DIPARTIMENTO DI RICERCA
REPARTO BIOLOGIA MOLECOLARE
Relazione del Dirigente Responsabile Dr. Lorenzo Capucci

Laboratorio di Diagnostica e Ricerca Molecolare

Attività OGM

Nel 2007 sono stati analizzati 359 campioni tramite l'esecuzioni di 1539 reazioni PCR (analisi qualitative) e 130 reazioni di PCR Real-Time (analisi quantitative), con un decremento del 6% rispetto al 2006.

L'84% dei campioni analizzati rientrano nel piano di monitoraggio dei mangimi (campioni ufficiali), l'11% dall'attività di autocontrollo da parte delle imprese private, il 4% dai circuiti interlaboratorio, le validazione dei metodi di prova e i controlli interni delle prove diagnostiche. Rispetto al precedente anno si segnala un calo sostanziale dei campioni in autocontrollo, meno 60%, contro un incremento del 24% degli istituzionali. La quasi totalità dei campioni rientrano nella categoria degli alimenti zootecnici suddivisibili per composizione in: 41% solo mais, 13% solo soia e 42% mangimi contenenti entrambe. Il 4% dei campioni esaminati rientrano nell'ambito dell'alimentazione umana.

Le analisi hanno evidenziato la presenza di OGM nel 17% dei campioni ufficiali esaminati, di cui il 8% con quantità oltre le soglie di legge. Nel complesso, rispetto al 2006 si segnala un calo del 36% di campioni positivi OGM, ma soprattutto di un calo dell'80% di quelli con esito irregolare (presente sopra i limiti di legge). Nei campioni risultati positivi la varietà di soia identificata è stata la Roundup Ready.

Dei 40 campioni conferiti da privati, il 45% sono risultati positivi e tutti per presenza di soia transgenica Roundup Ready, ma con solo un campione che superavano i limiti di legge. Rispetto al precedente anno si denota che non varia la percentuale dei positivi ma che si riduce quasi a zero la presenza di campioni irregolari (dato simile a quello sui campioni istituzionali). Ciò depone per una "assestamento" del sistema verso la regolarizzazione ed il corretto uso dell'etichettatura dei prodotti.

Nel corso del 2007 il laboratorio ha concluso l'attività di validazione della prova di analisi quantitativa tramite PCR Real-time per la determinazione percentuale della varietà di soia transgenica Roundup Ready, ha codificato il metodo relativo (MP 09/007) e ne ha chiesto l'accreditamento.

Il laboratorio ha partecipato anche per il 2007 a 6 prove del circuito interlaboratorio internazionale FAPAS GeMMA Scheme ed ad una prova organizzata dal centro di Referenza OGM dell'IZS di Roma, per il controllo delle propria performance nell'applicazione del MP 09/002, con esito conforme. Da notare che il circuito internazionale ha permesso di verificare anche le performance del metodo di prova interno MP 09/007 verso più varietà di mais transgenico.

Nel 2007 il laboratorio è stato visitato dal SINAL per il metodo accreditato MP 09/002 (PCR OGM qualitativa) con esito positivo.

Attività in sanità animale

Per quanto riguarda la parte diagnostica**,** il laboratorio ha eseguito 8360 PCR virologiche con un incremento complessivo del 11%. Le diagnosi riguardano il Circovirus (1973), il virus della PRRS (6269) e della Blue Toungue (118). Da sottolineare il ruolo di consulenza tecnico-scientifica continua ricoperto dalla struttura per l'organizzazione, l'implementazione ed il sostegno di attività PCR esterne ad essa. A ciò si aggiunge anche la collaborazione /consulenza per gli uffici amministrativi (scelte e acquisti di reagenti e materiali per biologia molecolare per il magazzino IZSLER) e l'impegno nella formazione del personale (corso pratico ECM sulla PCR per tecnici IZSLER).

Durante il 2007 il laboratorio ha standardizzato, su richiesta del Reparto di Virologia Specializzata, una Real Time quantitativa per l'influenza aviaria. Il laboratorio ha esaminati per la prima parte del 2007 i campioni risultati positivi al laboratorio di virologia in RT-PCR mediante Real-time.

Nell'anno l'impegno del laboratorio nell'ambito della consulenza / collaborazione con l'ufficio acquisti e con il Sistema Qualità si è significativamente e forse esageratamente intensificato, anche per l'inserimento dei dirigenti del laboratorio in vari gruppi e commissioni interne.

Laboratorio di analisi genomiche

Il laboratorio svolge attività di servizio interno per laboratori della sede e delle sezioni, oltre che per attività di ricerca interne al reparto.

I campioni analizzati nel 2007 nell'ambito del servizio sono stati 686 con un incremento del 60% rispetto la 2007. Di questi il 46% di PRRS ed il 18% di IBV. Larga parte dei campioni di PRSV sono stati richiesti dalla Sezione di Reggio Emilia seguita da quelle di Brescia, Mantova e Lodi, mentre l'IBV è richiesto dalla Sezione di Forlì. Nel complesso l'attività risulta in linea con quella degli anni precedenti, salvo un calo significativo nei conferimenti da parte del dipartimento alimenti.

I progetti hanno riguardato i virus soprattutto il virus della PRRS e dell'Influenza Aviaria e Suina. Altri virus oggetto di ricerca sono stati il BVDV, il SIV ed il Chikungunya. Di questi ultimi due virus è stato sequenziato l'interno genoma. In totale sono stati sequenziali 733 campioni, oltre il doppio del precedente anno.

Centro di Referenza Nazionale Tubercolosi Bovina

Premessa

Nel 2007 sono stati trattati dall'IZSLER circa 1500 campioni di linfonodo/organo per l'isolamento di micobatteri. I campioni provengono da bovino (20%) , cinghiale (40%), cervo (20%), da altre varie specie selvatiche (4%), ittiche ed aviarie (8%). L'attività riguarda per il 10% campioni inviati da altri Istituti (IZS Puglia-Basilicata, IZS Venezie, IZS Lazio-Toscana). L'incremento e variazione dell'attività diagnostica rispetto all'anno precedente si deve principalmente all' attivazione di piani di monitoraggio della fauna selvatica nella regione Lombardia, all'attivazione del piano nazionale per la sorveglianza della CWD nel cervo, all'incremento di campioni inviati dall'IZS della Puglia-Basilicata a seguito dell'Ordinanza Ministeriale relativa a "Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina e bufalina, brucellosi ovi-caprina, leucosi in Calabria, Campania, Puglia e Sicilia".

Diagnostica effettuata presso il reparto

105 ceppi appartenenti al gruppo MtbC sono stati analizzati mediante saggio PCR/RFLP del gene Gyrb per l'identificazione di Mycobacterium bovis e Mycobacterium caprae. (Metodo PCR accreditato SINAL MP09/004, per l'identificazione dei ceppi).

37 ceppi atipici appartenenti al genere Mycobacterium spp. sono stati identificati mediante sequenziazione della regione dell'RNAr 16s nelle seguenti specie.

153 ceppi di M. bovis/M. caprae isolati nei territori di nostra competenza o ricevuti da altri IIZZSS (IZS Perugia, IZS Roma, IZS etc.) sono stati tipizzati mediante Spoligotyping completo su filtro e mediante analisi VNTR dei loci ETRA-E.

Produzione e distribuzione di reagenti

Il CRNTB nel periodo di riferimento considerato ha mantenuto e controllato una collezione di ceppi di referenza e di campo, conservati liofilizzati e congelati. Inoltre sono stati prodotti e purificati i seguenti antigeni ricombinanti: Esat-6 e CFP10 forniti all'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (sede di Torino) e all'IZS Umbria e Marche (sede di Perugia).

Tali antigeni ricombinanti ottenuti nel corso del progetto PRC2001008 (Valutazione di procedure innovative per l'isolamento e la caratterizzazione di Mycobacterium bovis e per l'evidenziazione della reattività immunitaria nel bovino) si stanno impiegando in parallelo alla tubercolina tradizionale nel test del gamma - interferon sia in allevamenti ufficialmente indenni che nel corso di focolai di TB.

Ring test di laboratorio

Il CNRTB ha organizzato per gli IZS un test interlaboratorio sull'isolamento di M. bovis in terreni liquidi e/o solidi i cui risultati sono stati presentati in occasione della giornata d'incontro con gli IIZZSS "Workshop interistituti sui metodi di isolamento ed identificazione dei micobatteri" in data

28 Settembre 2007 a Brescia. Inoltre ha aderito a due ring test internazionali. Un primo sul rilevamento di micobatteri del gruppo MtbC in campioni clinici. Un secondo, eseguito presso il laboratorio del reparto, sulla tipizzazione genetica di ceppi di M. bovis mediante spoligotyping ed analisi VNTR, organizzato nell'ambito della Co-ordination Action (SSPE-CT-2004-501903) of Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases (VENoMYC). I risultati ottenuti sia con ibridazione su filtro che con PCR-ELISA hanno mostrato una buona concordanza con i profili genetici di riferimento e saranno presentati in occasione del prossimo incontro del gruppo Venomyc che si terrà a Cambridge nel 2008.

Epidemiologia

Implementazione banca dati molecolare

La banca dati "Bionumerics" contiene le caratterizzazioni ottenute mediante Spoligotyping e VNTR dei ceppi di M. bovis isolati a partire dal 2000 nel territorio di competenza dell'IZSLER (PRC2003014 "Progettazione e sviluppo di una banca dati dei profili genetici di Mycobacterium bovis a supporto delle indagini epidemiologiche condotte in focolai di tubercolosi bovina"). Nel 2007 la banca, oltre ad essere stata aggiornata con i dati di routine, Inoltre la banca dati è stata implementata con l'inserimento dei ceppi isolati dal 2002 al 2006 nelle regioni Marche, Umbria, e Campania e dei ceppi isolati dal 2005 al 2006 in Piemonte, dai ceppi provenienti dalla Sardegna, Puglia, e Calabria.

Sviluppo e gestione di sistemi informativi

Al fine di raccogliere ed analizzare i dati delle attività di sorveglianza della TB, il CNRTB ha definito un progetto per lo sviluppo di un sistema informativo integrato per la gestione dei piani di sorveglianza nazionale.

Il sistema sarà accessibile attraverso un dominio di secondo livello. Il sito web TB comprenderà settori consultabili liberamente da parte del pubblico e sezioni con accesso limitato consultabili solo da parte della Direzione Generale dei Servizi Veterinari (Ministero della Salute), dei laboratori IIZZSS e dei Servizi Veterinari Regionali.

Il sistema fornisce sia informazioni generali sulla TB che un completo archivio per l'attività di sorveglianza della TB degli ultimi 5 anni.

Sistema informativo geografico (GIS)

Il sito web è stato arricchito con l'inclusione di un sistema GIS integrato con i dati provenienti da diverse fonti (dati di laboratorio, dati epidemiologici, anagrafe bovina) al fine di meglio analizzare i dati di sorveglianza e mostrare i risultati delle attività.

Attività di ricerca

Progettazione e sviluppo di una banca dati dei profili genetici di *Mycobacterium bovis* a supporto delle indagini epidemiologiche condotte in focolai di tubercolosi bovina (PRC2003014).

Il progetto si è concluso il 30 Agosto 2007. I principali risultati ottenuti tenendo conto degli obiettivi del progetto possono essere riassunti in:

Analisi dei loci VNTR di tutti i ceppi di M. bovis isolati nel territorio di nostra competenza negli ultimi 3 anni.

24 nuovi loci (MIRU, QUBs) sono stati valutati per la loro capacità differenziativa utilizzando un pannello di 100 ceppi M. bovis BCG-Like isolati in Italia in focolai non correlati tra loro e localizzati in diverse zone geografiche. I risultati hanno portato alla selezione di un gruppo di 9 marcatori con capacità differenziative (Diversità genotipica di 99,4) molto elevate; fra questi alcuni si sono mostrati informativi anche per la differenziazione genetica di ceppi di M. bovis isolati da focolai in Irlanda, Belgio e Francia.

Inserimento ed assemblaggio delle informazioni genetiche di tutti i ceppi isolati nel Nord Italia e loro elaborazione mediante "cluster analysis".

La banca dati Bionumerics è stata aggiornata con i dati spoligotyping e VNTR di 266 ceppi di M. bovis isolati nel 2006, di diversa provenienza geografica.

Inoltre a partire dal settembre 2006 tutti i ceppi isolati nel nostro territorio od inviati da altri IZS per tipizzazione molecolare, sono stati caratterizzati con il nuovo pannello di 8 marcatori.

Integrazione dei dati epidemiologici tradizionali con le caratteristiche genetiche e microbiologiche dei ceppi di M. bovis isolati nel territorio di nostra competenza.

La raccolta dei profili genetici dei ceppi di M. bovis ottenuta con lo spoligotyping e con l'analisi VNTR ci ha permesso, fra le altre cose, di verificare retrospettivamente alcune ipotesi di correlazioni epidemiologiche esistenti tra alcuni focolai della regione Lombardia ed Emilia-Romagna. La conferma della presenza di M. caprae in Lombardia, Veneto, Sardegna, Campania, Lazio, Umbria, Puglia e Calabria talvolta caratterizzati da spoligotipi non riscontrati in altri paesi europei.

Il 2 luglio 2007 si è attivato il progetto di ricerca corrente **PRC2006001** dal titolo "*Messa a punto e attivazione di modelli di sorveglianza epidemiologica e gestione del rischio a livello di produzione primaria e di trasformazione in prodotti tradizionali del territorio*" che prevede un sottoprogetto specifico per il Centro di Referenza di Brescia della Tubercolosi: messa a punto e standardizzazione di una reazione PCR idonea al rilevamento di MtbC in matrici biologiche e alimentari (latte/linfonodi ecc.), combinando un sistema di concentrazione/estrazione di micobatteri nel campione con un sistema di rilevazione basato su PCR-ELISA, atti ad amplificare il segnale migliorandone la sensibilità/specificità.

Per quanto riguarda la parte di ***aggiornamento e formazione professionale*** del CNR, lo stesso ha organizzato il 28 Settembre 2007: Workshop per gli IZS sui metodi di isolamento dei micobatteri. Ed ha partecipato 28mo congresso annuale della European Society of Mycobacteriology 1-4 Luglio 2007, Atene, Grecia.

Ancora ha partecipato nell'ambito del progetto di Co-ordination Action (SSPE-CT-2004-501903) of Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases (VENoMYC) ai meeting: WP8 "VNTR/MIRUs and DVR spoligotyping for M. bovis typing", 19-22 Ottobre 2006 Toledo, Spain in cui è stato presentato il seguente lavoro: Molecular typing of M. bovis strains isolated in Italy. WP10 "Functional Genomycs of Mycobacteria", Cambridge, UK, 16-19 Settembre 2007.

Partecipazione al gruppo di lavoro EFSA "Working Group Meeting on Tuberculosis testing in Deer" per la stesura di linee guida per "Tuberculosis testing in deer" su Annex to the EFSA Journal (2006) XXX, 1-XX; Linee guida per la Diagnosi di Laboratorio della TBC nel cervo. In tutto 9 incontri in diverse nazioni europee.

Laboratorio di Immunobiochimica e proteomica

Il laboratorio di immunobiochimica opera nel settore della purificazione, modificazione e studio delle proteine sia su attività propria, sia come servizio interno per altri laboratori. Il laboratorio opera soprattutto nei i settori delle produzioni e della ricerca e include un'unità sperimentale di "proteomica".

Produzioni:

1) su richiesta delle Sezioni diagnostiche sono state fornite 42 vials (0,25 ml) di anticorpi anti-specie coniugati con FITC. Il livello di produzione rispetto al 2006 si è ulteriormente ridotto segno di una lento abbandono di determinate tecnologie.
2) su richiesta delle Sezioni diagnostiche e reparti della Sede sono stati forniti 90 ml di anticorpi anti-specie (in larga parte anti IgG di topo) o anti-virus coniugati con HRP (sopratutto anti Influenza), con un decremento di circa il 10% rispetto la precedente anno.

Quale altra attività di servizio sono stati purificati sieri ed anticorpi per il laboratori vari e degli antigeni ricombinanti per il Centro di Referenza della Tubercolosi.

L'attività di proteomica è continuata anche nel 2007 e si basa sempre sulla collaborazione con il consulente esterno. Sotto la nuova voce Darwin "identificazione proteine", sono state eseguite 140 determinazioni, di cui una parte significativa da clienti esterni a pagamento. E' stato approvato un

progetto triennale di sviluppo che dovrebbe portare ad un incremento dell'attività ed ad una crescita formativa del personale interno.

Centro di Referenza OIE per la "Rabbit hemorrhagic disease" (RHD) e la boratorio ricerca e sviluppo per la virologia dei lagomorfi

La maggior parte dell'attività del laboratorio è basata sulla **fornitura di kit diagnostici** in Italia come pure all'Estero. I kit sono stati inviati in Spagna, Polonia, Slovacchia, Stati Uniti, Australia, Nuova Zelanda, Ungheria ad Istituti Zooprofilattici (Roma, Torino, Palermo, Padova, Treviso, Perugia, Sassari, Bologna, Parma, Napoli) oltre che a ditte che si occupano dell'importazione di lepri dai paesi dell'est (Romania, Ungheria). Una certa attività diagnostica è connessa a quella del Centro di Referenza nazionale per le malattie virali dei lagomorfi, di secondo livello per RHD e EBHS e per la sierologia e virologia della myxomatosi.

Produzioni:

Kit Sirologia RHD 38, kit sierologia EBHS 40, kit virologia RHD-EBHS 53.

Rispetto al 2006 c'è stato un incremento di circa il 30% nella fornitura complessiva dei kits.

Diagnosi:

Sierologia: RHD 1843 esami complessivi, Mixomatosi 208 esami. Virologia: RHD-EBHS 14 esami in Elisa e 33 in western blotting (conferme di esami laboratorio MSE), mixomatosi 41 (compresi isolamenti su cellule). ELISA Virus delle api DWV (ali deformi) 137 esami. Il volume di attività è in linea con quella del 2006, salvo un significativo aumento nel numero di analisi per DWV.

Nel 2007 è continuata la collaborazione con il Dr. Brian Cooke e sui collaboratori sull'epidemiologia dell'RHD in Australia. In aggiunta si è collaborato con gli USA (Plum Island) per la tipizzazione dei ceppi isolati nei diversi stati americani.

Laboratorio diagnosi e ricerca TSE

L'attività **di sorveglianza "attiva"** mediante test rapidi ha evidenziato un calo del 10% circa con 180600 di test eseguiti sui bovini. In realtà ciò è dipeso da un periodo di riorganizzazione di taluni macelli che hanno provvisoriamente spostato più campioni sul laboratorio di Modena dell'IZSLER. Per la prima volta dall'avvio della sorveglianza attiva (2001) il laboratorio non ha registrato alcun caso di positività per BSE.

Per quanto riguarda la **sorveglianza Scrapie**, si è registrato un ulteriore incremento del numero dei campioni, per un totale di 6660 test, in larga parte effettuati su pecore regolarmente macellate.

Sono stati individuati due casi di scrapie classica in greggi di pecore Bergamasche. L'eradicazione dei focolai ha comportato l'abbattimento di quasi 2000 capi.

Durante il 2007 si è confermato il riscontro di un certo numero di esiti falsi positivi connessi ad una minore specificità del test ELISA LIA. Per accordo fra Ministero e CEA, i casi sono stati inviati al CEA, previa analisi negativi in western blotting, senza attivare le procedure previste in caso di positività presso l'allevamento colpito.

La parte di accettazione del laboratorio è stata impegnata significativamente per la parte di revisone di numerosi documenti (verbali e RdP) causa un numero elevato di accettazioni da rivedere poiché con dati non congrui emersi durante la verifica del CEA sul database (errori in diminuzione rispetto agli anni precedenti). Al di là di errori di inserimento dati effettuati dallo stesso laboratorio, comunque entro il limite del fisiologico, nella maggior parte dei casi gli stessi sono da attribuirsi alla frettolosa compilazione dei verbali dei morti o a problemi legati al sistema di anagrafe.

Il **ring test** annuale organizzato dal CEA di Torino e a cui il laboratorio ha partecipato, ha dato un esito positivo. Il laboratorio è stato oggetto di **ispezione SINAL** con esito positivo.

Durante il 2007 c'è stato un impegno diretto da parte del Dirigente del laboratorio, per la partecipazione alla gara nazionale per la selezione di nuovi test BSE e Scrapie, sia per la parte di preparazione dei capitolati che per la partecipazione alla commissione di selezione.

Il **progetto di ricerca** 2002/3 sulla Trasmissione sperimentale al bovino per via intracerebrale della BSE (ceppo italiano) e della BASE (TSE atipica del bovino) terminato lo scorso anno, dopo varie richieste di revisione è stato accetto sulla rivista Plos Pathogens e pubblicato nel Maggio 2008.