Incontro Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano
Mantova, 5 aprile 2019

Mario D'Incau
Centro di Referenza Nazionale per la Leptospirosi

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

LA NOSTRA ESPERIENZA, LA VOSTRA **SICUREZZA.**

LA LEPTOSPIROSI SUINA: QUALE SITUAZIONE IN ITALIA?

LEPTOSPIROSI: INFEZIONE DIMENTICATA

- **Riduzione controlli veterinari**
  - **Paesi sviluppati: riduzione dei casi umani**
  - **Paesi VS: scarse informazioni sulle popolazioni animali**
  - **Spesa eccessiva**
  - **Italia: ostacoli legislativi?**
- **Differenze medicina umana/veterinaria**
  - **M. umana: diagnosi rapida**
  - **M. veterinaria: controllo → test serovar specifici**
  - **Metodi diversi per prevenzione e controllo**
- **Riduzione nuove acquisizioni**

LEPTOSPIROSI: INFEZIONE DIMENTICATA

- **Patologia spesso difficile da riconoscere**
- **Difficoltà diagnostiche**
  - **sintomi variabili o non caratteristici**
  - **mancanza di approfondimenti di laboratorio**
  - **test di laboratorio poco sensibili**
  - **test di laboratorio poco specifici:**
    - ***sierologia (MAT): fasi precoci***
    - ***isolamento: campionamento***
- **Diagnosi errata o mancata**

LEPTOSPIROSI: INFEZIONE DA NON DIMENTICARE

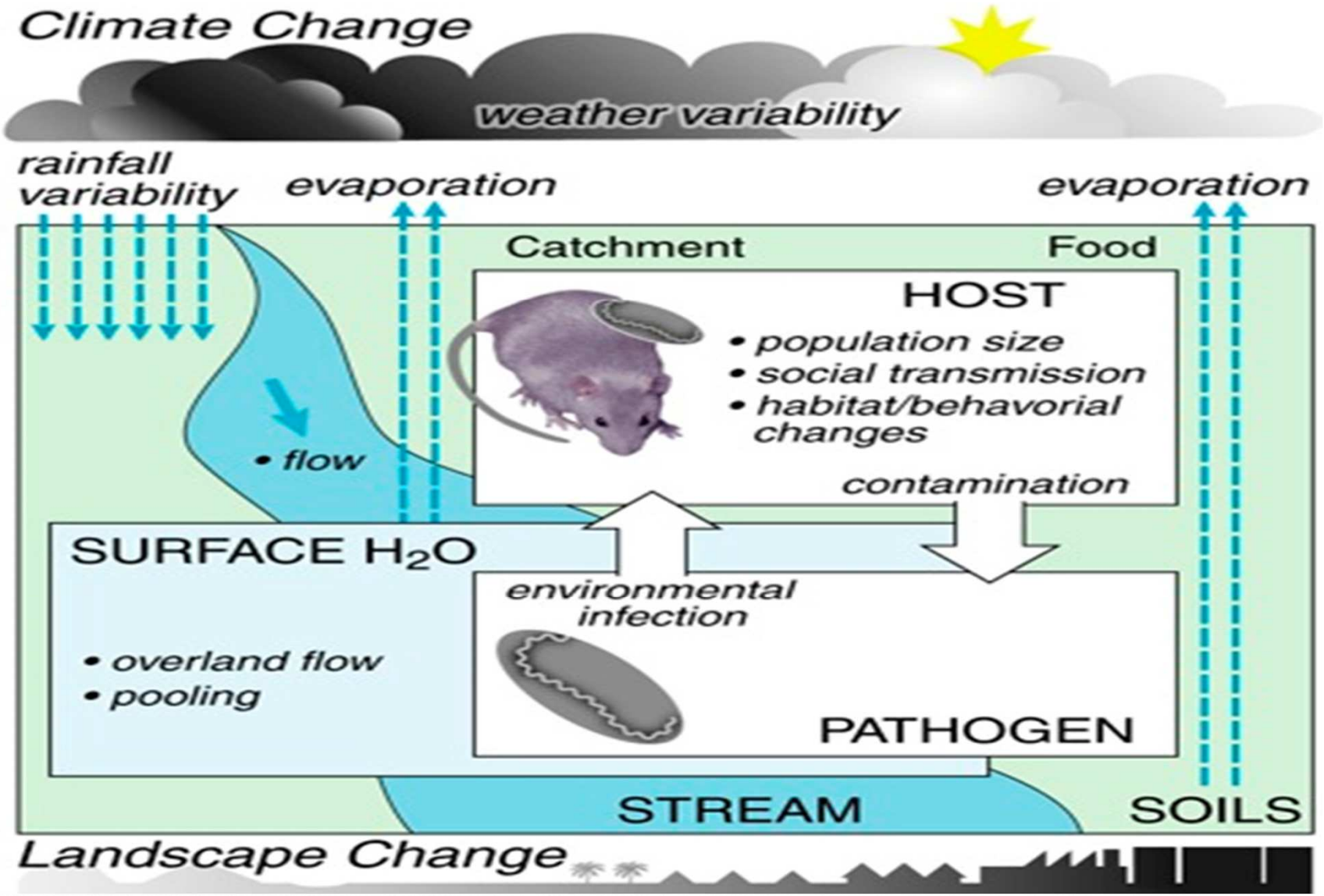
- **Diffusione globale**
- **Epidemiologia complessa**
  - **numerosi ospiti (animali selvatici e domestici)**
  - **numerose vie di trasmissione**
  - **numerose sierovarianti (serovar) coinvolte**
- **Relazioni uomo – animali – ambiente**
  - **complesse**
  - **non comprese completamente**

LEPTOSPIROSI: CONDIZIONI FAVORENTI

- **Cambiamenti climatici in corso**
  - **aumento della temperatura**
  - **aumento delle precipitazioni**
  - **maggior frequenza inondazioni**
  - **aumento dell'umidità**

- **Inurbamento della popolazione**
  - **elevata densità demografica**
  - **condizioni igieniche precarie**
  - **elevata densità ospiti**

LEPTOSPIROSI: CONDIZIONI FAVORENTI



LEPTOSPIRA E OSPITI

- **Caratteristiche batterio**
  - **Ambiente**
    - **ridotta resistenza**
    - **moltiplicazione assente**
  - **Ospite**
    - **elevata resistenza**
    - **persistenza**
- **Ospite**
  - **animali selvatici**
  - **animali domestici**

OSPITI: TIPOLOGIA

	Mantenimento	Accidentale
Sensibilità ospite	+++	+
Dose infettante	+	++
Virulenza serovar	+	+++
Escrezione (durata)	+++	+
Trasmissione	+++	+
Infezione	Endemica	Sporadica

OSPITI DI MANTENIMENTO

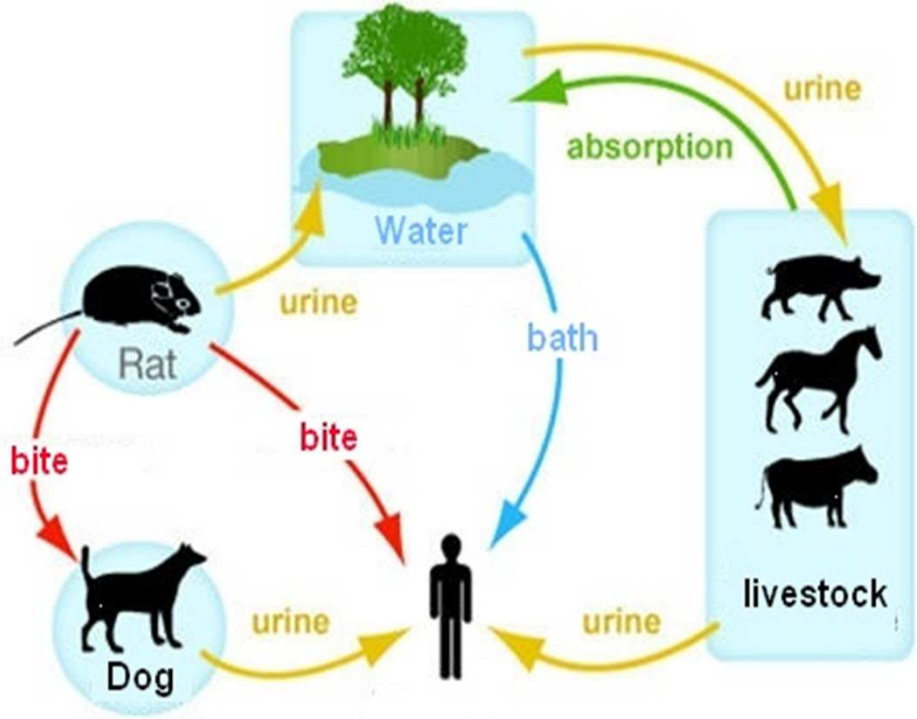
- **Cluster universali**
  - ***Cluster Hardjo***
    - **Bovini, ovini (bufalini, caprini, cervidi, altri ruminanti)**
  - ***Cluster Bratislava/Muenchen complex***
    - **Suini, equini, cane, specie selvatiche (monogastrici)**
  - ***Cluster Canicola***
    - **Cane**
- **Cluster regionali**
  - ***Cluster Pomona/Mozdok***
    - **Suini (Europa)**

OSPITI ACCIDENTALI

- **Variabilità regionali**
- **Principali sierogruppi**
  - **Pomona: universale (eccezioni Paesi ovest Europa)**
  - **Icterohaemorragiae: universale**
  - **Grippotyphosa: nord America, centro e est Europa**
  - **Pyrogenes: Africa**

TRASMISSIONE

- **Contatto diretto**
  - **<u>ospite (a/m) ←→ ospite (a/m)</u>**
  - **contatto con urina/tessuti infetti**
  - **ingestione**
  - **inalazione**
  - **abrasione**



- **Contatto indiretto**
  - **<u>ambiente → ospiti</u>**
  - **contatto con suolo**
  - **contatto con vegetali**
  - **contatto con acque**

LEPTOSPIRA IN ITALIA

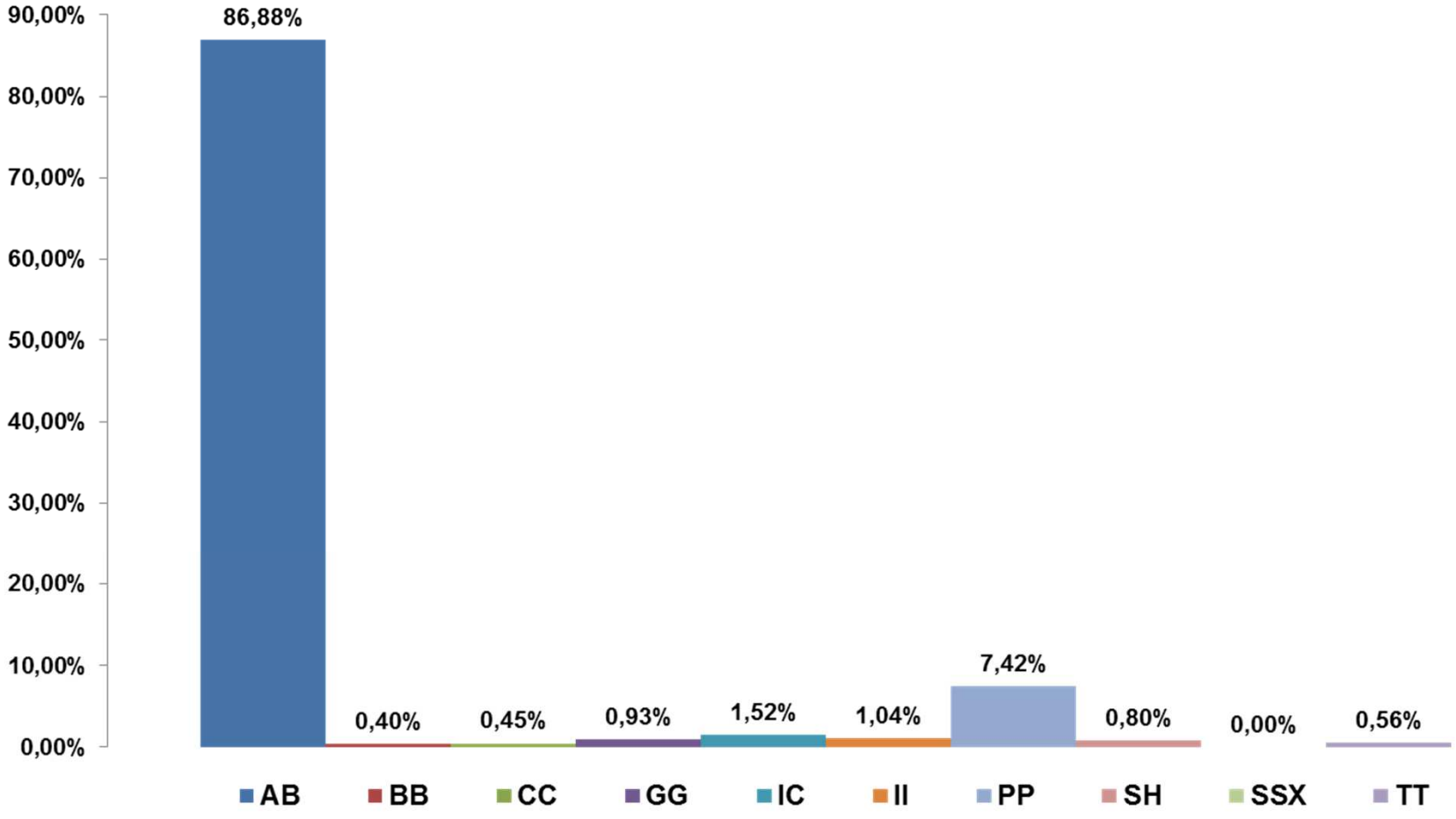
Sierogruppo/Serovar	O. mantenimento	O. accidentale
Australis/Bratislava	Ratto, riccio, suino, equino	Cane, cinghiale, volpe, lepre, roditori, gatto
Australis/Jalna		Cane
Canicola/Canicola	Cane	Cane, gatto, bovino, cavallo, suino
Grippotyphosa/Grippotyphosa	Topo	Cavallo, lepre, cane, gatto, bovino, ovini, caprini
Icterohaemorrhagiae/ Icterohaemorrhagiae	Ratto	Cane, microroditori, animali selvatici, nutrie
Icterohaemorrhagiae/ Copenhageni	Ratto	Cane, microroditori, animali selvatici, nutrie
Pomona/Pomona	Suino	Bovino, ovini, caprini, cane, gatto, equino
Sejroe/Hardjo	Bovino, ovino	Bufalo, cane, suino, equino, ovino
Sejroe/Saxkoebing		Microroditori, cane
Sejroe/Sejroe	Roditori, animali selvatici	Cane, bovino

LEPTOSPIRA IN ITALIA

BOVINO	SUINO
(2) Sejroe/Hardjo	(1) Australis/Bratislava
(1) Pomona/Pomona	(1) Pomona/Pomona
(2) Sejroe/Sejroe	(1) (Canicola/Canicola)
(3) (Grippo/Grippotyphosa)	(2) (Tarassovi/Tarassovi)
(1) (Canicola/Canicola)	

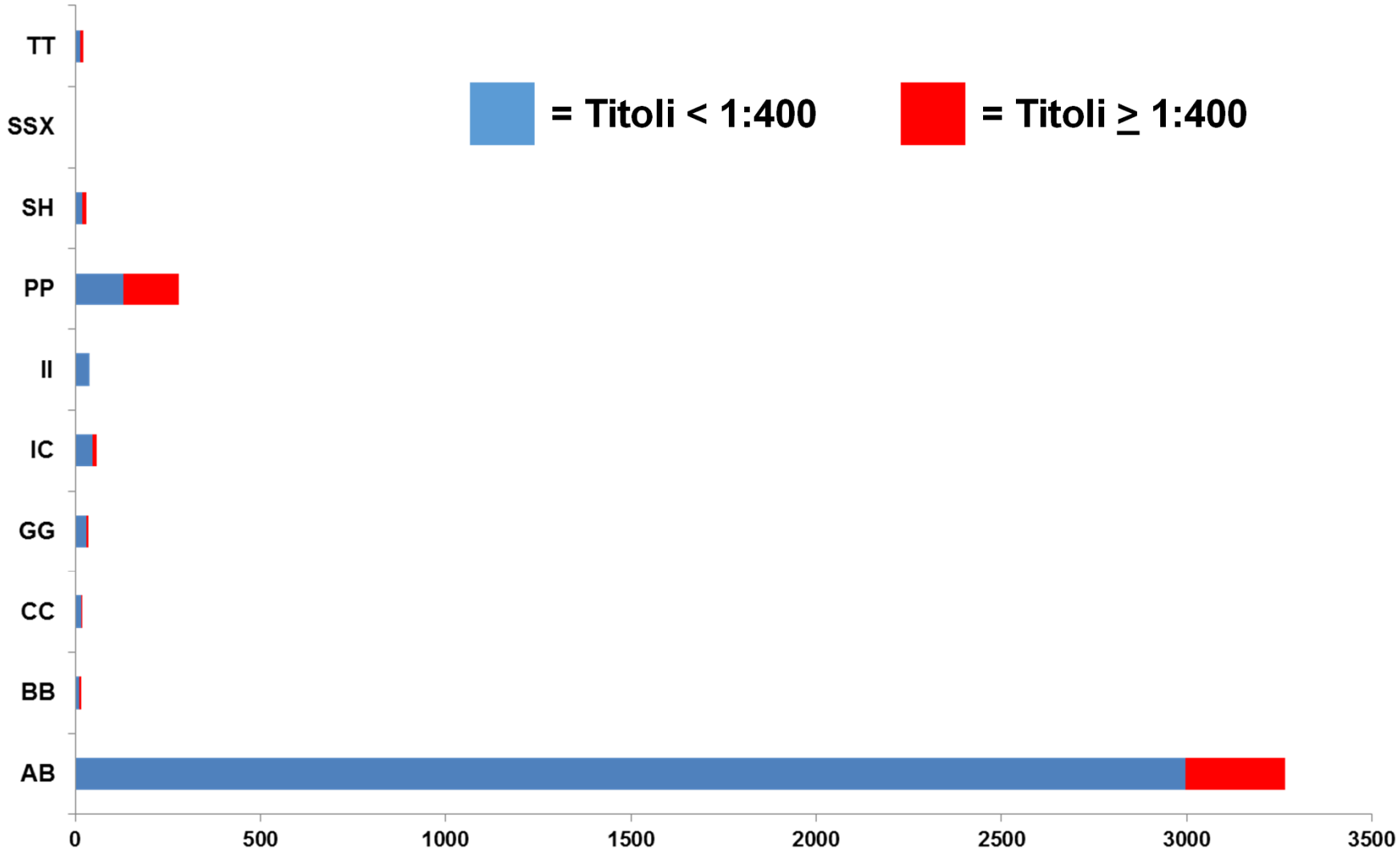
Genomospecie:
(1) *L. interrogans*
(2) *L. borgpetersenii*
(3) *L. kirschneri*

SUINI: SIEROLOGIA ANNI 2012 – 2017



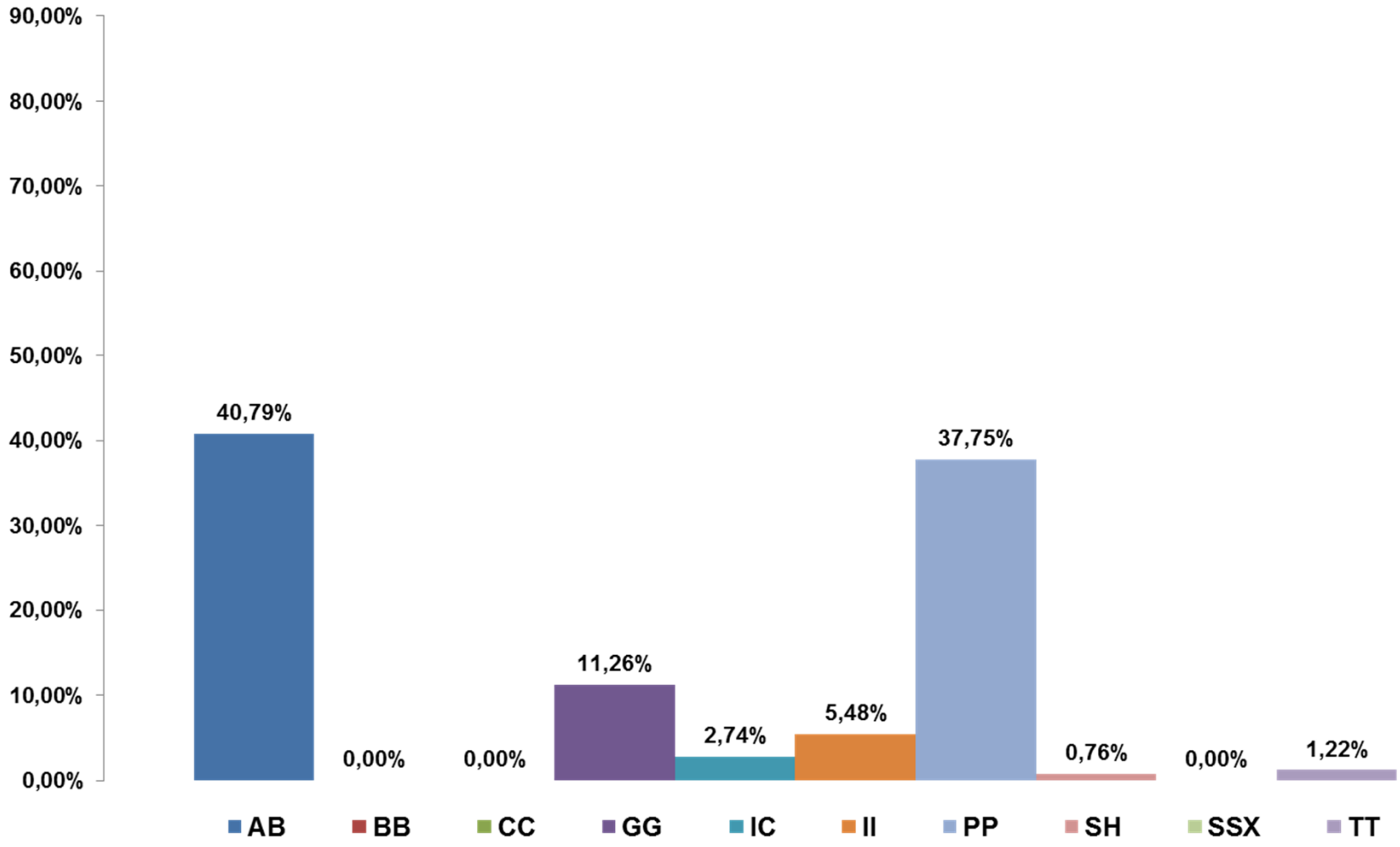
Totale campioni con positività singola: 3758

SUINI: SIEROLOGIA ANNI 2012 – 2017



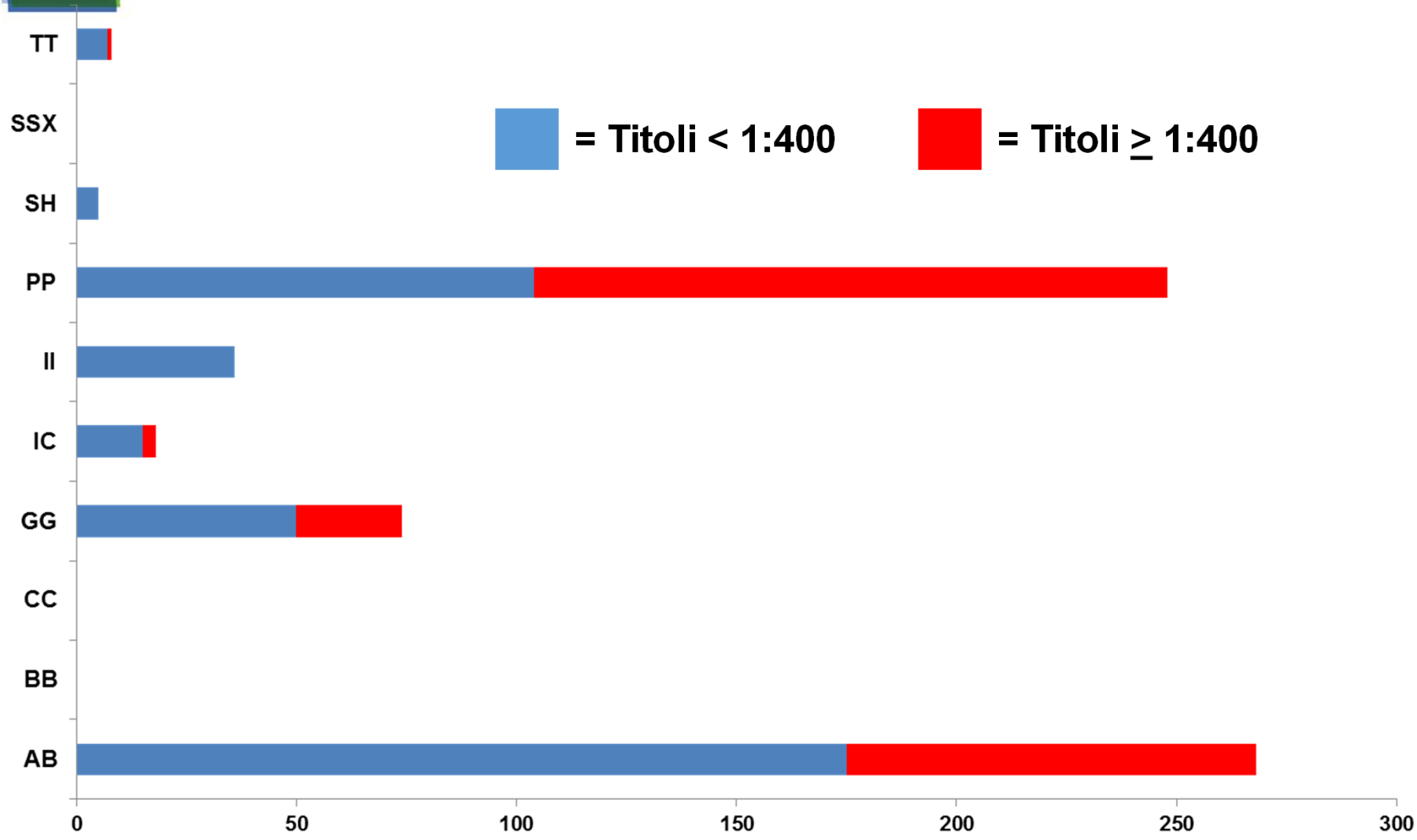
Totale campioni con positività singola: 3758

CINGHIALI: SIEROLOGIA ANNI 2012 – 2017



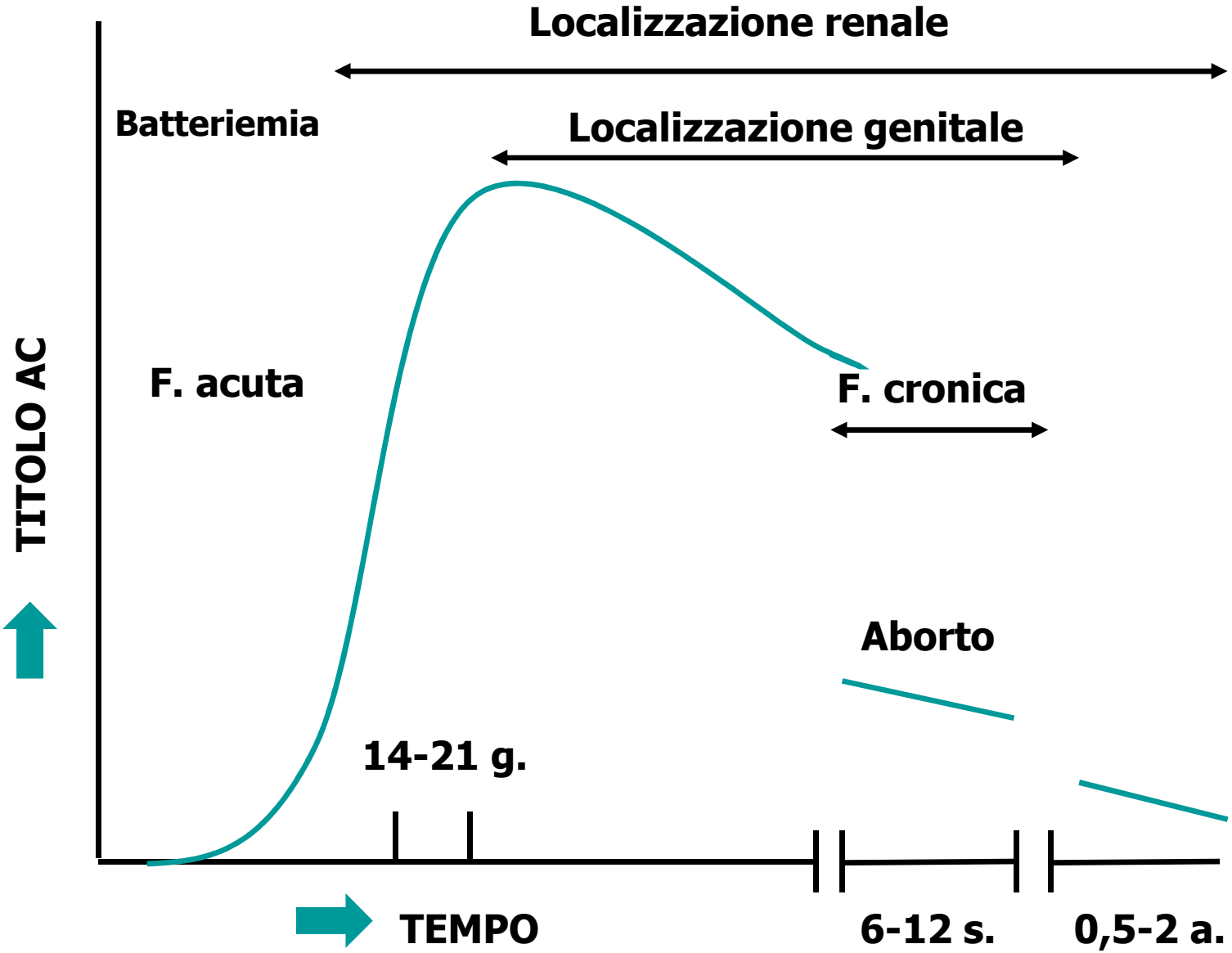
Totale campioni con positività singola: 657

CINGHIALI: SIEROLOGIA ANNI 2012 – 2017



Totale campioni con positività singola: 657

REAZIONE IMMUNITARIA (DA ELLIS, MOD.)



LEPTOSPIROSI ACUTA

- **Allevamenti non intensivi**
- **Soggetti giovani**
- **Ceppi produttori emolisina**
  - **Infezioni accidentali**
  - **Sintomi (rari): anemia, emoglobinuria, ittero, edemi**

LOCALIZZAZIONE RENALE

- **Nefrite interstiziale**
  - **Ospite mantenimento:** lesioni limitate
  - **Ospite accidentale:** lesioni evidenti
- **Persistenza**
  - **Ospite mantenimento:** mesi, tutta la vita
  - **Ospite accidentale:** limitata
- **Escrezione urinaria**
  - **1-5 mesi, anni**
  - **Intermittenza**

LOCALIZZAZIONE GENITALE

- **Localizzazione**
  - **Utero, ovidutto, ovario → Persistenza prolungata**
  - **Testicoli, epididimo**
  - **Trasmissione verticale**
- **Conseguenze**
  - **Correlate a: serovar, fase gestazione**
  - **Infertilità**
  - **Aborto, natimortalità, parti prematuri**
  - **Riduzione peso alla nascita, dimensioni nidiata**

INFEZIONE DA L. BRATISLAVA (S.G. AUSTRALIS)

- **Genotipi:**
  - **B1: riccio, cavallo**
  - **B2a: riccio, suino, cavallo, cane**
  - **B2b: suino (o.m. «genitale»)**
- **Localizzazione:**
  - **Genitale: maggiore persistenza**
  - **Renale: ridotta escrezione**
- **Profili sierologici:**
  - **Legati a: tipologia allevamento, singolo animale**
  - **Bassi titoli (< 1/100) o negativi**

INFEZIONE DA LEPTOSPIRA S.G. POMONA

- **Sierotipi:**
  - **Pomona**
  - **Mozdok**
- **Localizzazione:**
  - **<u>Renale</u>: escrezione elevata e prolungata**
  - **Genitale**
- **Profili sierologici:**
  - **Legati a: singolo animale, tipologia allevamento**
  - **Titoli generalmente > 1/400**

DIAGNOSI DI LABORATORIO PRESSO IL CRNL

DI ROUTINE

- Diagnosi sierologica: agglutinazione microscopica
- Ricerca leptospire patogene da matrici biologiche
  - Isolamento
  - PCR
- Identificazione (ceppo isolato)
  - Sierologica

DI APPROFONDIMENTO

- Identificazione
  - Ceppo isolato: biologia molecolare
  - DNA amplificato da matrici biologiche

CAMPIONAMENTO: ESAME SIEROLOGICO (MAT)

- **Matrice**
  - **Siero di sangue**
  - **Siero fetale**
- **Prelievo**
  - **Se precoce possibili esiti falsamente negativi**
  - **Consigliabile doppio prelievo**
- **Trasporto**
  - **Refrigerato (non congelare)**

CAMPIONAMENTO: ESAME COLTURALE/PCR

- **Diagnosi in vivo**
  - **urina**
  - **sangue**
    - *senza EDTA per esame colturale*
    - *con EDTA per PCR*

- **Diagnosi *post-mortem***
  - **tessuti (rene, feto)**
  - **urina (da vescica)**
  - **sangue (da puntura cardiaca, senza/con EDTA)**

CAMPIONAMENTO: ESAME COLTURALE

- **Prelievo in sterilità**

- **Urina**
  - **dopo somministrazione di diuretico**
  - **diluire 1/10 all'atto del prelievo in**
    - Terreno specifico sterile (brodo EMJH selettivo)
    - Soluzione tampone sterile (con BSA 1%)

- **Trasporto**
  - **Rapido**
  - **A temperatura controllata**
  - **NO congelamento**

- **Inizio analisi: al ricevimento del campione**

CAMPIONAMENTO: PCR

- **Trasporto**
  - **rapido a temperatura controllata**
  - **evitare la diluizione**
  - **evitare possibilmente il congelamento**
- **Inizio analisi: al ricevimento del campione**

AGGLUTINAZIONE MICROSCOPICA (MAT)

- **Metodo considerato il più sensibile e specifico per la diagnosi di infezione**
- **Metodo qualitativo**
  - **definisce il <u>sierogruppo</u>**
- **Metodo quantitativo**
  - **permette differenziazione in titoli sierologici**
- **Espressione dei risultati per sierogruppo ricercato**
  - **Negativo: titolo < 1/100**
  - **Positivo: diluizione 1/100 - 1/6400**

ANTIGENI *LEPTOSPIRA*

SIEROGRUPPO	SIEROVARIANTE	CEPPO
Australis	Bratislava	Riccio 2
Ballum	Ballum	Mus 127
Canicola	Canicola	Alarik
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Icterohaemorrhagie	Copenhageni	Wijnberg
Pomona	Pomona	Pomona
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
Tarassovi	Tarassovi	Mitis-Johnson

Antigeni: 8 ceppi rappresentativi dei sierogruppi prevalenti per animali domestici e selvatici; impiegati su tutti i campioni, indipendentemente dalla specie animale

ANTIGENI: IMPIEGO

- **Motivazione epidemiologica**
- **Motivazione storica**
- **Possibilità modifica gruppo antigeni**
  - **Introduzione/eliminazione nuova sierovariante**
  - **Scelta tipologia ceppo:**
    - Ceppo internazionale (standardizzazione)
    - Locale (sensibilità)

MAT – LIMITI INTERPRETATIVI

- **Valutazione del titolo in relazione alla sierovariante**
- **Un singolo alto titolo (1/800 o più) è indicativo di infezione attiva, specialmente quando il quadro clinico è riferibile a leptospirosi**
- **Esiti negativi non escludono la presenza di infezione**
- **La diagnosi definitiva *prevederebbe* un aumento di 4 volte nei titoli MAT in sieri acuto e convalescente**
- **Reazioni paradosse (fasi precoci): titoli nei confronti di sierogruppo diverso da quello infettante**

MAT – POSITIVITÀ MULTIPLE

- Cross-reattività tra sierovarianti appartenenti a sierogruppi diversi
- Evidenti tra sieri positivi ad alto titolo
- Affinità antigeniche tra differenti sierovarianti o infezioni multiple (più sierovarianti)
- Variabilità tra soggetti di uno stesso gruppo
- Fase iniziale della infezione: poi prevale il titolo diretto contro il sierogruppo all'origine dell'infezione
- La sierovariante associata al titolo maggiore è generalmente considerata causa di infezione

ROUTINE DIAGNOSTICA MAT: PROBLEMATICHE

- **Campioni su sospetto clinico**
- **Campioni <u>spesso</u> non accompagnati da anamnesi**
- **Non noto lo stato vaccinale**
- **In maggioranza singoli campioni di siero**
- **Non sempre noto se campioni siano stati ripetuti con un secondo prelievo distanziato nel tempo**

PCR

- **Vantaggiosa rispetto all'isolamento**
  - **Maggiore rapidità**
  - **Non richiede integrità batterica**
- **Limiti**
  - **Condizioni del campione**
  - **Urina: eliminazione intermittente**
  - **Basse cariche**
  - **Presenza inibenti amplificazione**
- **Appropriata per**
  - **Valutare eliminazione urinaria (campionamenti)**
  - **Diagnosi precoce da sangue**

ESITI PCR 2012 – 2017

Anno	Positivi	Negativi
2012	0	5
2013	8	24
2014	0	13
2015	7	46
2016	2	130
2017	41	79
TOTALE	58	297

ESAME COLTURALE

- **Metodo più sensibile per dimostrare la presenza di leptospire patogene (OIE)**
- **Consente solo conferma tardiva (tempo lungo di duplicazione cellulare: 20 ore)**
- **Risente della contaminazione in fase di prelievo**
- **Va realizzato entro un breve lasso di tempo dopo il prelievo (scarsa sopravvivenza delle leptospire)**
- **Presupposto per identificazione dell'isolato, utile in studi epidemiologici**

ESITI ISOLAMENTO 2012 – 2017

Anno	Positivi	Negativi
2012	0	28
2013	10	25
2014	2	9
2015	12	11
2016	2	13
2017	6	20
TOTALE	32	106

CONTROLLO: MEZZI

- (A) Monitoraggio stato della popolazione
- (B) Vaccinazione
- (C) Terapia antibiotica
- (D) Identificazione/riduzione fattori di rischio

Combinazione (A), (B), (C), (D)

↓

Identificazione e rimozione soggetti infetti

CONTROLLO

- **Motivazioni**
  - **Riduzione perdite economiche**
  - **Sanità pubblica**
- **Tipologia**
  - **Aziendale, locale/regionale**
  - **Obbligatorio/volontario**
- **Opzioni**
  - **Eradicazione e prevenzione reinfezione**
  - **Riduzione / Prevenzione forme cliniche**

CONTROLLO: ERADICAZIONE

- **Difficile applicazione**
  - **Creazione di nuclei «pathogen free»**
  - **Terapia antibiotica**
  - **Prevenzione reinfezione: problemi attuazione**
- **Prevenzione reinfezione**
  - **Evitare contatto con animali infetti**
  - **Test diagnostici: esiti non definitivi**
  - **Terapia antibiotica: non garantisce «sterilizzazione»**

RIDUZIONE/PREVENZIONE FORME CLINICHE

- **Terapia antibiotica**
  - **Riduzione circolazione batterica**
  - **Problemi: resistenza → possibile fallimento**
  - **Valutazione singole situazioni**
- **Vaccinazione**
  - **Soluzione semplice/pratica**
  - **Prevenzione reinfezione: parziale efficacia**
  - **Limiti: disponibilità vaccini, ridotto utilizzo**

e-mail: mario.dincau@izsler.it

Telefoni: 030 2290268, 030 2290323