

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, modificate a seguito della recente riorganizzazione dell’Ente: il Reparto Batteriologia (BA, Reparto di Batteriologia Specializzata fino al 30/4/2009), il Reparto di Genomica (GN, Reparto di Biologia Molecolare fino al 30/4/2009), l’Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Regione Lombardia (OEURL) e la Sezione Diagnostica di Brescia.

Le risorse umane e strumentali delle Strutture che hanno partecipato alle attività del CRNL nel corso dell’anno 2009 sono le seguenti:

- Il Reparto BA, afferente al Reparto Genomica, dispone delle attrezzature necessarie per lo svolgimento dell’attività diagnostica culturale, sierologica e biologico-molecolare (di base), 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° 9 unità a tempo indeterminato, con impegno orario di seguito specificato in percentuale:
 - 1 dirigente biologo 55% fino al 30/4/09 (Reparto Batteriologia Specializzata), poi 42% (Reparto Genomica)
 - 1 dirigente veterinario 6% fino al 31/5/09 (Reparto Batteriologia Specializzata), poi 10% (Reparto Batteriologia)
 - 3 tecnici di laboratorio biomedico, rispettivamente al 80%, al 55% e all’1%
 - 1 assistente tecnico addetto servizi laboratorio al 90%
 - 3 operatori tecnici sanitari addetti ai servizi di laboratorio rispettivamente al 80%, al 5%, al 1%.
- 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’OEURL 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 2009 descritto nei seguenti punti si riferisce al periodo 01/10/2008-30/09/2009, tenuto conto della periodicità trimestrale della reportistica di controllo di gestione; analogamente il periodo di riferimento della programmazione 2010 è 01/10/2009-30/09/2010.

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.

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 prioritario indirizzo strategico 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.

E' in programma la definizione di un protocollo di intervento in aziende focolaio di leptospirosi bovina in collaborazione con Sezioni Diagnostiche e Osservatori epidemiologici regionali IZSLER, che consenta di rilevare la cessata circolazione dell'infezione al fine di anticipare la revoca delle misure restrittive previste dalla normativa vigente. Finalità ultima, sulla scorta di esperienze attuali e pregresse su focolai di leptospirosi bovina e suina, è la segnalazione al Ministero dei limiti della norma OM 4 settembre 1985 "Profilassi delle leptospirosi animali" in merito alla revoca del sequestro in

animali da reddito (negativizzazione sierologica), dato il perdurare nel tempo di sieropositività.

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) e la metodica impiegata per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante esame colturale (MP01/127). Nel corso dell'anno è stato codificato il metodo di prova 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.

I seguenti MP sono stati trasferiti su richiesta ad altri IIZZSS italiani (art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *b, e*): MP04/019 all'IZS del Mezzogiorno (20/3/09); 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 referenza, 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 referenza e di campo, mediante conservazione sia a temperatura ambiente con passaggi seriali, sia in azoto liquido.

Nel periodo considerato sono state effettuate 6 forniture di colture di *Leptospira* a 3 Istituti Zooprofilattici (IZS del Mezzogiorno 9 ceppi prot. 10819 del 02/04/09; IZS delle Venezie 9 ceppi prot. 30484 del 10/11/08, prot. 17560 del 15/06/09, prot. 23763 del 28/08/09; IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 2 ceppi prot. 16704 del 05/06/09, prot. 19736 del 08/07/09) per un totale di 20 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 Referenza 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.

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) 11.784 sieri con 8 antigeni appartenenti agli 8 sierogruppi più diffusi in Italia, per un totale di 94.272 esami. Si sono rilevate 1.815 positività, talvolta multiple, ai sierogruppi Australis, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Sejroe, Grippotyphosa, Canicola e Ballum in ordine di frequenza.

Nello stesso periodo, da organi e fluidi biologici, sono stati eseguiti 81 esami colturali per ricerca di *Leptospira* e 36 identificazioni con tecnica sierologica. Sono emersi riscontri positivi principalmente per la sierovariante Pomona.

Sono stati inoltre eseguiti esami PCR per la ricerca di leptospire patogene per un totale di 89 campioni, di cui 17 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 IZZS (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *a*). Nel periodo considerato sono stati sottoposti a conferma diagnostica 20 sieri dell'IZS delle Venezie per indisponibilità di idonei antigeni a causa di problemi riscontrati nella preparazione dei terreni di coltura (19 cani, 1 bovino) (prot. 23914 del 31/08/2009, prot. 24718 del 09/09/2009). Sono inoltre stati sottoposti a tipizzazione 11 ceppi isolati (9 da nutrie, 2 da cani) (prot. 17558 del 15/06/2009).

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

E' in programma l'organizzazione di un ring test tra Istituti Zooprofilattici, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *c*) per il prossimo anno. 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 7" 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. 34498 del 10/12/08, prot. 36114 del 7/12/09).

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

Epidemiologia

1) creazione di banca dati;

2) sviluppo e gestione di sistemi informativi;

Si è mantenuta l'adesione al circuito internazionale LeptoNET patrocinato dal WHO - International Leptospirosis Society (ILS) con l'obiettivo di organizzare una raccolta di dati epidemiologici, sia di interesse umano che veterinario, sfruttando la rete WEB.

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.*)

Progetto di ricerca corrente ministeriale IZSLER 22/03 PRC2003022 (26/04/04-25/04/06 prorogato al 24/01/2008) – “Aggiornamento e utilizzo di metodiche biomolecolari per la diagnosi di leptospirosi su ceppi isolati e materiale patologico” (Responsabile Progetto e U.O. 1: S.Tagliabue IZSLER; Responsabile U.O. 2: M.Pacciarini)

E' stata stesa la relazione finale ed inviata al competente Ufficio progetti ricerche per la successiva trasmissione al Ministero della Salute (prot. 18681 del 26/06/09).

Si sta applicando a titolo sperimentale a campioni della routine diagnostica ed ulteriormente sviluppando quanto scaturito dalle ricerche effettuate.

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;

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

Sono stati forniti i seguenti pareri tecnici:

- al Ministero e Regione Veneto prot. 34383 del 09/12/08 in merito alla circolazione dell'infezione in un focolaio di leptospirosi bovina
- al Ministero e Regione Toscana prot. 13818 del 05/05/09 in merito alla circolazione dell'infezione in un focolaio di leptospirosi suina

3) Attività di docenza

Consulenze e collaborazioni europee

(intese anche le collaborazioni in programmi di ricerca)

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.

Natale A., Patregnani T., Tagliabue S., Alborali L., Ferronato A., Bucci G., Toffan C., Ceglie L., Catania S., Bonfanti L. (2009) Gestione di un focolaio di leptospirosi (*L. interrogans* serovar Hardjo) in un allevamento di bovine da latte in Pianura Padana. *Large Animal Review*, 15 (4), 153-157.

Radaelli E., Del_Piero F., Aresu L, Sciarrone F., Vicari N., Mattiello S., Tagliabue S., Fabbi M., Scanziani E. (2009) Expression of major histocompatibility complex class II antigens in porcine leptospiral nephritis. *Vet Pathol* 46 no 5 (2009).

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.

Data
13/01/2010

Il Direttore del CRNL
Tagliabue Dr.ssa Silvia