP Caricamento di librerie di sequenziamento su piattaforma Illumina MiSeq
- PdP Analisi deep sequencing del virus della bronchite infettiva aviaria usando approccio Illumina

Per soddisfare i fabbisogni di lavoro sopra descritti, è necessario utilizzare reagenti prodotti e commercializzati da Illumina che permettono quindi di rispondere alle seguenti necessità diagnostiche:

1. Standardizzazione del dato prodotto. Le analisi descritte rientrano nell'ambito della sorveglianza delle malattie a trasmissione alimentare (MTA), la quale richiede la massima condivisibilità e confrontabilità dei dati di sequenziamento, e delle loro successive analisi, prodotti dai diversi centri a livello nazionale e internazionale. Questo requisito di interscambiabilità è ampiamente favorito dalla condivisione e armonizzazione dei protocolli di sequenziamento in quanto le procedure di produzione, e analisi dei dati sono particolarmente dipendenti dalla tecnologia di sequenziamento e dai reagenti utilizzati. La condivisione e l'uso congiunto di dati di sorveglianza originati da tecnologie diverse richiede l'utilizzo di tecniche differenziate per la loro analisi e l'adattamento dei dati stessi (grezzi o processati) per renderli confrontabili, costringendo ad attivare complessi protocolli di standardizzazione crociata tra tecnologie diverse. Purtroppo, allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, non è garantita una interscambiabilità assoluta e certa dei risultati (ovvero, non è garantita una riproducibilità al 100% dei risultati). Per queste ragioni, attualmente, la maggior parte dei centri primari che svolgono sorveglianza in routine WGS utilizzano la stessa tecnologia di sequenziamento (Illumina) (ref. 5, 6, 7, 8) e i medesimi reagenti. Questa evidenza è emersa anche dalle *survey* condotte al livello europeo dal EURLS e al livello nazionale dal CRNS, dalle quali

emerge che il 95% dei laboratori afferenti ai rispettivi network di competenza utilizzano la tecnologia Illumina per la produzione dei dati di genomica. In caso di acquisizione di tecnologie differenti, dunque, **le strutture coinvolte** dovrebbero mettere in atto complessi e costosi studi di validazione crociata dei dati prodotti a partire dalle diverse tecnologie di sequenziamento. Tali attività rischierebbero di essere altamente impattanti, in termini di tempi e costi, per due laboratori di piccole dimensioni, in cui il personale dedicato a tali attività (generazione ed analisi dei dati) è al momento ridotto a poche unità.

2. Accuratezza dei dati prodotti. Tra le tecnologie di sequenziamento genomico esistenti, Illumina, attualmente pressoché esclusiva nei centri di sorveglianza delle MTA, è quella accreditata della migliore accuratezza del dato prodotto (ref. 3, 12). La particolare accuratezza del dato di sequenza prodotto da Illumina deriva da una specifica tecnologia impiegata in esclusiva da questo produttore (sequencing by synthesis basata sull'utilizzo di ddNTP con terminatori reversibili e marcati con più fluorofori). Il principio alla base di questa tecnologia (uso di terminatori reversibili) è protetto da brevetto (EP1560838B1).

3. Controllo delle corse da parte di Illumina e possibile sostituzione di reagenti fallati. I reagenti Illumina sono coperti dalla garanzia di funzionamento e possono essere sostituiti in caso di fallo per il fatto che ogni reagente può essere tracciato da una piattaforma interattiva gestita da tecnici Illumina che offrono anche consulenza scientifica e corsa in fase sperimentale.

Per le ragioni sopra esposte si ritiene che, allo stato attuale, i reagenti illumina siano gli unici in grado di soddisfare gli odierni bisogni tecnico-scientifici di IZSVe.

RIFERIMENTI CITATI

1. EFSA's 20th Scientific Colloquium on Whole Genome Sequencing of food-borne pathogens for public health protection. Parma: European Food Safety Authority (EFSA); 2015. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-743>
2. Technical background paper - Applications of Whole Genome Sequencing in food safety management. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations in collaboration with the World Health Organization; 2016.
3. Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. FDA (US Food and Drug Administration). Whole Genome Sequencing Programme. Website: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/> consultato il 29 giugno 2018
5. CDC (US Center for Disease Control). WGS PulseNet. Website: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html> consultato il 29 giugno 2018
6. Protocolli PulseNet: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocols.html> consultato il 29 giugno 2018
7. Use of WGS for Typing Salmonella at PHE <https://www.eurlsalmonella.eu/dsresource?type=pdf&disposition=inline&objectid=rivmp:318839&versionid=&subobjectname=> consultato il 29 giugno 2018
8. Ashton PM, Nair S, Peters TM, Bale JA, Powell DG, Painset A, Tewolde R, Schaefer U, Jenkins C, Dallman TJ, de Pinna EM, Grant KA, Salmonella Whole Genome Sequencing Implementation Group. (2016) Identification of Salmonella for public health surveillance using whole genome sequencing. PeerJ 4:e1752 <https://doi.org/10.7717/peerj.1752>
9. Final report of ENGAGE - Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1431
10. INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of

- food-borne pathogens. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1498
11. <https://www.globalmicrobialidentifier.org/about-gmi> consultato il 9/12/2018
 12. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Clin Microbiol Infect. 2018 Apr;24(4):335-341. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.013. Epub 2017 Oct 23. Review.
 13. Briese T, Kapoor A, Mishra N, Jain K, Kumar A, Jabado OJ, Lipkin WI. Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis. MBio. 2015 Sep 22;6(5):e01491-15. doi: 10.1128/mBio.01491-15. Erratum in: MBio. 2017 May 16;8(3):.

Legnaro, 01/09/2023

SCS1 – Microbiologia generale e sperimentale
La Dirigente

Dott.ssa Carmen Losasso


