

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) presso la Sede Centrale 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), l’Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Regione Lombardia (OEVRL) e la Sezione Diagnostica di Brescia.

Le risorse umane e strumentali delle Strutture che hanno partecipato alle attività del CRNL nel corso dell’anno 2010 sono le seguenti:

- 1 dirigente biologo 35% (Responsabile della Struttura complessa Reparto Genomica, con il Reparto Batteriologia aggregato).
- Il Reparto BA, afferente al Reparto Genomica, dispone delle attrezzature necessarie per lo svolgimento dell’attività diagnostica culturale, sierologica e biologico-molecolare, per la produzione di ceppi, per la conservazione in azoto liquido di ceppi di riferimento e di campo e per le attività di ricerca nell’ambito di questi settori. Il personale dipendente del Reparto BA, partecipante al CRNL, ha compreso n° 6 unità a tempo indeterminato, con impegno orario di seguito specificato in percentuale:
 - 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 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. Il Reparto GN ha operato a supporto del CRNL con 2 unità a tempo indeterminato:
 - 1 dirigente biologo al 5%
 - 1 tecnico di laboratorio biomedico al 5%.
- L’OEVRL ha partecipato alle attività del CRNL relativamente a indagini epidemiologiche svolte in allevamenti sieropositivi con:
 - 1 unità a tempo indeterminato (dirigente veterinario al 5%)
- La Sezione Diagnostica di Brescia ha partecipato alle attività del CRNL, relativamente a necropsia, prelievo di campioni e diagnosi differenziale di laboratorio con:
 - 1 unità a tempo indeterminato (dirigente veterinario al 5%)

Il piano d’attività 2010 descritto nei seguenti punti si riferisce al periodo 01/10/2009-30/09/2010, tenuto conto della periodicità trimestrale della reportistica di controllo di

gestione; analogamente il periodo di riferimento della programmazione 2011 è 01/10/2010-30/09/2011.

Obiettivi strategici

La diagnosi di laboratorio di leptospirosi non può che risultare dall'applicazione routinaria dei metodi tradizionali sierologici (agglutinazione microscopica MAT) e colturali, laddove possibile, e di metodi di biologia molecolare (PCR).

L'isolamento di leptospire, a tutt'oggi considerato il metodo d'elezione per dimostrarne la presenza in campioni biologici, deve tener conto di una serie di importanti difficoltà, come la necessità di terreni complessi, e limitazioni a carico del campione, come la non rara autolisi avanzata, la possibile presenza di anticorpi inibenti la crescita del microrganismo e lo sviluppo di contaminanti. I lunghi tempi di replicazione del microrganismo richiedono un'incubazione prolungata. Attualmente, con l'esordio dell'applicazione di rapide tecniche di amplificazione enzimatica, l'isolamento colturale diviene talvolta incompatibile con le necessità di urgenza dell'utenza, che è sempre meno disposta ad attendere un'analisi ad esito tardivo e ad accollarsi il relativo onere economico.

Si è così affermato l'impiego di metodiche PCR da applicare direttamente al campione biologico, specifiche per le sole leptospire patogene, che mantengono comunque alcune criticità legate alla conservazione e al trattamento del campione. E' in programma la valutazione di una metodica PCR Real Time per la ricerca di leptospire patogene. L'applicazione dell'esame colturale, affiancato alla PCR, permette di ottenere una maggiore certezza diagnostica, anche se con conferma tardiva e fornisce isolati senza i quali l'identificazione della sierovariante causale è molto difficile. La disponibilità del ceppo consente infatti di effettuare la sierotipizzazione e di applicare tecniche di tipizzazione di biologia molecolare di conferma o che forniscano elementi aggiuntivi, in quanto discriminanti a livello di specie, sierovariante o genotipo.

Poiché le tecniche di biologia molecolare di approfondimento richiedono un'elevata quantità di acido nucleico, data la frequente indisponibilità di isolati, ne consegue come indirizzo la sperimentazione e il perfezionamento di metodiche di biologia molecolare che possano dare un contributo per la tipizzazione genetica anche a partire dall'acido nucleico presente nel campione biologico (PCR/RFLP). Allo stato attuale non sono ancora state sviluppate metodiche che consentano di identificare tutte le specie e le sierovarianti di *Leptospira* e quindi si deve ricorrere a una combinazione di metodi diversi. Diviene importante un costante aggiornamento bibliografico; le metodiche scaturite dalla ricerca degli ultimi anni andranno valutate per studiarne possibili applicazioni.

E' in programma la definizione di un protocollo di intervento in aziende focolaio di leptospirosi in collaborazione con Sezioni Diagnostiche e Osservatori epidemiologici regionali IZSLER.

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, validato), la metodica impiegata per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante

esame colturale (MP01/127) e la metodica per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante PCR in matrici di origine animale (MP09/40). E' in programma la codifica del metodo di prova per l'identificazione di *Leptospira* spp. mediante tecnica sierologica.

Il seguente MP è stato trasferito su richiesta ad altri IIZZSS italiani (art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *b, e*): MP09/040 all'IZS dell'Umbria e delle Marche (16/10/2009).

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 5 forniture di colture di *Leptospira* a 3 Istituti Zooprofilattici (IZS del Mezzogiorno 9 ceppi prot. 36280 del 09/12/09 e 8 ceppi prot. 25219 del 15/09/10; IZS dell'Abruzzo e del Molise 1 ceppo prot. 10475 del 09/04/10 e 1 ceppo prot. 30552 del 20/10/10; IZS della Sardegna 8 ceppi prot. 17979 del 15/06/10; per un totale di 27 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT e per il controllo del terreno di coltura.

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.

Nel periodo considerato è stata effettuata 1 fornitura di siero negativo per *Leptospira* a 1 Istituto Zooprofilattico (IZS del Mezzogiorno 1 siero prot. 30144 del 15/10/10).

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) 13.817 sieri con 8 antigeni appartenenti agli 8 sierogruppi più diffusi in Italia, per un totale di 110.537 esami. Si sono rilevate 3.692 positività, talvolta multiple, ai sierogruppi Australis, Pomona, Sejroe, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Tarassovi e Ballum in ordine di frequenza.

Nello stesso periodo, da organi e fluidi biologici, sono stati eseguiti 177 esami colturali per ricerca di *Leptospira*, di cui 19 positivi. Gli isolati, insieme con altri ceppi di campo, sono stati sottoposti a identificazione con tecnica sierologica, per un totale di 26 identificazioni. E' stata riscontrata principalmente la sierovariante Pomona.

Sono stati inoltre eseguiti esami PCR per la ricerca di leptospire patogene per un totale di 183 campioni, di cui 20 positivi.

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 IIZZSS (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *a*). Nel periodo considerato sono stati sottoposti a conferma diagnostica 50 sieri: 18 sieri di cavallo (IZS delle Venezie prot. 12662 del 27/04/2010), 25 sieri ovi-caprini, 5 di cane (IZS del Mezzogiorno prot. 25220 del

15/09/10) e 2 di bovino (IZS Lazio e Toscana, Siena prot. 38245 del 28/12/2009). Sono inoltre stati sottoposti a tipizzazione 10 ceppi isolati: 1 isolato da urina di cane e 2 ceppi utilizzati come antigeni nella MAT (IZS delle Venezie prot. 35221 del 27/11/2010); 1 isolato da urina bovina in 6 aliquote (IZS Roma prot. 650 del 12/1/10); 2 isolati da urina di topo e di cane (IZS delle Venezie prot. 1759 del 22/01/2010); 1 isolato da urina bovina in 4 aliquote (IZS Roma prot. 7050 del 11/03/10); 2 ceppi da urina bovina e di cane (IZS delle Venezie prot. 13933 del 06/05/2010).

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

Stiamo organizzando un ring test tra Istituti Zooprofilattici (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma c) con distribuzione prevista entro fine anno. Il CRNL assicura costantemente su richiesta degli IIZZSS 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 8" 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. 3812 del 11/02/10, mail 10/05/10).

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

Epidemiologia

- 1) creazione di banca dati;
- 2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;
- 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.*)
- 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
- 2) Convegni/congressi che il C. d. R. ha organizzato o a cui ha partecipato;
V Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria "L'Epidemiologia veterinaria di fronte ai cambiamenti naturali e sociali che influenzano la salute", Torino, 10-11 dicembre 2009.
E' in corso di organizzazione il Convegno Leptospirosi: Argomenti Di Attualità Brescia, 3 Dicembre 2010.

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

Consulenze, attività di docenza, collaborazioni nazionali

- 1) Consulenze richieste ad esterni
- 2) Consulenze e pareri tecnici forniti ad esterni
- 3) Attività di docenza

Illustrazione attività di diagnostica leptospirosi in corso di visita studenti V anno Veterinaria Università di MI, accompagnati dalla Prof.ssa Stefania Lauzi, Brescia 19/05/2010, 10,30-12,00.

Consulenze e collaborazioni europee

(intese anche le collaborazioni in programmi di ricerca)

Come contribuito alla ricognizione delle attività di monitoraggio che si svolgono nei vari paesi europei (proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals) è stato compilato con i dati IZSLER, nella sezione di competenza inerente la leptospirosi, un questionario relativo alle zoonosi (Questionnaire on vector-borne zoonoses - Questionnaire for inventory of past and current data collection systems for Leptospira spp. in animals) richiesto dal Punto di Contatto Italiano EFSA.

Tale questionario è stato inviato alla Dr.ssa Donatella Capuano, Ministero della Salute.

Consulenze e collaborazioni internazionali

(intese anche le collaborazioni in programmi di ricerca)

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

Manfredi M.T., Invernizzi A., Tagliabue S., Zanzani S. (2009) Rischi sanitari legati alla presenza di nutrie in un'area urbanizzata. P39 V Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria "L'Epidemiologia veterinaria di fronte ai cambiamenti naturali e sociali che influenzano la salute", Torino, 10-11 dicembre 2009, pag. 65.

E' in corso di stesura il lavoro Valutazione di metodi molecolari per la diagnosi di leptospirosi suina per pubblicazione.

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>). Tale sito viene aggiornato periodicamente.

Brescia, 26/11/2010

Il Direttore del CRNL
Dr.ssa Silvia Tagliabue