

D.M. del 4 Ottobre 1999
“Centri di Referenza Nazionali nel Settore Veterinario” Art. 5

CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LA LEPTOSPIROSI
IZS della Lombardia e dell’Emilia Romagna, via Bianchi 9, 25124 Brescia

Il Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi (CRNL) dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna (IZSLER) si articola in diverse strutture: il Reparto Batteriologia (BA), il Reparto di Genomica (GN), la Sezione Diagnostica di Brescia, il Laboratorio di Istologia, gli Osservatori Epidemiologici Veterinari della Regione Lombardia (SEL) e dell’Emilia Romagna (SEER). Concorrono alle attività le Sezioni Diagnostiche.

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 2011 sono le seguenti:

- Struttura complessa Reparto Genomica, con il Reparto Batteriologia aggregato: 1 dirigente biologo 35% (Responsabile).
- Reparto Batteriologia (BA):
 - 1 dirigente veterinario 10%
 - 2 tecnici di laboratorio biomedico, rispettivamente al 80% e al 55%
 - 2 assistenti tecnici addetti servizi laboratorio al 90% e al 5%
 - 1 operatore tecnico sanitario addetto ai servizi di laboratorio al 80%.

Il Reparto BA dispone delle attrezzature necessarie per lo svolgimento dell’attività diagnostica colturale, sierologica e di biologia molecolare, per la produzione di ceppi, per la conservazione in azoto liquido di una collezione di ceppi di riferimento e di campo e per le attività di ricerca nell’ambito di questi settori.

- Reparto Genomica (GN):
 - 2 dirigenti biologi al 5%
 - 2 tecnici di laboratorio biomedico al 5%.

Il Reparto GN mette a disposizione strutture, attrezzature e competenze a supporto diagnostico ed opera per lo sviluppo di metodiche innovative biologico-molecolari, al fine del controllo d’identità dei ceppi di *Leptospira* di riferimento e dell’evidenziazione e caratterizzazione di leptospire patogene nei campioni biologici.

- La Sezione Diagnostica di Brescia:
 - 1 dirigente veterinario al 5%.

La Sezione di Brescia ha partecipato alle attività del CRNL fornendo supporto per la gestione in campo dei focolai su territorio nazionale, oltre che per le attività di competenza delle Sezioni Diagnostiche, quali necroscopie, esame anatomo-patologico, diagnosi differenziale, prelievo dei campioni da inviare al Reparto di Batteriologia.

- Laboratorio di Istologia con sede a Milano:
 - 1 dirigente veterinario al 5%.

Il Laboratorio di Istologia ha partecipato alle attività del CRNL relativamente ad esami istologici e immunoistochimici.

- Osservatori Epidemiologici Veterinari della Regione Lombardia (SEL) e dell'Emilia Romagna (SEER):

2 dirigenti veterinari al 5%.

Il SEL e il SEER hanno partecipato alle attività del CRNL con consulenze nella gestione di focolai. Inoltre il SEL ha collaborato relativamente alla raccolta, elaborazione dati e analisi statistica di ring test tra IIZZSS.

Il piano d'attività 2011 descritto nei seguenti punti si riferisce al periodo 01/10/2010-30/09/2011, tenuto conto della periodicità trimestrale della reportistica di controllo di gestione; analogamente il periodo di riferimento della programmazione 2012 è 01/10/2011-30/09/2012.

Obiettivi strategici

La diagnosi di laboratorio di leptospirosi risulta dall'applicazione dei metodi tradizionali sierologici (agglutinazione microscopica MAT) e colturali, laddove possibile e di metodi di biologia molecolare (PCR) che permettano di superare i limiti dell'isolamento, trattandosi di microorganismi esigenti dal punto di vista nutrizionale e a lenta crescita.

Le metodiche PCR, nella versione tradizionale e Real Time, attualmente non applicate in tutti gli IIZZSS, devono essere specifiche per leptospire patogene e consentire una diagnosi certa e sensibile anche in assenza di isolamento colturale. Inoltre, pur basandosi sull'amplificazione del DNA leptospirale, data la labilità del microorganismo e delle frequenti basse cariche, tali metodiche sono soggette a criticità legate alla conservazione e al trattamento del campione (estrazione dell'acido nucleico). E' quindi necessario provvedere a prelievo accurato e trasporto rapido dei campioni e applicare il metodo in qualità con uso di controlli interni che svelino la presenza di eventuali inibizioni. E' quindi obiettivo del CRNL la stesura di protocolli di prelievo e di trasporto delle diverse tipologie di campioni biologici utili alla diagnosi di leptospirosi e la messa a punto di adeguate metodiche PCR da armonizzare tra gli Istituti.

L'identificazione del sierogruppo causale è possibile a partire da siero e da ceppo isolato mediante esame sierologico MAT. Per un'identificazione più approfondita a livello di sierovariante con metodi di biologia molecolare è importante disporre dell'isolato o di elevate quantità di DNA nelle matrici organiche. Obiettivo è quindi sviluppare tecniche identificative basate su PCR/sequenziamento per il rilevamento e la caratterizzazione delle leptospire patogene di interesse veterinario a livello di specie, sierovariante o genotipo su matrici organiche, oltre che su ceppi isolati, a scopo diagnostico o a fini epidemiologici.

Obiettivo prioritario è implementare attività in supporto al territorio ed alle Autorità sanitarie in termini operativi nei confronti di specifici problemi sanitari e normativi (consulenze per AASSLL, Regioni, Ministero) coerenti con il Regolamento di Polizia Veterinaria.

Attività Diagnostica

1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche;

Presso il Centro si utilizzano la metodica di agglutinazione microscopica (MAT) per la diagnosi sierologica di leptospirosi (Metodo di prova IZSLER, accreditato SINAL con il n° MP04/019, revisionato e rivalidato il 15/03/2011) e la metodica impiegata per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante esame colturale (MP01/127). Rispetto a quanto comunicato alla Direzione Sanitaria IZSLER (mail 12/01/2010) perché potesse rispondere al Ministero della Salute entro il 15/01/2010, dal 10/05/2011 la metodica per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante PCR in matrici di origine animale (MP09/40) è stata sostituita da analoga metodica in PCR Real Time (MP09/112).

2) produzione e distribuzione di reagenti;

Il CRNL (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma d) si rifornisce, produce, detiene e distribuisce agli altri IIZZSS i reagenti di riferimento, nella fattispecie gli 8 ceppi batterici *Leptospira* considerati materiale di riferimento primario da utilizzare come antigeni nella prova sierologica MAT.

Nel periodo di riferimento considerato ha mantenuto una collezione di ceppi di riferimento e di campo, mediante conservazione sia a temperatura ambiente con passaggi seriali, sia in azoto liquido.

Nel periodo considerato sono state effettuate 8 forniture di colture di *Leptospira* a 7 Istituti Zooprofilattici per un totale di 50 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT e per il controllo del terreno di coltura (IZS dell'Abruzzo e del Molise 1 ceppo prot. 30845 del 22/10/10; IZS della Sardegna 1 ceppo prot. 35167 del 02/12/10; IZS del Lazio e della Toscana 8 ceppi prot. 36787 del 17/12/10 e 8 ceppi prot. 19845 del 18/07/11; IZS della Puglia e della Basilicata 8 ceppi prot. 4303 del 14/02/11; IZS delle Venezie 8 ceppi prot. 4307 del 14/02/11; IZS del Mezzogiorno 8 ceppi prot. 4736 del 18/02/11; IZS dell'Umbria e delle Marche 8 ceppi prot. 5126 del 22/02/11).

Per i ceppi di derivazione Royal Tropical Institute (KIT) di Amsterdam (Laboratorio di Riferenza OIE, FAO, OMS), siamo stati autorizzati dal Dr. Hartskeerl (prot. 2124 del 23/1/06) alla cessione a titolo gratuito agli altri IIZZSS (nel rispetto dei compiti del CRNL secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma d) con il vincolo di non cederli a terzi.

Dati i rapporti di collaborazione con la Prof.ssa Marina Cinco, che ha fornito in passato la nostra collezione di ceppi di *Leptospira*, sono stati forniti all'Università degli Studi di Trieste, Dipartimento Scienze della Vita, *Leptospira* Reference Laboratory, 4 ceppi (prot. 9419 del 01/04/11).

Nel periodo considerato è stata effettuata una fornitura di siero negativo per *Leptospira* a un Istituto Zooprofilattico (IZS del Mezzogiorno 1 pz. siero *Leptospira* negativo prot. 30846 del 22/10/10).

3) attività analitica (*numero di campioni processati, tipologia e provenienza dei campioni, risultati, utilizzatori dei servizi analitico-diagnostici del centro*);

Nel periodo di riferimento considerato sono stati messi a confronto mediante MAT (MP04/019) 10.745 sieri con 8 antigeni appartenenti agli 8 sierogruppi più diffusi in Italia, per un totale di 85.960 esami. Si sono rilevate 2.010 positività, talvolta multiple, ai sierogruppi Australis, Pomona, Sejroe, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Tarassovi e Ballum in ordine di frequenza.

Nello stesso periodo, da organi e fluidi biologici, sono stati eseguiti 146 esami colturali per ricerca di *Leptospira*, di cui 7 sono risultati positivi. Gli isolati, sottoposti a identificazione

con tecnica sierologica, appartengono al sierogruppo Pomona (5), al sierogruppo Australis (1) e al sierogruppo Sejroe (1).

Sono stati inoltre eseguiti esami PCR per la ricerca di leptospire patogene per un totale di 217 campioni, di cui 22 positivi con la metodica tradizionale e 77 campioni, di cui 17 positivi con la metodica Real Time.

I campioni esaminati sono stati per lo più conferiti dalle Sezioni Diagnostiche provinciali dell'IZSLER.

Il CRNL ha sempre risposto con sollecitudine alle richieste di analisi a supporto degli altri IZZSS (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma a).

Nel periodo considerato sono stati sottoposti a conferma diagnostica con il metodo di agglutinazione microscopica MAT 51 sieri conferiti dall'IZS del Mezzogiorno: 22 di bovino (17 sieri prot. 360 del 10/01/11; 5 sieri prot. 20724 del 26/07/11), 25 di cane (19 sieri prot. 34653 del 26/11/10; 1 siero prot. 35671 del 06/12/10; 1 siero prot. 37672 del 24/12/10; 4 sieri prot. 2506 del 27/01/11), 3 di capra (prot. 5127 del 22/02/11) e 1 di bufalo (prot. 2106 del 25/01/11).

Nello stesso periodo sono stati esaminati 3 organi di cane con metodica PCR conferiti dall'IZS della Puglia e della Basilicata (prot. 1688 del 21/01/2011).

Sono inoltre stati sottoposti a tipizzazione 4 ceppi isolati da bovino dall'IZS Lazio e Toscana (prot. 14119 del 18/05/11.)

4) circuiti interlaboratorio organizzati dal C. d. R. (*risultati, gestione degli stessi, successi e fallimenti*)

E' stato organizzato un circuito interlaboratorio MAT leptospirosi tra Istituti Zooprofilattici (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma c) con invio dei campioni il 09/12/2010 (prot. 35856) e del report finale il 08/04/2011 (prot. 10012).

Il CRNL assicura costantemente su richiesta degli IZZSS il controllo d'identità dei ceppi in uso come antigeni MAT presso i laboratori locali e l'eventuale fornitura.

5) ring test a cui ha partecipato il personale del C. d R. (*risultati, gestione degli stessi, successi e fallimenti*)

Il CRNL ha partecipato, all' "International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis MAT -Round 9" sulla prova di agglutinazione microscopica (MAT), organizzato da R. Chappel, National Serology Reference Laboratory (NRL) - Victoria (Australia), coadiuvato da R. A. Hartskeerl e M. Goris, Leptospirosis Reference Centre, Royal Tropical Institute (KIT) - Amsterdam (Olanda), e da M. F. Palmer, Leptospirosis Reference Unit Public Health Laboratory Service (PHLS) - Hereford (U.K), con la finalità di fornire assicurazione di qualità ai laboratori che eseguono il test di agglutinazione microscopica MAT per la diagnosi di leptospirosi in campo umano o veterinario. I risultati ottenuti a seguito della partecipazione al circuito confermano la validità delle procedure e dei controlli applicati agli Ag diagnostici presso il CRNL (prot. 6409 del 04/03/11, mail 08/04/11).

6) altre attività (*es. necroscopie, istopatologia, ecc.*)

Oltre che sull'esame anatomo-patologico in sede necroscopica eseguito presso le Sezioni Diagnostiche, la diagnosi post mortem si basa sulla valutazione microscopica delle lesioni renali e sull'immunolocalizzazione di *Leptospira interrogans s.l.* in colorazione immunoistochimica (IHC) presso il Laboratorio di Istologia. Il metodo (MP07/003) di IHC validato e accreditato che utilizza un pool di anticorpi policlonali di produzione interna

rappresentativi delle più importanti sierovarianti in campo veterinario, è stato applicato a n° 62 campioni, di cui 22 positivi, nel periodo considerato.

Epidemiologia

1) creazione di banca dati;

Dopo aver ricevuto autorizzazione dalla Direzione Generale Sanità animale e Farmaco Veterinario del Ministero della Salute (prot. 19267 del 08/07/2011; prot. DGSA 14060 del 03/08/2011- ns. prot. 21625 del 04/08/2011) alla richiesta agli altri IIZZSS dei dati relativi alla leptospirosi in loro possesso, si è proceduto in tal senso (prot. 21953 del 08/08/2011). Stiamo ultimando la raccolta dei dati nazionali che saranno elaborati, integrati e restituiti agli IIZZSS nel corso di un evento formativo 2012 sull' "Attività diagnostica leptospirosi presso il Centro di referenza e gli Istituti Zooprofilattici", per il quale verrà chiesto accreditamento ECM. Il passo successivo sarà quello di stabilire un format da distribuire agli IIZZSS per mantenere l'aggiornamento dei dati. La ricognizione della casistica e dei metodi applicati presso gli IIZZSS sarà utile anche all'organizzazione di circuiti interlaboratorio mirati.

2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;

si sta valutando la possibilità con il Responsabile dei sistemi informativi di impostare un data base per la raccolta dei dati degli IIZZSS.

3) studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo;

4) aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza

Ricerca e sperimentazione

1) Progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute (*titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.*)
Si sta lavorando in vista di un progetto di ricerca corrente ministeriale proposto per il 2011 "Produzione di linee guida e metodi diagnostici per la gestione di focolai di leptospirosi bovina".

Si è anche aderito all'invito dell'IZS della Sardegna a collaborare ad un progetto di ricerca corrente ministeriale proposto per il 2011 "Indagine sulla prevalenza della leptospirosi nella fauna selvatica della Sardegna".

2) Altre ricerche (*titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.*)

Aggiornamento e formazione professionale

1) Corsi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato

Formazione per il personale di altri Istituti Zooprofilattici (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma f): visita formativa di un giorno (02/12/2010) di 2 operatori (Dr.ssa Ivana Piredda e Sig.ra Bruna Palmas) dell'IZS della Sardegna (prot. 31811 del 04/11/2010), finalizzata all'illustrazione delle metodiche in uso e alla lettura microscopica del metodo di prova MAT.

Nell'ambito del Ciclo di seminari sulla ricerca e l'aggiornamento scientifico, rivolti a Dirigenti e Borsisti Biologi e Veterinari di alcuni Reparti IZSLER svolti nel 2011 (con accreditamento ECM- Responsabile scientifico Dr.ssa Maria Beatrice Boniotti, Reparto Genomica), è stato tenuto dalla Dr.ssa Tagliabue un Seminario dal titolo "Prospettive nella diagnosi di laboratorio di leptospirosi presso il CRNL, con particolare riguardo a tecniche di biologia molecolare" (27/4/2011, ore 14,00-16,00).

E' stato proposto al CRN Formazione IZSLER ed è in programma un evento formativo 2012 sull' "Attività diagnostica leptospirosi presso il Centro di referenza e gli Istituti

Zooprofilattici”, per il quale verrà chiesto accreditamento ECM. In tale occasione saranno presentati e discussi oltre ai dati della rete IIZZSS, gli esiti dei circuiti interlaboratorio organizzati dal CRNL e si darà spazio ad interventi degli IIZZSS.

2) Convegni/congressi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato;

E' stato organizzato il Convegno “Leptospirosi: Argomenti di Attualità” Brescia, 3 Dicembre 2010, nel corso del quale è stata fatta una presentazione della Dr.ssa Tagliabue sulla “Diagnosi di laboratorio presso il CRNL” (ore 12,00-13,00).

3) Comitati scientifici e gruppi di lavoro a cui ha partecipato il personale del C. d. R.

Si sta organizzando con un referente ministeriale un tavolo tecnico di approfondimento sulla leptospirosi con la partecipazione di personale dirigente del CRNL e di altri IIZZSS al fine di proporre aggiornamenti e modifiche all'OM 4 settembre 1985 nel senso auspicato durante la tavola rotonda svoltasi a chiusura del Convegno “Leptospirosi: Argomenti di Attualità” (Brescia, 3 Dicembre 2010) e di definire protocolli di intervento in aziende focolaio di leptospirosi.

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

1) Consulenze richieste ad esterni

2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni

Consulenza fornita al Dr. Domenico Scaltrito IZS Puglia e Basilicata, Sede di Foggia, U.O. Sierologia (mail 14-15-19-20/07/2011) in merito a conta microscopica e stima spettrofotometrica al fine del raggiungimento della concentrazione di leptospire prevista dal metodo MAT, che si avvale di antigeni vivi; è stato fornito supporto tecnico a distanza circa la scelta e l'utilizzo di camere di conta, il numero delle letture per ogni coltura, il metodo di calcolo e la diluizione da applicare, controllando i dati forniti dal richiedente. Sono state fornite informazioni al Dr. Giuseppe Manna dell'IZS del Lazio e della Toscana sul conteggio di leptospire destinate a prove di biologia molecolare, con l'uso di camere di conta al microscopio in campo scuro e su stime spettrofotometriche (mail 06/10/2011).

3) Attività di docenza

Illustrazione dell'attività di diagnostica della leptospirosi presso il CRNL il 6/5/11 ore 9,00-10,00 e 10,15-11,15 in corso di visita di studenti del V anno del Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano, accompagnati dalla Prof.ssa Stefania Lauzi, Docente all'interno del Modulo “Dal laboratorio all'ambulatorio: diagnostica e profilassi delle malattie infettive degli animali da compagnia” (prot. 11659 del 26/4/2011 e 12332 del 02/05/2011).

Consulenze e collaborazioni europee

(intese anche le collaborazioni in programmi di ricerca)

Non sono stati richiesti dal Punto di Contatto Italiano EFSA (Dr.ssa Donatella Capuano, Ministero della Salute) dati relativi alle attività di monitoraggio leptospirosi che si svolgono nei vari paesi europei (proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals), come invece verificatosi nel 2010.

Consulenze e collaborazioni internazionali

(intese anche le collaborazioni in programmi di ricerca)

Pubblicazioni scientifiche e brochure divulgative *(copia del frontespizio)*

Marenzoni M.L., Lepri E., Coppola G., Sforza M., Sordini C., Tiburzi A., Valentini S., Vitellozzi G., Coletti M., Tagliabue S., Passamonti F. (2010) Aborto e morte perinatale da *Leptospira interrogans sensu lato* nel cavallo. *Ippologia*, 21 (4), 23-29.

Sito Web *Sito web (indirizzo, frequenza di aggiornamento e contenuto)*

E' 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 Leptospirosi (indirizzo: <http://www.bs.izs.it/Referenza/Lepto/Lepto.htm>).

Brescia, 25/11/2011

Il Direttore del CRNL
Dr.ssa Silvia Tagliabue