

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 Specializzata (BA), l’Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Regione Lombardia (OEVR), il Reparto di Biologia Molecolare (BM) e la Sezione Diagnostica di Brescia.

Le risorse umane e strumentali delle Strutture che hanno partecipato alle attività del CRNL nel corso dell’anno 2008 sono le seguenti:

- Il Reparto BA dispone delle attrezzature necessarie per lo svolgimento dell’attività diagnostica colturale, 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° 11 unità a tempo indeterminato, con impegno orario di seguito specificato in percentuale:
 - 1 dirigente biologo 55%,
 - 1 dirigente veterinario 6%
 - 4 tecnici di laboratorio biomedico, rispettivamente al 72%, al 55%, al 2%, al 1%
 - 2 assistenti tecnici addetti servizi laboratorio, rispettivamente al 84% e al 2% (quest’ultimo dal 1/9/08)
 - 3 operatori tecnici sanitari addetti ai servizi di laboratorio rispettivamente al 84%, al 8%, al 2%.
- L’OEVR ha partecipato alle attività del CRNL relativamente a indagini epidemiologiche svolte in allevamenti sieropositivi con:
 - 1 unità a tempo indeterminato (dirigente veterinario al 5%)
- Il Reparto BM 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 BM ha operato a supporto del CRNL con 2 unità a tempo indeterminato:
 - 1 dirigente biologo al 5%
 - 1 tecnico di laboratorio biomedico 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 2008 descritto nei seguenti punti si riferisce al periodo 01/10/2007-30/09/2008, tenuto conto della periodicità trimestrale della reportistica di controllo di

gestione; analogamente il periodo di riferimento della programmazione 2009 è 01/10/2008-30/09/2009.

Obiettivi strategici

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, possibile presenza di anticorpi inibenti la crescita del microrganismo e 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. Ne consegue, come prioritario indirizzo strategico, la sperimentazione per lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche PCR da applicare direttamente al campione biologico, specifiche per le sole leptospire patogene. E' necessario però, al fine di poter disporre di isolati utili per prove di confronto, che non venga abbandonata la pratica dell'isolamento, eventualmente limitandola alla sola attività di ricerca. L'applicazione dell'esame colturale, affiancato alla PCR, che mantiene comunque alcune criticità legate alla conservazione e al trattamento del campione, potrebbe quindi permettere di ottenere una maggiore certezza diagnostica, anche se con conferma tardiva. In mancanza di isolati inoltre, l'identificazione della sierovariante causale è molto difficile.

Metodiche di biologia molecolare, quali PCR/RFLP, attualmente in fase di sperimentazione e perfezionamento potranno dare un contributo per la tipizzazione genetica discriminante a livello di specie, sierovariante o genotipo, in prospettiva di una futura diffusione e trasferimento agli altri Istituti Zooprofilattici (IIZZSS) italiani.

Obiettivo finale sarà dunque l'applicazione routinaria di tali metodiche, in affiancamento ai metodi tradizionali sierologici (agglutinazione microscopica MAT) e possibilmente colturali.

Attività Diagnostica

1) standardizzazione e validazione di metodiche analitiche;

Presso il Centro si utilizza 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 è stata codificata nel corso dell'anno (MP01/127), mentre è in programma l'emissione dei metodi di prova per l'identificazione di *Leptospira* spp. mediante tecnica sierologica e per la ricerca di *Leptospira* spp. mediante PCR in matrici di origine animale. Sono oggetto di approfondimento e sviluppo metodiche biologico-molecolari in prospettiva di una futura diffusione e trasferimento agli altri Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) italiani (art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *b, e*).

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 IZZSS 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 4 forniture di colture di *Leptospira* a 3 Istituti Zooprofilattici (IZS del Mezzogiorno 8 ceppi prot. 4867 del 13/02/08 e 8 ceppi prot. 23861 del 16/09/08; IZS Sicilia 2 ceppi prot. 26679 del 09/11/07; IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 1 ceppo prot. 8403 del 18/03/08) per un totale di 19 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT.

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 IZZSS (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) 12.944 sieri con 8 antigeni appartenenti agli 8 sierogruppi più diffusi in Italia, per un totale di 103.552 esami. Si sono rilevate 1.947 positività, talvolta multiple, ai sierogruppi Australis, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Canicola, Grippotyphosa, Tarassovi e Ballum in ordine di frequenza.

Nello stesso periodo, da organi e fluidi biologici, sono stati eseguiti 212 esami colturali per ricerca di *Leptospira* e 107 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 259 campioni, di cui 101 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 IZZSS, sia in fase di verifica di metodiche che in caso di impossibilità allo svolgimento di alcune prove per indisponibilità di idonei antigeni, a seguito di errati passaggi e contaminazione con altri ceppi. Nel periodo considerato sono stati sottoposti ad esame per conferma diagnostica campioni di altri 2 Istituti Zooprofilattici (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma a) per un totale di 29 sieri sottoposti a MAT e di 2 ceppi tipizzati:

- IZS Mezzogiorno: 2 conferimenti per un totale di 29 sieri (21 di ovino, 4 di cane e 4 di bovino prot 23686 del 12/09/08 e prot 24251 del 19/09/08);
- IZS Venezia: 1 tipizzazione isolato di cane e 1 controllo sierologico Ag (prot. 30746 del 18/12/2007).

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 sta partecipando, 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 ai precedenti circuiti confermano la validità delle procedure e dei controlli applicati agli Ag diagnostici presso il CRNL.

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

Epidemiologia

1) creazione di banca dati;

E' in programmazione lo studio di un sistema per la raccolta dati degli IZZSS a livello nazionale per quanto riguarda l'attività sierologica per il controllo della leptospirosi, finalizzato al soddisfacimento del debito informativo al Ministero.

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 009/2002 PRC2002008 (02/02/04-01/02/06 prorogato al 1/11/2006)- "Studio epidemiologico sulla leptospirosi suina nella Regione Lombardia" (Responsabile Progetto S.Tagliabue; U.O.2: Responsabile V.Tranquillo U.O.3: Responsabile M.Pacciarini)

E' stata stesa la relazione finale ed inviata al competente Ufficio progetti ricerche per la successiva trasmissione al Ministero della Salute (prot. 29493 del 07/12/07).

Relazione sullo stato dei lavori al 30/09/2007 del 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' in corso di stesura la relazione finale. Si sta applicando a titolo sperimentale a campioni della routine diagnostica ed ulteriormente sviluppando quanto scaturito dalle ricerche effettuate.

3) 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 1 giorno di 2 operatori dell'IZS dell'Abruzzo e del Molise (prot. 15402 del 30/05/2008), finalizzata al confronto delle caratteristiche tecniche dei microscopi ottici in campo scuro in uso presso le due strutture ed all'illustrazione delle opportune regolazioni per la lettura microscopica (su piastra e vetrino) del metodo di prova MAT.

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

- Corso di formazione: "Nuovi approcci a un vecchio problema: la leptospirosi", IZS delle Venezie, Legnaro (PD), 20 settembre 2008, (comunicazioni: S. Tagliabue "Aspetti di sanità animale: diagnosi di laboratorio delle leptospirosi animali con particolare riferimento agli animali d'affezione"; L. Alborali "Aspetti di sanità animale: diagnosi clinica, anatomo-patologica e controllo della leptospirosi nel bovino e nel suino").

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 pareri tecnici all'IZS delle Venezie in merito alla gestione di un focolaio di leptospirosi in bovine da latte; resta problema aperto (discusso nell'ambito della comunicazione L. Bonfanti "Aspetti legislativi: il regolamento di polizia veterinaria e il trattamento di un focolaio di leptospirosi" il 20 settembre 2008 a PD) l'attuazione della norma OM 4 settembre 1985 "Profilassi delle leptospirosi animali" in merito alla revoca del sequestro in animali da reddito per il perdurare nel tempo di sieropositività.

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)

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

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 Leptosirosi (indirizzo: <http://www.bs.izs.it/Referenza/Lepto/Lepto.htm>). Tale sito viene aggiornato periodicamente.

Data
27/11/08

Il Direttore del CRNL
(Reparto Batteriologia Specializzata)
Tagliabue Dr.ssa Silvia