

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

L’attività svolta dal Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi (CRNL) presso la Sede Centrale dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna (IZSLER) nel corso dell’anno 2007 è parzialmente inserita in progetti di ricerca corrente (PRC) finanziati dal Ministero della Salute, sviluppati in collaborazione con l’Osservatorio Epidemiologico Veterinario della Regione Lombardia (OEVRL) e con il Reparto di Biologia Molecolare (BM).

Risorse umane e strumentali delle Strutture partecipanti alle attività del CRNL:

- Il Reparto Batteriologia Specializzata (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%

5 tecnici di laboratorio biomedico, rispettivamente al 72%, al 55%, al 2%, al 2%, al 1%.

1 assistente tecnico addetto servizi laboratorio al 84%

3 operatori tecnici sanitari addetti ai servizi di laboratorio rispettivamente al 84%, al 8%, al 2%.

Il personale non dipendente/a contratto del Reparto BA, partecipante al CRNL, finanziato interamente da progetti di ricerca corrente, ha compreso n° 1 unità interamente dedicata:

1 borsista biologo al 100% (6 mesi), finanziato interamente da PRC 2003

- L’OEVRL ha partecipato alle attività del CRNL con:

1 unità a tempo indeterminato (dirigente veterinario al 5%)

- Il Reparto di Biologia Molecolare (BM) IZSLER mette a disposizione strutture, attrezzature e competenze a supporto diagnostico ed opera, nell’ambito dei progetti di ricerca attivati, 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%.

Il piano d’attività 2007 descritto nei seguenti punti si riferisce al periodo 01/10/2006-30/09/2007, tenuto conto della periodicità trimestrale della reportistica di controllo di

gestione; analogamente il periodo di riferimento della programmazione 2008 è 01/10/2007-30/09/2008.

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 microorganismo e sviluppo di contaminanti. I lunghi tempi di replicazione del microorganismo 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.

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

Altro importante obiettivo consiste nel mantenere monitorati i ceppi attualmente in uso come antigeni MAT presso i laboratori locali; tale obiettivo è stato perseguito avvalendoci anche delle informazioni ottenute dagli IZZSS attraverso il questionario allegato al ring test nazionale concluso nel 2007.

Nell'ambito del PRC 2002008 "Studio epidemiologico sulla leptospirosi suina nella Regione Lombardia" si è posta l'attenzione sulla definizione della soglia di positività da considerare nel metodo sierologico MAT, tentando una prima razionalizzazione della risposta a livello nazionale, tenuto conto dell'interpretazione da attribuire ai risultati ottenuti e delle indicazioni fornite nella O.M. (v. relazione finale).

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 l'isolamento colturale e altre tecniche

identificative biologico-molecolari, attualmente non accreditate, sono oggetto di approfondimento e sviluppo nell'ambito di progetti di ricerca corrente ministeriali, in prospettiva di una futura diffusione e trasferimento agli altri Istituti Zooprofilattici (IIZZSS) italiani.

2) produzione e distribuzione di reagenti;

Il CRNL reperisce, produce e detiene i reagenti di riferimento, nella fattispecie ceppi da utilizzare come antigeni (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *d*). 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; ha inoltre prodotto (in collaborazione con il Centro Allevamento e Sperimentazione Animale IZSLER), controllato e conservato per uso interno, utilizzando sieri di riferimento di provenienza Royal Tropical Institute (KIT) - Amsterdam (Laboratorio di Riferenza OIE, FAO, OMS per la leptospirosi), sieri di riferimento secondari verso gli 8 sierogruppi più diffusi in Italia e normalmente indagati a scopo diagnostico (MAT). Si è sospesa la fornitura esterna di tali sieri per l'eccessivo onere derivante dall'attività di produzione e certificazione.

Nel periodo considerato sono state effettuate 7 forniture di colture di *Leptospira* a 6 Istituti Zooprofilattici (IZS Puglia e Basilicata 3 ceppi prot. 7393 del 16/03/07; IZS del Mezzogiorno 8 ceppi prot. 9679 del 13/04/07; IZS Umbria e Marche 8 ceppi prot. 10591 del 26/04/07 e 8 ceppi prot. 20522 del 14/09/07; IZS Sicilia 8 ceppi prot. 12157 del 18/05/07; IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 1 ceppo prot. 13421 del 04/06/07; IZS Lazio e Toscana 8 ceppi prot. 20521 del 14/09/07) per un totale di 44 colture controllate, da impiegarsi come antigeni MAT.

Per i ceppi di derivazione KIT Royal Tropical Institute di Amsterdam, nel rispetto dei compiti del CRNL (secondo l'art. 2 del D.M. 4 ottobre 1999, comma *d*), siamo stati autorizzati dal Dr. Hartskeerl (prot. 2124 del 23/1/06) alla cessione a titolo gratuito agli altri IIZZSS, 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) 16.751 sieri con 8 antigeni appartenenti agli 8 sierogruppi più diffusi in Italia, per un totale di 134.008 esami. Si sono rilevate 1.574 positività, talvolta multiple, ai sierogruppi Australis, Pomona, Sejroe, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Ballum, Canicola e Tarassovi in ordine di frequenza.

Nello stesso periodo, da organi e fluidi biologici, sono stati eseguiti 70 esami colturali per ricerca di *Leptospira* e 26 identificazioni con tecnica sierologica. Sono emersi riscontri positivi per la sierovariante Pomona.

Sono stati inoltre eseguiti esami PCR per un totale di 185 campioni, di cui 31 positivi (129 di cinghiali, di cui 10 positivi; 56 di altre specie animali, di cui 21 positivi).

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

Sono inoltre stati sottoposti ad esame per conferma diagnostica campioni di altri 2 Istituti Zooprofilattici (secondo l'art. 2 comma *a*) per un totale di 24 sieri sottoposti a MAT:

- IZS Abruzzo e Molise: 5 conferimenti per diagnosi sierologica su un totale di 6 sieri (1 siero di cane prot. 32650 del 23/11/06, 1 siero di tasso prot. 5090 del 23/02/07, 2 siero di cavallo prot. 13819 del 08/06/07, 1 siero di orso prot. 15276 del 27/06/07, 1 siero di cavallo prot. 15804 del 03/07/07).
- IZS Lazio e Toscana: 1 conferimento per un totale di 18 sieri (10 sieri di cane e 8 sieri di cavallo prot 20387 del 13/09/07).

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

E' stato organizzato un ring test tra Istituti Zooprofilattici, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) (secondo l'art. 2 comma c), (lettera invio campioni prot. 35268 del 18/12/06; lettera invio relazione conclusiva prot. 16750 del 13/07/07).

Sono stati inviati 4 sieri per l'esecuzione dell'agglutinazione microscopica (MAT), da gestire alla stregua della normale *routine* diagnostica utilizzando antigeni rappresentativi dei sierogruppi normalmente ricercati, nel rispetto delle linee guida dettate dall'OIE.

Il siero negativo è stato da tutti confermato come negativo. Relativamente ai sieri positivi tutti gli IZZSS hanno ottenuto una corretta identificazione della sierovariante coinvolta (nessun risultato falsamente negativo). I risultati della prova sono stati elaborati (mediana) a partire dal titolo soglia 1/100.

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

Nel corso dell'anno 2007 il CRNL ha partecipato, all' "*International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis MAT -Round 6*" 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 (invio risultati prot. 18051 del 01/08/07). I risultati delle prove confermano la validità delle procedure e dei controlli applicati agli antigeni diagnostici presso il nostro Centro (e-mail Dr. Chappel del 13/09/07); si è in attesa del report cartaceo con le elaborazioni dei risultati.

Il CRNL intende partecipare all' "*International Proficiency Testing Scheme for the Leptospirosis MAT -Round 7*" sulla prova di agglutinazione microscopica (MAT), che sarà programmato presumibilmente per i primi mesi dell'anno 2008.

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 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).

PRC2002102 (01/09/03-31/08/05 prorogato al 30/04/2007) – "Monitoraggio sanitario della presenza di tubercolosi e leptospirosi nel cinghiale e tubercolosi nei cervidi" (Responsabile Progetto: R.Orusa IZS PLV 02/02; Responsabile U.O.2 IZSLER: A.Gaffuri; collaborazione S. Tagliabue, M. Pacciarini, L. Alborali)

E' stata stesa ed inviata al Responsabile della U.O.2 relazione finale della parte di nostra competenza "Leptospirosi" (e-mail del 20/07/07).

Il monitoraggio della presenza di Leptospirosi nei cinghiali, condotto su campioni prelevati da cacciatori nel corso di quattro stagioni venatorie (2002-2005), è stato effettuato principalmente mediante indagine sierologica; in alcuni casi campioni di visceri (reni ed organi dell'apparto genitale) sono stati sottoposti ad analisi batteriologica e PCR.

Sono stati esaminati 884 sieri, di cui 121 positivi, talvolta con positività multiple, a partire dal titolo 1/100. La sierovariante rilevata più frequentemente con 106 positività su 143 positività totali (74%) è la Bratislava del sierogruppo Australis; questo antigene per la maggior parte dei campioni positivi (83/106 pari al 78%) ha rivelato titoli non superiori a 400. In ordine di frequenza le altre sierovarianti rilevate sono Pomona (13%), Grippotyphosa (8%) e Icterohaemorrhagiae (5%).

Gli esami batteriologici condotti su organi (49 esami colturali) hanno sempre dato esito negativo; in PCR (27 reni, 7 testicoli, 2 uteri e 1 linfonodo selezionati sulla base di sierologia positiva) sono state riscontrate delle positività (3/37) esclusivamente nei reni, uno solo dei quali presentava lesioni riferibili.

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 un lavoro di valutazione di un sistema diagnostico universale, basato su metodiche di amplificazione del DNA genomico (PCR), per il rilevamento delle leptospire patogene in campioni biologici. Sono stati stabiliti ed applicati, principalmente su suini, cani e cinghiali, protocolli di estrazione per le principali tipologie di campioni biologici (urina e tessuto renale).

Sono inoltre allo studio tecniche di identificazione su DNA amplificato da campione biologico e da ceppo isolato, in considerazione dell'importanza di stabilire la diffusione di sierovarianti patogene di *Leptospira*, comprese quelle non ricercate attualmente in routine con metodi sierologici (MAT) in quanto non note in Italia.

In particolare si sta affrontando lo studio di reazioni PCR su ceppi di riferimento, isolati e direttamente su campioni biologici affrontando 3 steps.

1° step: PCR universale che rilevi le leptospire patogene

1. Applicazione di kit PCR basato sull'uso di una coppia di primers Adia214-Adia 215 (Branger C. *et al.*, 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis-associated protein-1. FEMS Microbiology Letters, 243, 437-445).

2° step: riconoscimento delle genospecie mediante PCR:

1. PCR con primers G1 e G2 (Gravekamp C. *et al.*, 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol., 139, 1691-1700); condotta in associazione a RFLP consente di stabilire uno schema differenziale semplificato per le diverse genospecie, basato sull'uso in successione di alcuni degli enzimi selezionati;
2. Per *L.kirschneri* utilizzo di primers BIM64I-BIM64II (Gravekamp C. *et al.*, 1993. detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol., 139, 1691-1700);

3° step: riconoscimento delle sierovarianti con PCR/RFLP:

1. Nell'ambito di *L.interrogans* con primers derivati da pL590 (Savio M. L., Rossi C., Fusi P., Tagliabue S., Pacciarini M. L., 1994. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J. Clin. Microbiol. 32 n°4, 935-941);
2. Nell'ambito di *L.borgpetersenii* con primers derivati da pT126 (Pacciarini M. L., Savio M. L., Donini G., Tagliabue S., 1993. The search for improved methods for diagnosing leptospirosis: the approach of a laboratory in Brescia, Italy. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 12 n°2, 647-663; Moratto D., 1994-1995. Caratterizzazione di un elemento ripetuto isolato dal genoma di *Leptospira borgpetersenii* sierovariante tarassovi. Università degli Studi di Milano, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Tesi di Laurea in Scienze Biologiche);

Sono state effettuate prove di sensibilità per confrontare le PCR applicate come screening e per scopi identificativi.

E' stato introdotto l'impiego di Taq polimerasi di tipo Hot Start (Taq Gold e HotStar) per favorire la sensibilità di alcune PCR.

La programmazione 2008 prevede la continuazione del progetto di ricerca attivo e l'applicazione di quanto scaturito dalle ricerche effettuate.

2) Progetti di ricerca finanziati da altri Enti (titolo, stato dell'arte dei lavori, ecc.)

Piano di monitoraggio sanitario della fauna selvatica dell'arco alpino lombardo e presenza di agenti zoonosici su carcasse conferite alle Sezioni Diagnostiche IZSLER delle province di Bergamo, Brescia, Como-Varese e Sondrio-Lecco (Convenzione IZSLER – Regione Lombardia stipulata in data 11/05/2006, n. 8928/RCC di durata annuale) E' stata stesa ed inviata al Responsabile scientifico la relazione finale (e-mail 06/08/07).

Sono stati esaminati, mediante l'applicazione della MAT 635 sieri (492 cinghiali, 16 lepri, 50 cervi, 49 camosci, 25 caprioli, 2 volpi, 1 scoiattolo) di animali abbattuti nel corso della stagione venatoria autunnale 2006 per la ricerca di anticorpi anti-*Leptospira*.

Relativamente al cinghiale, la prevalenza del sierogruppo Australis, rappresentato dalla sierovariante Bratislava, è risultata pari al 5,8%. Su 39 positività (talvolta multiple), 29 (74,3%) sono da attribuire al sierogruppo Australis. I relativi titoli risultano distribuiti per la maggior parte tra 1/100 e 1/200; solo in due casi si sono rilevati titoli pari a 1/1600. In ordine di frequenza, sul totale delle positività rilevate, le altre sierovarianti sono Pomona (10,3%), di cui si segnalano 2 casi con titolo 1/400, Ballum (5,1%), Icterohaemorrhagiae (5,1%), Grippotyphosa (2,6%) e Tarassovi (2,6%). Per quanto riguarda gli altri animali selvatici esaminati solo 1 siero di cervo è risultato positivo per la sierovariante Grippotyphosa (titolo 1/1600); i restanti 142 sieri esaminati sono risultati negativi (49 cervi, 49 camosci, 25 caprioli, 16 lepri, 2 volpi, 1 scoiattolo).

I 29 esami colturali (26 reni e 3 urine) eseguiti hanno dato esito negativo.

Su 129 campioni (116 reni, 10 urine, 2 milze e 1 linfonodo) esaminati in PCR, 10 sono risultati positivi per leptospire patogene (8 reni, 1 urina e 1 linfonodo).

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 comma f): visita formativa di 3 giorni di un operatore dell'IZS della Sardegna (prot. 17404 del 23/07/07), finalizzata all'apprendimento di tecniche di: 1) mantenimento delle colture, preparazione e controllo degli antigeni MAT per la diagnosi sierologica di leptospirosi; 2) lettura microscopica (su piastra e vetrino), metodo di prova MAT.

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

- Convegno "Nuove tendenze nelle infezioni del cane" con la, Università degli Studi di Teramo 26/10/06 (comunicazione "La leptospirosi del cane: vecchia malattia, vecchi problemi").

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

E' stata tenuta la lezione "Leptospirosi: diagnosi di laboratorio" al corso formativo aziendale ECM per tecnici di laboratorio nei giorni 31/10/06 e 5/12/06.

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*)

E' in via di pubblicazione l'articolo "Attività del Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi".

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

E' attualmente in via di pubblicazione la versione in lingua inglese.

Data
10/12/07

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