

Alma Mater Studiorum
Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN EPIDEMIOLOGIA E
CONTROLLO DELLE ZONOSI – XIX CICLO**
Coordinatore: Prof. Luigi Moranti

**La sorveglianza epidemiologica della
leishmaniosi canina: esperienze di un
triennio**

Tesi di Dottorato di:
Dr.ssa Silvia Piva

Docente guida:
Prof. Raffaella Baldelli

Coordinatore:
Prof. Luigi Morganti

Settore scientifico disciplinare: Vet/05

Marzo, 2007
Sede Amministrativa:
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Bologna

INDICE

Riassunto	pag. 1
Abstract	pag. 4

PARTE GENERALE

Agente eziologico.....	pag. 6
1. Tassonomia.....	pag. 6
2. Morfologia.....	pag. 7
3. Ciclo biologico.....	pag. 9
4. Caratteristiche genomiche.....	pag. 11
Modalità di trasmissione e vettore.....	pag. 13
1. Modalità di trasmissione.....	pag. 13
2. Vettore.....	pag. 14
Serbatoio e specie recettive.....	pag. 18
La leishmaniosi in Italia.....	pag. 20
Patologia e clinica.....	pag. 31
1. Patogenesi.....	pag. 31
2. Quadro clinico.....	pag. 34
Diagnosi.....	pag. 38
1. Diagnosi clinica e differenziale.....	pag. 38
2. Diagnosi di laboratorio.....	pag. 38
2.1 Esami aspecifici.....	pag. 38
2.2 Esami specifici.....	pag. 40
A) esami diretti.....	pag. 41
B) esami indiretti.....	pag. 46
3. Test Intradermico.....	pag. 51
Terapia.....	pag. 52

Profilassi..... pag. 55

PARTE SPERIMENTALE

Premessa..... pag. 62

I Parte: Indagine epidemiologica in Emilia-Romagna e Repubblica di San Marino.

Materiali e metodi.....pag. 66

1. Territorio in esame..... pag. 66
2. Campioni.....pag. 69
3. Esami di laboratorio..... pag. 70
4. Indagine entomologica..... pag. 74

Risultati.....pag. 77

1. Indagine epidemiologica.....pag. 77
2. Indagine entomologica.....pag. 79

Discussione e conclusioni..... pag. 82

II Parte: Comparazione di tecniche biomolecolari e sierologiche eseguite su cani del canile sanitario di Firenze.

Materiali e metodi.....pag. 93

1. Campioni.....pag. 93
2. Esami di laboratorio..... pag. 96
3. Elaborazione statistica dei dati..... pag. 99

Risultati.....pag. 100

1. Esami di laboratorio..... pag. 100
2. Elaborazione statistica dei dati..... pag. 107

Discussione e conclusioni..... pag. 109

Bibliografia..... pag. 113

Allegati

RIASSUNTO

La leishmaniosi è una malattia protozoaria che rappresenta attualmente una tematica emergente sia in riferimento alle problematiche di sanità animale che comporta, sia in relazione al carattere zoonotico dell'infezione.

In Italia l'agente eziologico è rappresentato da *Leishmania infantum*, i cui ceppi viscerotropi sono responsabili della leishmaniosi canina (LCan) e della forma viscerale zoonotica (LVZ), ed i ceppi dermatropi della forma cutanea sporadica nell'uomo (LCS).

L'infezione viene trasmessa attraverso femmine ematofaghe di ditteri appartenenti al genere *Phlebotomus*, che hanno il ruolo di vettori biologici attivi. L'unico serbatoio domestico riconosciuto è il cane, nel quale la malattia è descrivibile come una reticolo-endoteliosi sistemica ad andamento cronico progressivo. A tutt'oggi non esiste un vaccino di comprovata efficacia e la terapia, nel cane, pur permettendo la remissione clinica, non porta a sterilizzazione parassitologica.

In Italia la LCan è in forte espansione. Fino agli anni ottanta era presente in forma endemica nel centro-sud Italia e nelle isole mentre il nord Italia, fatta eccezione per la Liguria e una piccola parte dell'Emilia-Romagna risultava indenne. A partire dagli anni novanta, parallelamente ad un aumento della consistenza e del numero dei focolai nelle aree storicamente endemiche, sono iniziate, nelle regioni del Nord, le segnalazioni di focolai autoctoni stabili, all'interno dei quali sono cominciati a comparire alcuni casi umani autoctoni.

Alla fine del 2002 è nato il network scientifico LeishMap™, con lo scopo di monitorare l'evoluzione della LCan nel Nord Italia; nell'ambito di tale progetto si colloca l'indagine oggetto della I parte della presente tesi, che ha come finalità il monitoraggio dell'infezione nella regione Emilia-Romagna.

E' stata condotta un'indagine epidemiologica che ha compreso un controllo sierologico, mediante immunofluorescenza indiretta (IFI), su

2311 cani residenti in diverse Province dell'Emilia-Romagna (Bologna, Forlì-Cesena, Modena, Parma, Piacenza, Ravenna e Reggio-Emilia) e nella Repubblica di San Marino. Dei 2311 cani, 90 sono risultati positivi e di questi, 61 sono stati considerati casi autoctoni. Da 3 animali sono stati isolati tre ceppi di leishmania 2 dei quali caratterizzati come *L. infantum* zimodema MON1.

Il monitoraggio entomologico ha permesso di evidenziare la presenza dei due vettori "provati": *P. perfiliewi*, rilevato in tutti i focolai, a volte associato a *P. perniciosus*.

La presenza stabile, in forma endemica, della LCan in Emilia-Romagna appare dai 5 focolai autoctoni e dai diversi casi sporadici evidenziati in aree collinari e pedemontane a sud della via Emilia.

La II parte della tesi tratta degli studi condotti allo scopo di valutare l'utilità diagnostica di tecniche biomolecolari, in soggetti a diversi stadi di infezione. L'immunofluorescenza indiretta, pur rappresentando la metodica *gold standard* secondo l'OIE, presenta tuttavia alcuni limiti, il principale dei quali consiste nella rilevazione di positività dopo 5-8 mesi dal contatto con il parassita.

Lo studio è stato effettuato nella zona di Firenze, scelta in considerazione dello stato di iperendemicità, che avrebbe permesso di reperire più facilmente cani in diverse fasi d'infezione.

Sono stati controllati in IFI e n-PCR 58 cani di nuova introduzione nel canile sanitario di Firenze. Su tutti e 58 è stato possibile eseguire l'IFI e la n-PCR da *buffy coat*; la n-PCR da midollo e da linfonodo è stata eseguita rispettivamente su 55 e 17 cani. Per 17 cani è stato possibile eseguire l'IFI e le n-PCR a partire da tutti e tre substrati. I dati ottenuti con le diverse metodologie diagnostiche sono stati elaborati su base statistica utilizzando il Test di McNemar e il test-t di Student per il confronto tra proporzioni.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le prevalenze ottenute con i diversi tests. Nessun substrato si è rivelato più idoneo di un altro per l'utilizzo della n-PCR ai fini diagnostici;

L'IFI e la n-PCR da *buffy coat* risultano le tecniche dotate di maggiore sensibilità.

A tutt'oggi quindi l'IFI rappresenta ancora la metodica diagnostica più idonea per la diagnosi di LCan, mentre l'utilizzo delle tecniche biomolecolari debba essere preso in considerazione in affiancamento ad essa, per confermarne i casi dubbi.

Surveillance of canine leishmaniosis: three years experiences.

ABSTRACT

Canine leishmaniosis (CanL) due to *Leishmania infantum* is a disease of great veterinary importance and a serious public health problem. In humans, *L. infantum* causes visceral and cutaneous leishmaniasis and the distribution of the visceral one overlaps that of CanL. The dog is the only domestic reservoir of the infection and phlebotomine sandflies are the vectors of leishmaniosis for dogs and humans. CanL is endemic in Italy, particularly in central and southern regions, including islands. Until 1980, all regions of northern Italy, except Liguria and few territories of Emilia-Romagna were considered free from CanL. From early nineties new stable foci of CanL have appeared in northern Italy and in the same areas autochthonous human visceral cases have occurred. In October 2002 was created the network LeishMap™, with the main purpose of monitoring the spread of CanL and vectors in northern Italy. LeishMap™ consists of scientific institutions with proven experience in fields surveys and diagnostic methodologies on CanL and phlebotomine vectors.

The diagnosis of CanL presents still some problems but an accurate diagnosis is necessary, firstly, for surveillance and control of human visceral leishmaniasis, secondly for the management of clinical canine cases. Immunofluorescence antibody test (IFAT) is the gold standard for CanL diagnosis recommended by the *Organisation Mondiale de la Santé Animale*. Nevertheless IFAT presents some disadvantages, such as the extremely variable period post-infection before seroconversion.

The research project had the following aims: monitoring CanL and respective vectors in Emilia-Romagna region (ERR) and San Marino Republic (SMR) (I part); comparison of IFAT and n-PCR performances (II part).

In the first part, serological analysis, was carried out by IFAT on 2311 dogs living in different provinces of ERR and in SMR, and 90 positive animals were detected. The autochthonous origin of the infection was confirmed in 61 cases. Three strains of leishmanie were isolated; two of these were characterized as *L. infantum* zymodeme MON1. Entomological surveys showed the presence of *Phlebotomus perniciosus* and *P. perfiliewi*, both known vectors of *L. infantum* in Italy.

Five stable foci and some sporadic cases of CanL identified in hilly areas to the south of via Emilia suggest the presence of the infection in ERR with stable and endemic pattern.

In the second part, 58 dogs were examined by serological and biomolecular methodologies. All the animals lived in a kennel, located in Florence (Toscana region), an hiperendemic area suggesting a facility to find positive dogs in different disease stages.

For all dogs IFAT and n-PCR on buffy coat are performed. Bone marrow and limph node aspirates were tested with n-PCR in 55 and 17 dogs, respectively. All procedures were applied in all samples of 17 dogs.

No statistical significant differences, using McNemar test and t-Student test, were found between IFAT and n-PCR performances. Moreover, the prevalences of CanL were not significantly different between different samples performed with n-PCR analysis. Higher sensitivity was highlighter for IFAT and n-PCR on buffy coat procedures.

Nowadays, IFAT is the best method for the diagnosis of CanL, being the n-PCR a good technique for confirmation.

AGENTE EZIOLOGICO

1. Tassonomia.

Leishmania infantum è un parassita appartenente al regno dei Protisti, sottoregno *Protozoa*, phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, classe *Zoomastigophora*, ordine *Kinetoplastida*, sottordine *Trypanosomatinae*, famiglia *Trypanosomatidae*, sottogenere *Leishmania*.

Il sottogenere *Leishmania* è stato suddiviso dall'OMS nel 1990 in 5 complex (*Leishmania donovani*, *L. tropica*, *L. mayor*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*); la specie *Leishmania infantum*, insieme a *L. archibaldi*, *L. donovani*, fa parte del complex *Leishmania donovani*.

Nel nostro Paese è presente una sola specie di *L. infantum*, i cui ceppi viscerotropi sono responsabili sia della leishmaniosi canina sia della leishmaniosi viscerale umana (leishmaniosi viscerale zoonotica: LVZ), mentre i ceppi dermatotropi sono responsabili della leishmaniosi cutanea sporadica nell'uomo (LCS).

All'interno della specie *L. infantum* si identificano, attraverso l'analisi elettroforetica degli isoenzimi, altre unità tassonomiche definite zimodemi. Lo zimodema comprende gli isolati del parassita che mostrano la stessa mobilità elettroforetica per un numero definito di enzimi esaminati (13 isoenzimi nel sistema standardizzato di Montpellier) (Gramiccia *et al.*, 2004). La tecnica consiste in un'elettroforesi su gel sul quale vengono esaminati i promastigoti ottenuti in coltura e opportunamente trattati. Le bande elettroforetiche, rilevate mediante opportune colorazioni, vengono confrontate con quelle dei ceppi standard di riferimento forniti dall'OMS (Gramiccia, 1997).

In Italia lo zimodema maggiormente rappresentato è ZMON-1 per la LVZ e ZMON-24 per la LCS (Dereure *et al.*, 1999). Inoltre sono state descritte alcune varianti enzimatiche quali, per la LVZ, lo ZMON-72, ZMON-27, ZMON-187; tra questi lo ZMON-72 esclusivo dell'area

vesuviana. Per quanto riguarda la LCS, le varianti sono ZMON-29, ZMON-33, ZMON-78, ZMON-111 descritte in Campania, Sicilia e Sardegna (Gradoni *et al.*, 1993; Gradoni e Gramoccia, 1994; Gramoccia, 1997; Dereure *et al.*, 1999). I cani, serbatoio di *L. infantum*, sono generalmente infettati da ZMON-1 ed eccezionalmente da altri zimodemi (Gallego *et al.*, 2001), quale ZMON-72 isolato soprattutto nell'area vesuviana (Gradoni, 1996).

Nonostante l'analisi isoenzimatica risulti la procedura universalmente accettata per l'identificazione dei ceppi di leishmania, viene eseguita in pochi laboratori in quanto l'isolamento del parassita prevede passaggi critici che devono essere eseguiti da personale specializzato. Per questo motivo sono allo studio vari metodi di tipizzazione molecolare; tra questi lo studio dei polimorfismi legati ai microsatelliti sembra essere quello in grado di dare più informazioni (Bulle *et al.*, 2002; Reale *et al.*, 2005).

2. Morfologia.

Le leishmanie sono parassiti definiti dimorfi, in quanto a seconda della fase del ciclo biologico in cui si trovano possono assumere due diversi stadi morfologici principali.

Nell'ospite vertebrato il protozoo è presente nelle cellule del sistema reticolo endoteliale sotto forma di **amastigote** (vedi Fig.1). È caratterizzato dall'aver un corpicciolo rotondo o ovoidale, privo di flagello, delle dimensioni di 2-5 di diametro, con un grosso nucleo sferico a localizzazione eccentrica e contrapposto al kinetoplasto, una formazione bastoncellare del mitocondrio contenente DNA extranucleare (kDNA). In prossimità del kinetoplasto vi è un corpo basale puntiforme, il blefaroplasto, da cui si diparte il rizoplasto, abbozzo di flagello che non emerge dalla cellula. Intorno ad esso troviamo un manicotto citoplasmatico ricoperto da plasmalemma che costituisce una tasca flagellare aperta verso l'esterno, dove avvengono

i fenomeni di scambio citoplasmatici (Euzeby, 1994). Kinetoplasto e blefaroplasto costituiscono l'apparato neuromotore del flagello. Nelle femmine del dittero vettore e nei terreni di coltura le leishmanie assumono la forma di promastigote e paramastigote.

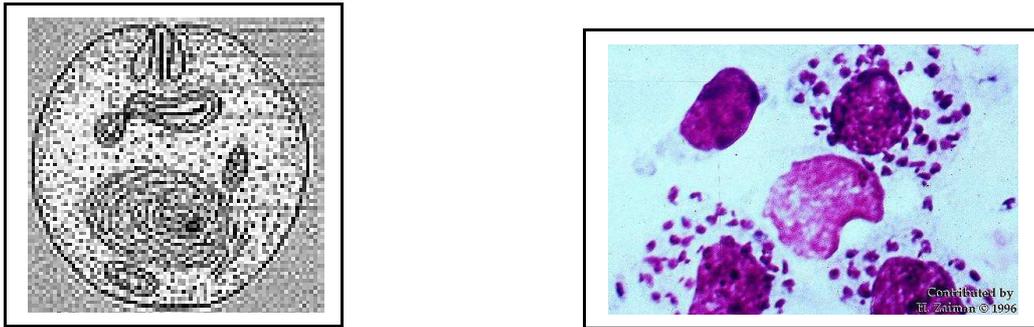


Fig.1: nell'immagine a sinistra si vede un disegno di amastigote (leishmania.org); in quella a destra, amastigoti all'interno dei macrofagi in un preparato citologico (Zaiman,1996).

Il **promastigote** ha una forma allungata con nucleo centrale, kinetoplasto anteriore, dimensioni variabili da 10 a 20 μm e provvisto di un lungo flagello, fuoriuscente dall'estremità anteriore del corpo, che serve sia per la propulsione che per l'adesione alle cellule (Ashford, 2000). Nella fase terminale del ciclo nel vettore assume una forma promastigote anomala denominata promastigote metaciclico. Le leishmanie in questo stadio sono caratterizzate dall'aver un aspetto sottile, molto allungato, con estremità posteriore affusolata e dall'essere altamente mobili senza avere capacità adesive. Sono queste le forme infettanti per i vertebrati (Euzeby, 1994; Ashford, 2000). Sia gli amastigoti che i promastigoti si riproducono per scissione binaria longitudinale a partire dal corpo basale.

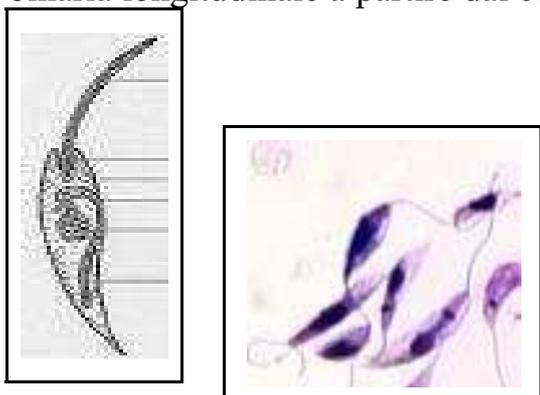


Fig.2: nell'immagine a sinistra si vede un disegno di promastigote (leishmania.org); in quella a destra promastigoti in coltura (www.icp.ucl).

Esiste inoltre uno stadio morfologico detto paramastigote avente un aspetto più arrotondato e kinetoplasto allo stesso livello del nucleo che ritroviamo nella faringe del flebotomo. In tale stadio la leishmania non è in grado di replicarsi e la sua funzione non è nota (Killick- Kendrick, 2002).

3. Ciclo biologico.

La leishmania è un parassita obbligato continuo e il suo ciclo biologico prevede un ospite vertebrato che rappresenta il serbatoio della malattia e un invertebrato che rappresenta il vettore.

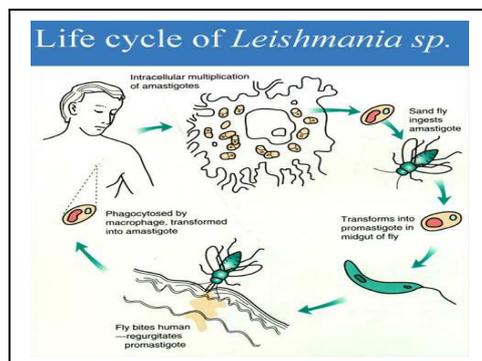


Fig.3: rappresentazione schematica del ciclo biologico di *L. infantum* (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Nell'ospite vertebrato il parassita viene inoculato nel derma da femmine ematofaghe del flebotomo vettore, sotto forma di promastigote metaciclico. Nel mammifero i promastigoti vengono fagocitati dalle cellule del sistema reticolo endoteliale; ciò è favorito da due fattori:

1. dall'adesione del promastigote alla membrana del macrofago, mediata da molecole di superficie del protozoo quali lipofosfoglicani (LPG) e la glicoproteina gp63;
2. dall'attivazione del complemento con il conseguente legame tra il promastigote e la frazione C3 del complemento stesso, innescante l'endocitosi (Euzaby, 1994).

Nel macrofago, dall'unione del fagosoma con il lisosoma, si forma il fagolisosoma, all'interno del quale le leishmanie sopravvivono grazie a peculiari meccanismi difensivi, si trasformano in amastigoti e replicano sino a determinare la rottura del vacuolo e quindi della cellula. Tutto ciò richiama altri macrofagi che fagocitano gli amastigoti neoformati e fanno sì che si diffondano in tutto l'organismo, compreso il sistema nervoso centrale (Ferrer, 2002).

Nel serbatoio è caratteristica la massiva localizzazione di macrofagi parassitati nel derma e/o di monociti infetti nel sangue periferico. Ciò permette la trasmissione del protozoo all'ospite invertebrato quando la femmina di flebotomo, compiendo il pasto di sangue, ingerisce le cellule parassitate dalle forme amastigote della leishmania. Gli amastigoti si trasformano in promastigoti e iniziano un'intensa attività replicativa; il pasto di sangue, giunto nell'intestino, viene avvolto da una membrana peritrofica, con matrice di chitina, prodotta dalle cellule intestinali. I promastigoti, divenuti molto numerosi, producono un enzima chitinolitico in grado di danneggiare la membrana, riversandosi così nel lume intestinale mediante l'inserimento del flagello tra i microvilli delle cellule dell'intestino stesso. Mano a mano che le leishmanie aumentano di numero migrano anteriormente fino a raggiungere la valvola stomodeale alla quale si attaccano attraverso emidesmosomi presenti sul flagello. I promastigoti metaciclici, infettanti per il vertebrato, invadono l'apparato succhiatore del vettore e le sue ghiandole salivari (Killick- Kendrick, 2002).

Il ciclo termina, dopo circa 10 giorni, quando la femmina del flebotomo viene rifecondata necessitando così di un nuovo pasto di sangue e depositando, tramite la puntura, i promastigoti metaciclici nel derma del mammifero.

4. Caratteristiche genomiche.

I protozoi appartenenti al genere *Leishmania* hanno un genoma di dimensioni 10^7 - 10^8 bp (paia di basi) composto da DNA cromosomico e cinetoplastico, a replicazione indipendente, presente nel kinetoplasto. Il DNA cinetoplastico è considerato un intermedio tra DNA mitocondriale e particelle simil-virali citoplasmatiche (Requena *et al.*, 1997). *L. infantum*, da un punto di vista genotipico, presenta 36 cromosomi e il DNA cinetoplastico è diviso in un *maxicircle* (plasmide) di lunghezza compresa tra 20 e 40 kb e un *minicircle* di 1-2 kb. La sequenza del minicircle mostra una regione variabile di circa 600bp e una regione costante di circa 200bp, conservata tra le diverse specie di leishmanie (Reale *et al.*, 1999). Tale frammento viene amplificato mediante polymerase chain reaction (PCR) negli screening di massa, mentre a scopi diagnostici si amplifica la sequenza cromosomica conservata nel genere *Leishmania*, codificante RNA ribosomiale (rRNA) 18S.

Il genoma di *Leishmania* è caratterizzato dall'aver sequenze codificanti organizzate in serie ripetute in tandem; ad esempio la sequenza che trascrive per gp63 (proteasi superficiale) è presente in 30- 70 copie.

Negli organismi eucarioti, i geni che trascrivono per gli rRNAs sono organizzati in cluster e ripetuti in tandem. Il cluster contiene una regione codificante per ogni 18S, 5.8S, 28S così disposti: rRNA 18S unito a proteine va a costituire la subunità 40S del ribosoma, mentre la subunità 60S è data dal complesso degli rRNA 5.8S e 28S con proteine ad essi associate. *L. infantum* presenta 160 ripetizioni del cluster e tra ciascuna è interposta una sequenza spaziatrice non trascritta di lunghezza variabile (Requena *et al.*, 1997).

Va quindi sottolineata la notevole plasticità del genoma di questa specie. La presenza di numerose sequenze ripetute può dar luogo a crossing-over reciproci sbilanciati; di conseguenza la lunghezza dei

cromosomi varia continuamente. E' una strategia evolutiva rilevante per la sopravvivenza della specie.

MODALITA' DI TRASMISSIONE E VETTORE

1. Modalità di trasmissione.

La trasmissione della leishmaniosi avviene attraverso il flebotomo vettore. Il meccanismo più accreditato prevede il rigurgito, durante il pasto di sangue, di promastigoti metaciclici dal tratto toracico dell'intestino medio del vettore nel derma del mammifero. Ciò è reso possibile dal fatto che i flebotomi parassitati presentano la valvola stomodeale danneggiata che non funziona perfettamente, provocando così il rigurgito delle leishmanie durante la suzione (Killick- Kendrick, 2002).

Meccanismi di trasmissione alternativi ai flebotomi, seppur rari, sono stati segnalati e/o ipotizzati sia nel cane sia nell'uomo.

Nel cane la trasmissione transplacentare sembra possibile in considerazione del fatto che si sono rinvenuti parassiti nell'utero, nel liquido amniotico e nei tessuti di feti e cuccioli nati da madri infette e sicuramente non esposti ai flebotomi (Masucci *et al.*, 2003). Nel cane la trasmissione dell'infezione, mediante secrezioni infette, sangue o coito, era ritenuta fino a qualche anno fa poco probabile. Attualmente la modalità di trasmissione per contatto diretto è stata rivalutata in seguito al verificarsi di casi autoctoni in Gran Bretagna, dove i vettori di leishmaniosi sono assenti (Trees *et al.*, 2001), e nel Nord America dove sono presenti ma non sono mai stati trovati infetti (Schantz *et al.*, 2001).

La trasmissione interumana sembra possibile, in caso di coinfezioni HIV-Leishmania, tramite l'utilizzo e lo scambio di siringhe infette (Alvar,1999); è stata segnalata inoltre la possibilità di trasmissione attraverso trasfusioni di sangue (Le Fichoux *et al.*, 1999).

2. Vettore.

I vettori delle leishmaniosi in Italia sono le femmine ematofaghe di ditteri appartenenti al *Phylum Arthropoda*, Classe *Insecta*, Ordine *Diptera*, Sottordine *Nematocera*, Famiglia *Psychodidae*, Genere *Phlebotomus*, Sottogenere *Larroussius*. Vettori provati di *L. infantum* nella nostra penisola sono *P. perniciosus* e *P. perfiliewi* (Maroli, 1999; Capelli *et al.*, 2004; Gramiccia *et al.*, 2004).

I flebotomi, letteralmente “tagliatori di vene”, sono insetti di piccole dimensioni, lunghi dai 2 ai 4 mm; sono generalmente di color sabbia, hanno il corpo ricoperto da una fitta peluria e dall’aspetto gibboso, caratteristico è l’angolo retto che forma il capo con il torace e l’addome. Questi ditteri sono comunemente chiamati anche pappataci, da “pappare in silenzio”, perché hanno un volo silenzioso. Sono attivi al crepuscolo e di notte durante la stagione estiva, quando cala la temperatura e aumenta l’umidità (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1999).

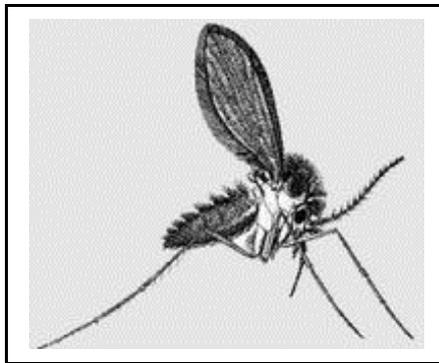


Fig.4: flebotomo (leishmania.org)

Durante il giorno riposano in luoghi freschi e umidi, come stalle, grotte e cantine. Inoltre, sono molto sensibili all’inquinamento da civilizzazione; prediligono, infatti, le zone rurali o perturbane, ricche di vegetazione ed esposte a sud. L’altezza massima a cui è stata riscontrata la specie *P. perniciosus* è di 1070 m s.l.m. (Maroli *et al.*, 1991).

Il ciclo biologico, che si svolge con una metamorfosi completa, prevede:

- femmina ematofaga che depone 80-100 uova, dopo aver compiuto un pasto di sangue;
- sviluppo delle uova attraverso quattro stadi larvali ed uno pupale, che necessita di un terreno umido, fresco, riparato dal sole e dalla pioggia, e ricco di materiale organico;
- trasformazione della pupa in adulto.

La durata del ciclo biologico è almeno di sei settimane e varia a seconda della temperatura e del fotoperiodo a cui sono esposti (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1999). I flebotomi adulti sono presenti dalla primavera all'autunno; l'inverno viene quindi superato dalle larve in diapausa.

Le femmine ematofaghe, dopo circa sette giorni dal pasto di sangue, depongono le uova, vengono poi rifecondate e necessitano perciò di un'altra suzione. Si nutrono mediante un processo chiamato telmofagia: attraverso il loro apparato boccale, provocano la formazione di un lago emolinfatico, da cui succhiano il nutrimento, nel derma del mammifero su cui si cibano. Nella loro saliva si trovano anticoagulanti e vasodilatatori, che facilitano il processo di telmofagia, ed altre sostanze, come immunosoppressivi, che facilitano lo sviluppo delle leishmanie eventualmente veicolate (Killick-Kendrick e Killick-Kendrick, 1999). Va ricordato che il parassita non viene trasmesso alle uova, per cui gli adulti che ne derivano non sono infetti.

I maschi non sono importanti ai fini della trasmissione della leishmaniosi, in quanto si nutrono di succhi vegetali.

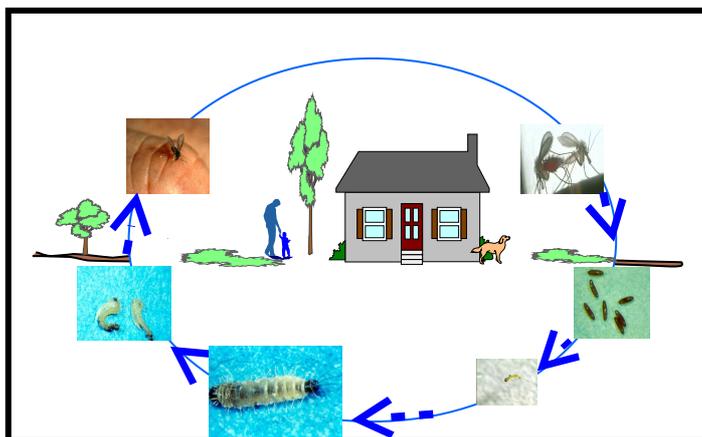


Fig.5: ciclo biologico del flebotomo
(Maroli, 2006).

Affinché un flebotomo sia definito “vettore provato” è necessario che soddisfi quattro requisiti: 1) deve essere sia antropofilo che zoofilo; 2) deve avere una distribuzione coincidente con quella della leishmaniosi; 3) il parassita, da esso isolato, deve avere lo stesso profilo enzimatico di quello che causa la malattia nel cane e nell’uomo; 4) deve essere dimostrato sperimentalmente essere in grado di trasmettere il parassita. In Italia sono due i flebotomi vettori provati di leishmaniosi: *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*.

P. perniciosus, storicamente presente con densità elevate nelle regioni della costa tirrenica e ionica, è stato negli ultimi anni rinvenuto anche in focolai dell’Emilia Romagna, Veneto, Valle d’Aosta, Piemonte e Lombardia (Capelli *et al.*, 2004). E’ reperibile sia in aree urbane, perturbane e rurali, che in ambienti domestici, peridomestici e selvatici; si nutre infatti su qualsiasi mammifero disponibile (Pozio *et al.*, 1985; Buongiorno *et al.*, 2002) ed è molto resistente alle condizioni ambientali non favorevoli. Inoltre, preferisce l’habitat costiero rispetto alle zone interne, come dimostrato da Maroli *et al.* (1980) in provincia di Grosseto, con un’elevata percentuale di flebotomi catturati sul Monte Argentario rispetto alla zona interna di Bacinello. Ha una distribuzione ubiquitaria, ciò fa sì che sia la specie maggiormente responsabile di diffondere il parassita in Italia. E’ sia antropofila che zoofila; è vettore provato di LCan, LVZ e LCS.

P. perfiliewi è diffuso soprattutto nel versante adriatico degli Appennini, dall’Emilia Romagna agli Abruzzi, ma è stato rinvenuto anche in focolai in Toscana, Calabria e Sicilia (Romi *et al.*, 1994). Si adatta poco all’habitat selvatico preferendo quello domestico; è essenzialmente zoofilo in quanto si nutre principalmente su bovini, galline, conigli e cani, più raramente sull’uomo. E’ il vettore sospetto di LCS (Maroli *et al.*, 1987), in quanto la sua distribuzione coincide con questa malattia. Inoltre, è stato considerato vettore di LVZ nel 1971-1972 in un focolaio in Emilia Romagna, zona nella quale *P. perniciosus* è poco presente (Killick-Kendrick *et al.*, 1977).

Un'altra specie, *P. neglectus*, è stata recentemente rinvenuta in diversi focolai del Nord Italia (Maroli et al., 2002a). Tale specie, reperita in diversi Paesi Europei, quali Albania, Grecia, Romania , ex Jugoslavia e ex USSR, è stata reperita per la prima volta in Italia nel 1977 e potrebbe avere un ruolo nella diffusione della LCan nel nord Italia (Maroli et al., 2002a).

SERBATOIO E SPECIE RECETTIVE

In Italia *L. infantum* è stata isolata da cani, volpi, uomini, gatti, ratti e solo in Sicilia da furetto (Brianti *et al.*, 2004).

Il cane è il principale serbatoio di leishmaniosi, in esso il parassita alberga sia a livello viscerale che cutaneo e la malattia ha un decorso cronico. I soggetti che si trovano in uno stadio avanzato dell'infezione risultano particolarmente infettanti per il vettore, ma anche i soggetti infetti, clinicamente sani (oltre il 50% dei cani leishmaniotici) albergano il parassita negli istiociti cutanei, fungendo così da serbatoio (Macrì, 1999).

La volpe potrebbe svolgere un ruolo nella diffusione dell'infezione nelle zone rurali dove, in relazione alle abitudini peridomestiche della stessa, può verificarsi uno stretto contatto tra cani, volpi e flebotomi; al contrario, in ambiente selvatico non sembra in grado né di diffondere l'infezione, né di mantenere un ciclo di trasmissione (Courtenay *et al.*, 2001).

Il ratto è stato ritrovato infetto in diversi Paesi (Italia, ex Jugoslavia, Spagna) (Gramiccia, 1997). Killick-Kendrick (2002) motiva la sua scetticità nel considerarlo serbatoio in quanto il ratto è un ospite poco attraente per il vettore, trasmette solo quando presenta sintomatologia, cioè in occasione di una caduta delle difese immunitarie, ed ha una vita breve.

Per quanto riguarda il gatto, diversi Autori hanno evidenziato sieropositività mettendo in evidenza soggetti sia sintomatici che asintomatici (Pennisi *et al.*, 2003; Brianti *et al.* 2004; Mancianti, 2004). Nei soggetti sintomatici sono frequenti le lesioni cutanee manifestate generalmente da ulcere crostose su labbra, naso, palpebre, padiglione auricolare e raramente sul tronco. In Italia la prima segnalazione di leishmaniosi felina da *Leishmania infantum* risale al 2002 (Poli *et al.*, 2002). Indagini sierologiche condotte in focolai delle regioni Toscana e Liguria, hanno evidenziato una prevalenza dello

0,9%, con titoli anticorpali bassi (Mancianti, 2004). Analoghe indagini sieroepidemiologiche condotte in Sicilia hanno evidenziato sieroprevalenze comprese tra il 59% e il 68% (Pennisi *et al.*, 1998; Pennisi *et al.*, 2000). Inoltre, nel corso di uno studio eseguito in Abruzzo è stata rilevata una prevalenza del 12,5% (Boari *et al.*, 2005). A tutt'oggi non è stato chiarito il ruolo epidemiologico del gatto, anche per la difficoltà di eseguire una xenodiagnosi volta a valutare l'infettività del gatto per i flebotomi.

L'uomo immunocompetente è un ospite a fondo cieco del parassita in quanto presenta una risposta immunitaria efficace che non permette la disseminazione del parassita nel circolo periferico e nel derma (Macrì, 1999). Al contrario, il paziente immunodepresso può rappresentare serbatoio di infezione per la particolare disseminazione del parassita a livello ematico (Gradoni, 1999).

Il furetto è ritenuto un ospite occasionale a fondo cieco.

LA LEISHMANIOSI IN ITALIA

Le leishmaniosi sono malattie parassitarie cosmopolite. La loro diffusione e distribuzione geografica è strettamente legata alla presenza dei vettori e dei serbatoi; tali combinazioni, che mantengono le varie specie di *Leishmania* nelle diverse aree territoriali, costituiscono le unità nosogeografiche (Ashford, 2000).

In Italia sono presenti due unità nosogeografiche della malattia:

- a. La leishmaniosi cutanea sporadica (LCS) umana, causata da ceppi dermatropi di *L. infantum*;
- b. la leishmaniosi viscerale zoonotica (LVZ), causata da ceppi viscerotropi di *L. infantum*.

Per la LVZ il cane è ritenuto il serbatoio dell'infezione, infatti gli stessi ceppi viscerotropi vengono isolati sia dal cane che dall'uomo. Lo stesso non si può dire per la LCS infatti, fino a poco tempo fa, l'uomo era considerato serbatoio. Studi recenti hanno messo in evidenza come anche il cane giochi un ruolo nella trasmissione di ceppi dermatropi. Questi ultimi però risultano di difficile isolamento in quanto, essendo piuttosto frequente la presenza di infezioni ceppi dermo/viscerotropi nel cane, vengono mascherati da ceppi viscerotropi, di più facile isolamento (Gramiccia e Gradoni, 2005).

La LCS è una patologia che ha un andamento sporadico e si ritrova nelle stesse aree in cui è presente la LVZ (Gradoni, 2001). Le regioni più colpite sono Sicilia e Sardegna. Le segnalazioni sono in aumento infatti nel 2000 (Favati *et al.*, 2000) venivano denunciati 20/30 casi all'anno, mentre nel 2004 si è passati a una settantina circa di segnalazioni.

Classi di età	0-14		15-24		25-64		>=65		ETA' NON NOTA			TOTALE			TOT.Leishmaniosi cutanea (Totale 2004)
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	N.N.	M	F	N.N.	
PIEMONTE	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
VALLE D' AOSTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LOMBARDIA	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
PROV. AUTON. BOLZANO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PROV. AUTON. TRENTO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VENETO	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0
FRIULI VENEZIA GIULIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIGURIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EMILIA ROMAGNA	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
TOSCANA	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0
UMBRIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MARCHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAZIO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ABRUZZO	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MOLISE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAMPANIA	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0
PUGLIA	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
BASILICATA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CALABRIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SICILIA	4	2	1	1	20	5	1	5	0	1	0	26	14	0	40
SARDEGNA	1	2	0	1	3	3	0	0	0	0	0	4	6	0	10
ITALIA	7	6	1	2	30	11	2	8	1	1	0	41	28	0	69

Fig.6: dati nazionali dei casi notificati di LCS nell'anno 2004 (Bollettino Epidemiologico Nazionale)

Classi di età	0-14		15-24		25-64		>=65		ETA' NON NOTA			TOTALE			TOT. Leishmaniosi viscerale (Totale 2004)
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	N.N.	M	F	N.N.	
PIEMONTE	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
VALLE D' AOSTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LOMBARDIA	2	1	1	0	3	0	1	0	0	0	0	7	1	0	8
PROV. AUTON. BOLZANO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PROV. AUTON. TRENTO	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
VENETO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
FRIULI VENEZIA GIULIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIGURIA	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	3	0	4
EMILIA ROMAGNA	1	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	6	0	0	6
TOSCANA	0	1	1	0	4	3	1	0	0	0	0	6	4	0	10
UMBRIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MARCHE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAZIO	1	3	3	0	8	7	1	0	0	0	0	13	10	0	23
ABRUZZO	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	3	2	0	5
MOLISE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAMPANIA	14	9	1	0	19	7	2	0	1	0	0	37	16	0	53
PUGLIA	1	2	0	0	3	0	1	0	0	0	0	5	2	0	7
BASILICATA	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	2
CALABRIA	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0	0	5	1	0	6
SICILIA	12	9	2	0	12	3	1	2	1	1	0	28	15	0	43
SARDEGNA	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5
ITALIA	32	29	11	0	61	21	13	4	3	1	0	120	55	0	175

Fig.7: dati nazionali dei casi notificati di LVZ nell'anno 2004 (Bollettino Epidemiologico Nazionale)

Più grave risulta la situazione epidemiologica della LVZ (vedi Fig7). La prevalenza di LVZ, un tempo abbastanza alta, ha subito un drastico calo dopo la seconda guerra mondiale grazie al rapido miglioramento delle condizioni sanitarie e nutrizionali della popolazione umana (Ashford, 2000), i rari casi riguardavano per lo più bambini e anziani, soggetti immunologicamente più deboli. Dalla metà degli anni Ottanta si è assistito ad un nuovo incremento dei casi adulti (Maroli, 1999), derivante dai cambiamenti climatici favorenti il flebotomismo, dalla difficoltà di eradicare la malattia nei cani e, soprattutto, dal notevole aumento degli individui immunocompromessi, in relazione alla massiccia diffusione dell'HIV e all'uso di terapie immunosoppressive post-trapianto, che ha portato a registrare oltre 200 casi di LVZ nel 2000 (vedi Fig.8).

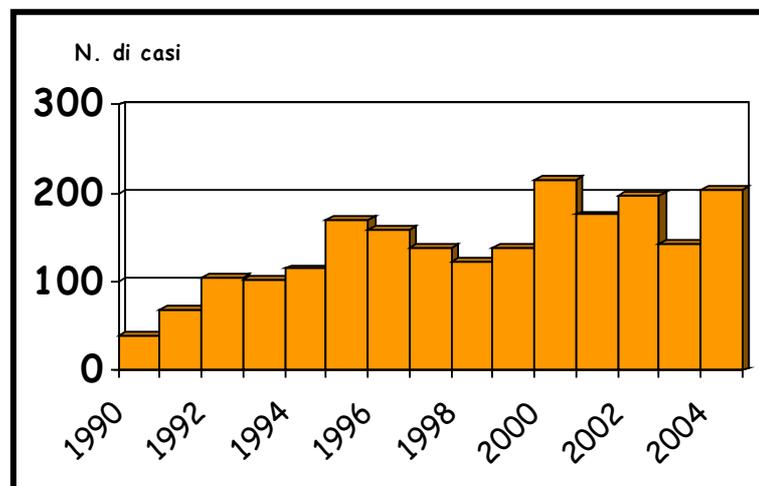


Fig.8: casi di LVZ diagnosticati in Italia (Gradoni, ISS)

In conseguenza però all'utilizzo delle nuove terapie anti-HIV, alla fine degli anni Novanta, si è assistito ad un calo delle co-infezioni *Leishmania*/HIV passando da una trentina di casi a 5-6 casi all'anno registrati nel 2002-2003 (vedi Fig. 9).

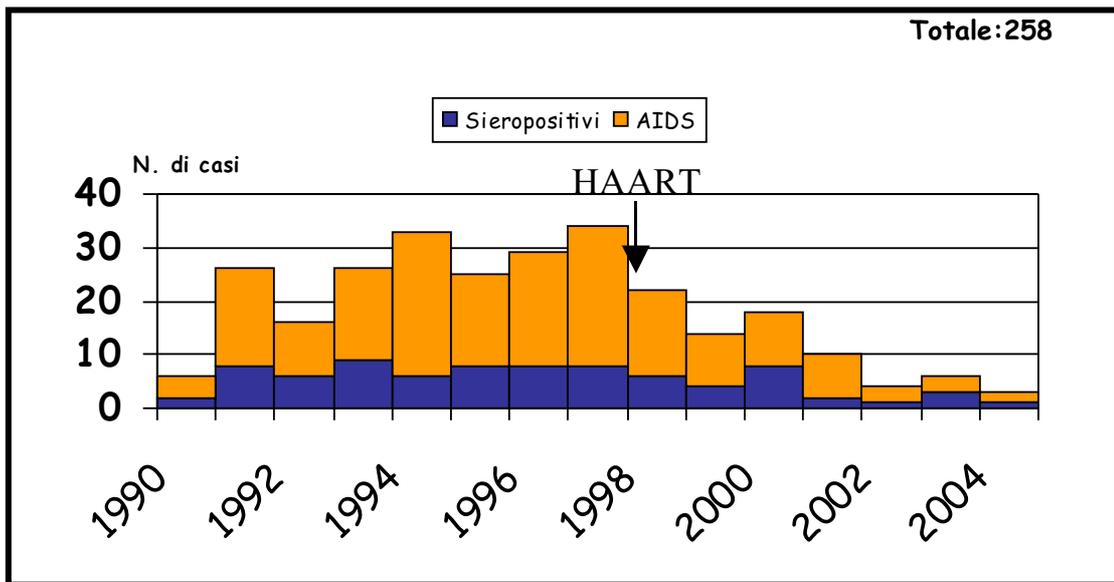


Fig.9: confezioni HIV-*Leishmania* registrate in Italia (Gradoni, ISS)

La LVZ e la LCan hanno una distribuzione sovrapponibile (Bettini e Gradoni, 1986; Maroli, 2004). Generalmente all'interno dei focolai endemici di LCan, i casi di LVZ presentano una distribuzione sporadica. Situazione particolare è rappresentata dal focolaio campano (vedi Fig.10), particolarmente accentrato nell'area circumvesuviana, dove ogni anno vengono accertati una sessantina di nuovi casi di malattia, soprattutto in adulti immunocompetenti, che va a costituire il più importante focolaio del Mediterraneo. Analisi isoenzimatiche hanno evidenziato che gli zimodema identificati nel focolaio sono per il 48% dei casi il MON1 e per il 52% il MON72, quest'ultimo presente unicamente in questa area. Oltre che nell'uomo è stato isolato anche nel cane e nel flebotomo (Gradoni *et al.*, 1996). L'elevata incidenza osservata in questa zona non sembra essere dovuta ad un aumento della suscettibilità da parte della popolazione, come accade in corso di patologie immunodepressive, ma si presume essere causata dalla densità demografica che si riscontra in tale area (13.595 kmq per 5.792.580 abitanti). Risulta inoltre, essere elevata la popolazione canina, soprattutto i cani randagi (150.000), e la presenza dei vettori (22 esemplari per mq in alcuni siti di cattura) (Baldi *et al.*, 2004).

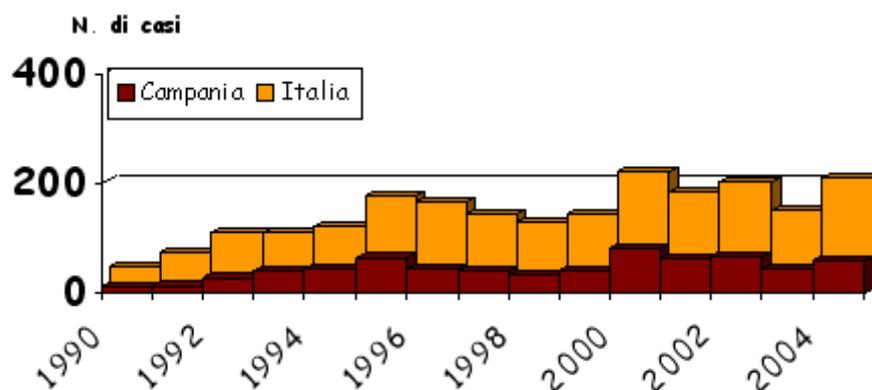


Fig. 10: Leishamniosi viscerale in Italia in Campania (Gradoni, ISS)

Per quanto riguarda la LCan aree tradizionalmente endemiche sono: tutte le zone rurali o perturbane della fascia costiera tirrenica e nelle aree collinari ad ovest della dorsale appenninica fino ad una altitudine di 500-600 m s.l.m.; le regioni costiere e sub-appenniniche dello Ionio e del basso Adriatico, fino al Gargano; le isole maggiori e minori. Altri focolai sono stati riscontrati nel medio ed alto Adriatico e, più in generale, ad est della dorsale appenninica dell'Italia centro-settentrionale. In tali aree la distribuzione è classicamente a “macchia di leopardo”, con aree di infezione a bassa prevalenza accanto ad aree ad alta prevalenza (Gradoni, 1996).

Focolai “primato” si sono riscontrati ad Ustica, con una prevalenza del 37% (Mansueto *et al.*, 1982), nel promontorio del Monte Argentario e all'isola d'Elba con prevalenze rispettivamente del 24% (Gradoni *et al.*, 1980) e del 19% (Mancianti *et al.*, 1986).

Il Nord Italia, fatta eccezione per la Liguria e parte dell'Emilia Romagna, fino agli anni '80 risultava indenne da LCan, i rari casi osservati si riferivano ad animali che provenivano o avevano soggiornato in aree endemiche (Capelli *et al.*, 2004).

Nell'ultimo ventennio l'areale di distribuzione di questa malattia si è notevolmente modificato e tuttora sta cambiando. La maggior movimentazione dei cani, da e verso aree endemiche, funge da innesco di nuovi focolai mantenuti dalla presenza dei vettori; questi

ultimi inoltre, sembrano favoriti dai cambiamenti climatici, che oltre a spostare la loro distribuzione a latitudini sempre maggiori, ne prolungano l'attività.

A partire dagli anni novanta, si è rilevato un aumento della consistenza e del numero dei focolai nelle aree storicamente endemiche. Prendiamo come esempio gli ultimi dati relativi alla situazione in Umbria: indagini sierologiche effettuate nel 2003-2004 su 1204 cani hanno evidenziato una prevalenza complessiva del 16%, con aumento dell'incidenza in entrambe le province controllate (Diaferia *et al.*, 2005). Spostandoci più a Sud possiamo considerare la situazione nel Lazio dove, nella provincia di Roma, recenti indagini epidemiologiche hanno evidenziato la presenza di un nuovo focolaio caratterizzato da una prevalenza di infezione del 38,4% (Rossi *et al.*, 2004).

Per quanto concerne la situazione in Campania, oltre ai focolai stabili da tempo conosciuti se ne sono recentemente aggiunti altri aventi carattere ectopico (creati dall'uomo per spostamenti di animali) o ad endemia stabile (Baldi *et al.*, 2004).

Ma la vera novità è rappresentata dai focolai autoctoni segnalati nelle regioni del Nord Italia. Nel 1993 viene descritto il primo focolaio nella regione Veneto, in una piccola area della Volpolicella, in provincia di Verona (Poglayen *et al.*, 1997; Capelli *et al.*, 2004, Natale *et al.*, 2005). Successivi approfondimenti epidemiologici hanno messo in evidenza come, da tale focolaio, l'infezione si sia propagata sia verso nord-est che verso nord-ovest; le indagini entomologiche hanno evidenziato la presenza di due specie di flebotomi: *P. perniciosus* e *P. neglectus*, quest'ultimo evidenziato per la prima volta nel Nord Italia (Maroli *et al.*, 1995; Maroli *et al.*, 2002a).

A partire dal 1998 la LCan fa la sua comparsa in Piemonte quando diversi casi vengono segnalati in provincia di Torino. Otto di questi, localizzati in una zona collinare limitrofa alla città, si confermano casi autoctoni (Rossi *et al.*, 1999). Tale focolaio nel tempo si è stabilizzato

ed ampliato e successive indagini hanno messo in evidenza casi autoctoni anche nei comuni di Moncalieri, Ivrea, Casale Monferrato, Biella, Cuneo, Alessandria e in provincia di Aosta (Ferroglio *et al.*, 2002; Maroli *et al.*, 2002a; Ferroglio *et al.*, 2005). In tale area è stata osservata la presenza di vettori appartenenti alle specie *P. perniciosus* e *P. perfliewi* ma non è possibile sapere se tali specie siano sempre state presenti nel territorio o se siano di recente introduzione.

Relativamente alla situazione in Emilia Romagna, a partire dagli anni ottanta con sempre maggior frequenza vengono osservati casi autoctoni di LCan (Baldelli e Di Francesco, 1992; Baldelli e Di Francesco, 1997); in particolare ricordiamo un focolaio autoctono stabile di LCan in provincia di Rimini, concentrato in un'area collinare fra i comuni di Saludecio e San Giovanni in Marignano, dove sono state rilevate prevalenze rispettivamente del 6,2 e del 2,9% e dove è stata rilevata la presenza preponderante di *P. perfliewi*, rispetto a *P. perniciosus*, caratteristica costante dei focolai emiliano-romagnoli (Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001). Un altro focolaio autoctono, ad andamento endemico, è stato messo in evidenza nei comuni di Castel San Pietro e Ozzano Emilia (Bo). Tale territorio era stato interessato negli anni settanta da un focolaio di LVZ che registrò 58 casi, a cui se ne aggiunsero altri 2 in provincia di Modena e Reggio Emilia provocando 13 morti (Pampiglione *et al.*, 1974). Non fu possibile accertare l'origine dell'epidemia, in quanto non si ottennero isolamenti né dal cane né da animali selvatici, ma fu solo accertata la positività sierologica in cani residenti nella medesima area (Mantovani *et al.*, 1982). Fu inoltre osservata la presenza di flebotomi vettori, quali *P. perfliewi* (in maggior numero) e *P. perniciosus* (Killick-Kendrick *et al.*, 1977).

Uno studio epidemiologico condotto in tali comuni per due anni consecutivi ha messo in evidenza nel 2001 prevalenze di infezione pari al 2,7% nel comune di Ozzano Emilia e al 4,3% nel comune di Castel San Pietro. Nel 2002 ad Ozzano Emilia è stato evidenziato un

aumento della prevalenza all'11,25% con un tasso di incidenza del 9,3% (Mollicone *et al.*, 2002; Mollicone *et al.*, 2003; Mollicone e Baldelli, 2003).

Sulla scorta di queste segnalazioni, alla fine del 2002, grazie alla collaborazione e al supporto di Intervet Italia, nasce il network scientifico denominato *LeishMap*TM che si pone come obiettivo principale quello di monitorare la diffusione della LCan e dei vettori nel nord Italia per il biennio 2003-2005. *LeishMap*TM è formato da quattro unità operative coordinate dal Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale) dell'Istituto Superiore di Sanità con la collaborazione di numerosi veterinari pubblici e privati delle regioni di competenza. Nella figura 11 viene schematizzata la struttura del network e i principali ricercatori e istituzioni coinvolti.

Gli obiettivi del *LeishMap*TM sono tre:

1. identificare i nuovi casi autoctoni di LCan che si presentano nel Nord Italia, attraverso una sorveglianza epidemiologica continua nei due anni di studio;
2. valutare la presenza e la densità dei vettori in questi focolai, attraverso indagini entomologiche da svolgersi nelle due stagioni di attività dei flebotomi;
3. verificare l'espansione dei focolai stabili di LCan identificati negli anni precedenti (Capelli *et al.*, 2004).



Fig. 11: struttura del network *LeishMap*TM
(www.intervet.it)

Duranti i due anni di sorveglianza sono stati controllati circa 6600 cani di cui 177 (2,7%) sono risultati positivi in IFI per LCan. Di questi, 118 animali (l'1,8% dell'intero campione esaminato) sono risultati essere casi autoctoni di LCan, in quanto è stato possibile accertare che nessuno di questi animali si era spostato dalla sede di residenza.

La nascita del network scientifico *LeishMap*TM e le indagini che ne sono seguite, hanno evidenziato un nuovo quadro epidemiologico con interessamento di tutte le regioni del Nord Italia (Rossi *et al.*, 2005).

In particolar modo sono stati identificati nuovi focolai autoctoni di LCan in Lombardia e in Trentino-Alto Adige. In Veneto è stato confermato il focolaio nella provincia di Verona e ne è stato individuato uno nuovo nella provincia di Treviso.

Ulteriori focolai, già conosciuti o sospetti sono stati confermati in Valle d'Aosta e Piemonte. Relativamente alla situazione in Emilia Romagna sono stati individuati nuovi focolai per la cui trattazione si rimanda alla parte sperimentale.

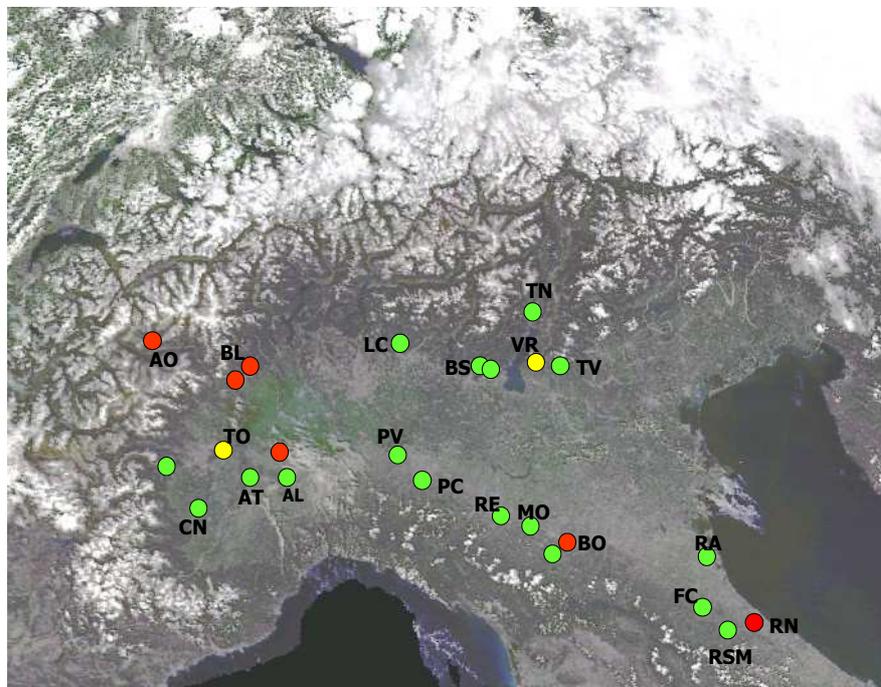


Fig.12: distribuzione focolai nel Nord Italia. In **giallo** i focolai segnalati nella seconda metà degli anni Novanta, in **rosso** i focoli segnalati prima del 2003, in **verde** quelli segnalati dopo il 2003. (Rossi *et al.*, 2005 modificato).

Per quanto riguarda l'indagine entomologica, in tutte le aree sotto sorveglianza, ad eccezione di pochi focolai intorno a Bologna e nella Repubblica di San Marino, è stata accertata la presenza di *P. perniciosus*, associato in alcuni focolai delle zone prealpine, a *P. neglectus*, che potrebbe ulteriormente contribuire al mantenimento dell'endemicità della LCan in questi focolai. Il monitoraggio entomologico nei focolai dell'Emilia Romagna ha ribadito l'associazione di *P. perniciosus* ad abbondanti popolazioni di *P. perfiliewi*, anch'esso vettore provato in Italia.

PATOLOGIA E CLINICA

1. Patogenesi.

Le leishmanie vengono inoculate negli spazi intercellulari del derma dal flebotomo, il quale non si limita a eseguire meccanicamente la trasmissione ma, tramite la saliva, facilita il processo di infezione. Questa, infatti, è composta da sostanze immuno-modulanti, inibenti la coagulazione e vasodilatanti (Ribeiro, 1995; Norworthy *et al.*, 2004). I promastigoti metaciclici penetrano nelle cellule della linea monocitico- macrofagica e si trasformano in amastigoti che replicano fino a provocare la lisi delle cellule infette. La disseminazione nello spazio intercellulare è seguita dalla localizzazione in altre cellule della serie istiocito-macrofagica, portando alla diffusione dell'infezione nell'organismo. I promastigoti che rimangono liberi nel derma vengono uccisi per mezzo della lisi mediata dal complemento (Kontos e Koutinas, 1993).

L'evoluzione dell'infezione dipende da tre fattori:

- 1- dalla capacità delle leishmanie di penetrare nei macrofagi;
- 2- dalla capacità del parassita di vivere e replicare all'interno dei macrofagi;
- 3- dal tipo di risposta immunitaria che si sviluppa nell'ospite.

Relativamente alla capacità delle leishmanie di penetrare nei macrofagi, questa viene favorita dai promastigoti stessi che a livello di derma entrano in contatto con il sistema immunitario ed attivano la via classica del complemento. La frazione C3 si fissa ai lipofosfolipici di superficie e tramite una glicoproteina ad azione proteolitica, presente sulla membrana parassitaria (gp63), viene accelerata la conversione della frazione C3b in C3bi (Corazza *et al.*, 1999). Quest'ultima frazione funge da opsonina e facilita il legame dei promastigoti con i recettori per il complemento CR3 e CR1 dei macrofagi. In tal modo le leishmanie penetrano nelle cellule del SRE e questo processo favorisce la loro sopravvivenza in quanto evita il

contatto prolungato con il complemento attivato e con gli anticorpi. Inoltre il legame con i recettori CR3 e CR1 non attiva, nei macrofagi, il “burst” respiratorio che porterebbe alla produzione di metabolici tossici dell’ossigeno dannosi per il parassita (Bogdan e Röllinghoff, 1998).

La sopravvivenza all’interno delle cellule monocitico- macrofagiche dipende da diverse molecole costituenti di superficie del parassita o molecole da esso secrete. I principali sono: i **lipofosfoglicani (LPG)** che sono in grado di inibire il “burst” respiratorio, bloccando gli enzimi coinvolti nella generazione di metaboliti ossidativi e di neutralizzare i radicali dell’ossigeno impedendo la loro trasformazione in radicali idrossilici altamente tossici per il parassita (Corazza *et al.*, 1999). Le **proteasi di superficie**, di cui la più importante è la gp63, che insieme ai LPG modula le fasi di ingresso all’interno dei macrofagi, inattiva gli enzimi proteolitici dell’ospite e impedisce la degradazione fagolisosomiale rendendo l’amastigote altamente specializzato a vivere nell’ambiente acido del fagolisosoma macrofagico (Bogdan e Röllinghoff, 1998). Relativamente agli enzimi secreti ricordiamo le fosfatasi acide, prodotte sia dagli amastigoti che dai promastigoti, in grado di bloccare la produzione di perossido di idrogeno e ossigeno; la **glutazione perossidasi**, la **superossido dismutasi** e la **catalasi**, prodotte dagli amastigoti, che degradano i metabolici tossici derivanti dai processi ossidativi dei macrofagi (Corazza *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda il tipo di risposta immunitaria evocata nell’ospite, il parassita, all’interno del macrofago, viene processato ed esposto, in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di II classe (MHC II) ai linfociti. Per l’evoluzione dell’infezione è fondamentale il tipo di linfocita che viene attivato che varia appunto in funzione delle modalità di presentazione dell’antigene (Ferrer, 2002).

Nei soggetti che presentano la malattia prevale una risposta immunitaria evocata dai linfociti T helper 2 (Th2), che producendo

diverse interleuchine (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) deprimono la risposta immunitaria cellulo-mediata, riducono la capacità dei macrofagi di lisare le cellule parassitarie e stimolano una risposta immunitaria di tipo umorale, inefficace per contenere l'infezione (Day, 2004). Gli anticorpi così prodotti non solo non sono neutralizzanti nei confronti del parassita, ma hanno una funzione opsonizzante, ciò facilitano l'entrata del parassita nei macrofagi favorendone così la diffusione nell'organismo. La produzione di anticorpi diventa con il passare del tempo aspecifica e policlonale determinando il deposito immunocomplessi responsabile di diverse patologie (vasculiti, glomerulonefriti, uveiti, poliartriti e altre) e l'instaurarsi di fenomeni autoimmuni (Scarpella e Noli, 2000; Ruitenber *et al.*, 2001; Ferrer, 2002, Urquhart *et al.*, 2002).

Nei soggetti resistenti alla malattia si osserva una risposta immunitaria caratterizzata dalla prevalenza di linfociti T helper 1 (Th1) responsabili della produzione di interferone γ (INF γ), interleuchina 2 e 12 (IL-2, IL-12) e fattore di necrosi tumorale α (TNF α). L'insieme di queste citochine stimola lo sviluppo di una risposta immunitaria cellulo-mediata che risulta protettiva nei confronti della malattia. In particolare modo l'IL-12 e gli antigeni parassitari attivano i linfociti natural killer che producono grandi quantità di INF γ . L'INF γ attiva nei macrofagi la produzione di monossido di azoto che, assieme all'ione superossido hanno un'azione molto efficace nella lisi delle leishmanie. Quando si instaura questa tipologia di risposta i parassiti rimangono confinati nella cute o, al massimo, raggiungono i linfonodi tributari (Ferrer, 2002).

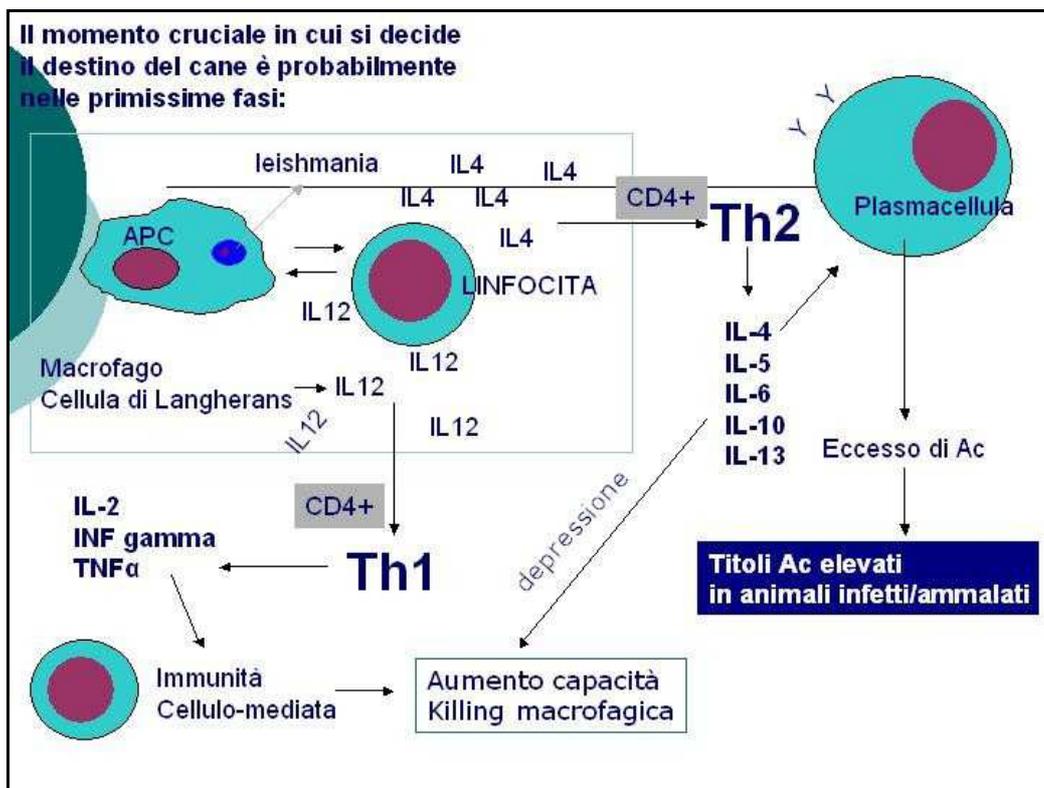


Fig.13: schema rappresentante l'evoluzione dell'infezione in relazione alla risposta immunitaria evocata nell'ospite (Oliva, 2006).

2. Quadro clinico.

La leishmaniosi canina (LCan) è una reticolo-endoteliosi sistemica ad andamento cronico progressivo, caratterizzata da un quadro clinico polimorfo che si verifica in meno del 50% degli animali infetti (Oliva, 2004a). La notevole variabilità dei sintomi, la loro apparenza e gravità dipendono dai numerosi meccanismi patogenetici coinvolti nell'insorgenza della malattia, dal tipo di risposta immunitaria che si sviluppa nell'ospite e dallo stadio evolutivo della patologia (Ferrer, 1999; Oliva 2004).

Nonostante la stagionalità della trasmissione della malattia, la sintomatologia può esordire in ogni periodo dell'anno in quanto si

manifesta dopo un periodo di incubazione variabile, da un minimo di tre mesi ad un massimo di sette anni o più (Ferrer, 2002).

Negli animali suscettibili non esiste organo o apparato indenne dalla localizzazione del protozoo o da alterazioni indirette da esso provocate (Marcato, 2002).

Di seguito elenco i sintomi che possiamo osservare con le relative prevalenze, senza considerare quelli che si verificano con una prevalenza inferiore al 4% (Noli, 1999):

- ✓ linfadenomegalia (71,2- 96,1 %)
- ✓ lesioni cutanee (75- 89 %)
- ✓ pallore delle mucose (58- 94,2 %)
- ✓ perdita di peso (30,7- 70 %)
- ✓ onicogrifosi (24- 54 %)
- ✓ febbre (23- 70 %)
- ✓ letargia (18-70 %)
- ✓ disoressia /18- 70%)
- ✓ splenomegalia (15- 53,3 %)
- ✓ insufficienza renale (16- 32%)
- ✓ lesioni oculari (16- 50 %)
- ✓ epistassi (10- 37 %)
- ✓ artropatie (4- 6,4%)



Fig.14: immagine di un cane leishmaniotico

Recentemente sono state valutate le modificazioni del midollo osseo in cani leishmaniotici: sono stati analizzati citologicamente aspirati midollari di 15 cani naturalmente infetti da *L. infantum*. Da tale studio è emerso come la displasia magacariocitica quella eritroide e l'eritrofagocitosi siano reperti patologici comuni in corso di leishmaniosi (Foglia Manzillo *et al.*, 2006).

Secondo alcuni Autori (Oliva *et al.*, 1996) l'efficacia della chemioterapia è inversamente proporzionale al grado di compromissione clinica mentre l'infettività per il vettore è direttamente proporzionale al grado di compromissione clinica. In considerazione di ciò e con lo scopo di fornire inoltre un aiuto nella diagnosi e nella terapia, è stata proposta una classificazione dei cani leishmaniotici in quattro gruppi clinici (Oliva, 2004a):

1. Cani asintomatici resistenti. In questi soggetti la risposta immunitaria è di tipo cellulo- mediata. Non presentano segni clinici riferibili a leishmaniosi e i profili ematologici e biochimici sono inalterati. L'esame citologico dei linfonodi e midollo da esito negativo, all' immunofluorescenza indiretta (IFI) presentano titoli anticorpale variabili, in genere bassi (1/40- 1/80). I risultati dell'esame colturale e della PCR possono variare, con possibilità di negativizzazione temporanea e definitiva. Al contrario, il test intradermico da sempre esito positivo. Generalmente i cani asintomatici resistenti rimangono tali a vita e non necessitano di alcun trattamento farmacologico.

2. Cani asintomatici preclinici. In questi soggetti si instaura una risposta immunitaria sia cellulo- mediata che umorale (solitamente con il passare del tempo la risposta umorale prevale su quella cellulo- mediata). Non presentano segni clinici e alterazioni biochimiche ed ematologiche riferibili a leishmaniosi, ma generalmente l'esame citologico da esito positivo. Vengono costantemente rilevati in IFI

titoli anticorpali $\geq 1/80$ e positività si riscontrano anche in PCR e all'isolamento colturale. Il test intradermico da risultati variabili. Questi animali presenteranno in futuro segni clinici riferibili a leishmaniosi e costituiscono un serbatoio attivo del parassita, pertanto vanno trattati farmacologicamente.

3. Cani con segni clinici minimi persistenti. Sono animali che manifestano una risposta immunitaria umorale, nei quali si osservano lievi segni clinici e i parametri ematobiochimici risultano inalterati. Gli esami colturali e citologici da midollo e linfonodi risultano negativi, mentre l'isolamento a partire dalla cute da spesso esito positivo. Presentano all'IFI titoli anticorpali variabili, generalmente bassi, come pure risulta variabile il test intradermico e la positività in PCR. Tali cani dovrebbero essere sottoposti a terapia farmacologica.

4. Cani sintomatici. Si tratta di soggetti che sviluppano una risposta immunitaria umorale, manifestando evidenti segni clinici. Il profilo ematobiochimico è alterato, l'esame citologico è positivo, come la PCR e l'isolamento colturale. All'IFI si evidenziano titoli anticorpali elevati ($\geq 1/160$), il test intradermico risulta negativo. Questi animali dovrebbero essere trattati farmacologicamente.

Questa classificazione mette in evidenza come risulti importante discriminare, tra i soggetti asintomatici, quelli resistenti da quelli preclinici. Infatti, mentre i primi probabilmente non svilupperanno mai la malattia e non sono serbatoio, i secondi, oltre a manifestare nel tempo segni clinici, costituiscono una fonte di infezione per il vettore. Da qui la necessità di individuarli, utilizzando le diverse tecniche diagnostiche, e sottoporli ad adeguato trattamento farmacologico.

DIAGNOSI

La diagnosi di LCan presenta a tutt'oggi notevoli carenze ma un'accurata identificazione dei casi è auspicabile sia per la sorveglianza e il controllo della LVZ, sia per la gestione dei singoli casi nel cane.

1. Diagnosi clinica e differenziale.

Una diagnosi basata solo sui segni clinici è impensabile in quanto più del 50% dei cani leishmaniotici è asintomatico. Inoltre, il corredo sintomatologico è estremamente polimorfo e soggettivo e sono sempre più frequenti le forme atipiche della malattia. In diagnosi differenziale dobbiamo mettere un elevato numero di patologie tra cui rivestono primaria importanza quelle ad interessamento cutaneo quali: demodicosi, dermatofitosi, lupus eritematoso sistemico, pemfigo fogliaceo, ipotiroidismo, dermatosi zinco-prive, forme cutanee nodulari (mastocitomi, istiocitomi, linfomi cutanei). Sono da considerarsi inoltre, l'erlichiosi, la rickettsiosi e l'epatozoonosi.

2. Diagnosi di laboratorio.

la diagnosi di laboratorio risulta indispensabile sia per la conferma di un caso clinico che per l'individuazione di soggetti infetti asintomatici. La pratica laboratoristica si avvale di esami aspecifici, che ci conducono ad un fondato sospetto di leishmaniosi ed esami specifici che ci portano alla diagnosi di certezza.

2.1. Esami aspecifici.

Sono esami di routine che permettono di evidenziare sofferenze ad organi o apparati correlabili con la malattia. Hanno anche l'utilità, attraverso controlli nel tempo, di fornire le condizioni dinamiche del paziente e di apprezzare la risposta alla terapia.

- Esame emocromocitometrico: mette in evidenza alterazioni quali anemie, generalmente arigenerative normocromiche e normocitiche (Kontos e Koutinas, 1993); trombocitopenie generalmente associate a riduzione della capacità aggregante delle piastrine (Corona *et al.*, 2003); neutrofilie, solitamente dovute a lesioni secondarie cutanee o renali (Ciaramella *et al.*, 1997).
- Velocità di eritrosedimentazione (VES): l'aumento di questo parametro in corso di leishmaniosi è dovuto alla formazione di aggregati eritrocitari, che hanno una velocità di caduta nel plasma maggiore delle singole emazia. La formazione di tali aggregati è dovuta principalmente alla presenza di immunocomplessi sulla membrana dei globuli rossi e all'aumento delle β e γ globuline.
- Esame ematobiochimico: rileva alterazioni di alcuni parametri quali, protidemia, creatinemia, azotemia e degli enzimi epatici. Le proteine totali, in cani affetti da leishmaniosi possono superare i 10 g/dl (valore normale: 6 g/dl) (Urquhart *et al.*, 2002), anche se nel caso di grave compromissione renale possono scendere al di sotto della norma. Eseguendo un protidogramma (tracciato elettroforetico) si evidenzia iperglobulinemia, ipoalbuminemia ed inversione del rapporto albumine/globuline (Ciaramella *et al.*, 1997). L'iperglobulinemia si manifesta con un aumento delle β e γ globulina dovuto ad un aumento di immunoglobuline aspecifiche e di auto-anticorpi (Kontos e Kountinas, 1993).

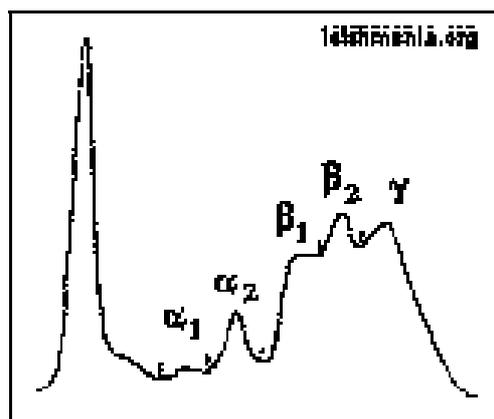


Fig.15: protidogramma di un cane leishmaniotico (leishmania.org)

L'ipoalbuminemia è causata da un feed back negativo indotto dall'iperglobulinemia, da un ridotto assorbimento enterico, da una minor sintesi epatica e dalla loro perdita attraverso l'emuntorio renale. Come conseguenza dell'iperglobulinemia e dell'ipoalbuminemia, il rapporto globulina/albumine, che normalmente è di circa 1, si abbassa fino a 0,4- 0,1. La sieroelettroforesi è fondamentale per il monitoraggio dell'andamento della parassitosi in corso di terapia; inoltre il controllo periodico del protidogramma permette di individuare precocemente le recidive in animali trattati (Marini *et al.*, 1994). Relativamente ai valori di creatinemia e azotemia, questi aumentano quando il danno renale interessa almeno il 75% dei nefroni. La rilevazione di variazioni di questi parametri in corso di leishmaniosi è importante come dato prognostico e terapeutico, infatti in caso di ipofunzionalità renale, prima di agire con specifica terapia, o contemporaneamente a essa, è necessario istaurare un'idonea terapia di supporto. Per quanto riguarda gli enzimi epatici, un loro aumento va considerato in quanto può suggerire un trattamento terapeutico con dosaggi ridotti e diluiti nel tempo.

- Esame delle urine: è in grado di rilevare, in cani con nefropatia asintomatici, proteinuria e talvolta cilindruria.

2.2. Esami specifici.

Permettono di fare diagnosi evidenziando direttamente il parassita oppure indirettamente, rilevando la risposta immunitaria da questo stimolata.

A) Esami diretti

Sono gli unici che, se positivi, ci permettono di enunciare diagnosi certa di leishmaniosi. Se negativi, però, non ci permettono di escludere sempre la malattia, in quanto il parassita potrebbe non essere rilevabile, se presente in numero esiguo nell'animale infetto.

METODI PARASSITOLOGICI

Permettono di evidenziare il parassita nella forma amastigote nei tessuti o negli organi degli animali, oppure in forma promastigoti in coltura. Sono test che possiedono una specificità del 100% ma una scarsa sensibilità (Scarampella e Noli, 2000). Viste tali caratteristiche, non rappresentano l'esame migliore per effettuare screening di massa, per i quali si preferisce utilizzare test altamente sensibili. I campioni da analizzare vengono prelevati solitamente tramite biopsia, in rari casi all'autopsia. I prelievi bioptici effettuabili nel cane sono l'aspirazione con ago sottile dai linfonodi superficiali, prescapolari o poplitei e il prelievo midollare realizzabile a livello di testa del femore, ala iliaca, epifisi prossimale della tibia e sterno; meno frequente è l'impressione da lesioni ulcerative e il prelievo da derma cutaneo.

Tra gli esami parassitologici ricordiamo:

- **Esame citologico.** Il materiale ottenuto da prelievi bioptici o autoptici viene strisciato su un vetrino, fissato con metanolo e colorato con la metodica Giemsa (OIE, 2004). L'osservazione al microscopio, a 600-1000 ingrandimenti, permette di evidenziare gli amastigoti all'interno dei macrofagi o liberi negli spazi extracellulari. L'osservazione deve essere molto accurata in quanto il numero di parassiti potrebbe essere molto basso (Ferrer, 1999) e viene considerato negativo un vetrino in cui non è stato trovato alcun parassita in 1000 campi microscopici. Secondo un recente studio, l'evidenziazione di un

esame citologico positivo è molto più comune in cani affetti da leishmaniosi clinica che in soggetti subclinici, tuttavia non esiste una correlazione tra densità di amastigoti e gravità della malattia (Mylonakis *et al.*, 2005).

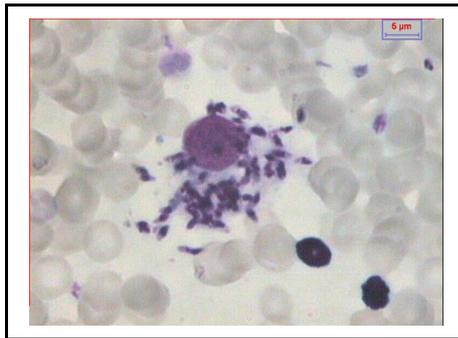


Fig. 16: preparato citologico positivo per *L. infantum*.

- **Esame istologico.** Da materiale autoptico o bioptico si può allestire un preparato istologico, successivamente colorato con ematossilina-eosina. Come per l'esame citologico, con un'attenta osservazione al microscopio è possibile evidenziare i macrofagi parassitari

Per aumentare la sensibilità dell'esame citologico e istologico sono state introdotte tecniche immunoistochimiche e immunocitochimiche, con identificazione selettiva del parassita (Scarampella e Noli, 2000).

- **Esame colturale.** Ha lo scopo di ampliare il numero di parassiti originariamente presenti nei prelievi, risultando quindi molto utile qualora l'esame microscopico risulti negativo, ma persista il sospetto di infezione. Per la coltivazione di *Leishmania sp.* si utilizzano terreni difasici. Sono costituiti da una fase solida, addizionata di sangue defibrinato di coniglio, e una fase liquida, addizionata di antibiotici per prevenire la crescita batterica, all'interno della quale i parassiti si moltiplicano. Tra questi tipi di terreni ricordiamo il terreno di Tobie modificato da Evans (EMTM), il Novy McNeile Nicolle

(NNN) oppure il terreno *Brain-heart infusion* (BHI). Lo sviluppo dei promastigoti richiede come minimo 7 giorni di incubazione a 23°C, dopodiché la loro replicazione avviene lentamente. E' un test dotato di una specificità del 100% ma di una scarsa sensibilità; è infatti di non facile esecuzione per l'estrema sensibilità delle leishmanie alle variazioni delle condizioni di crescita (temperatura, composizione di terreni, inquinamento batterico e fungino) e viene quindi eseguito esclusivamente da laboratori specializzati. L'isolamento di ceppi di leishmania mediante esame colturale, ne permette la successiva tipizzazione isoenzimatica, di notevole importanza per gli studi epidemiologici.

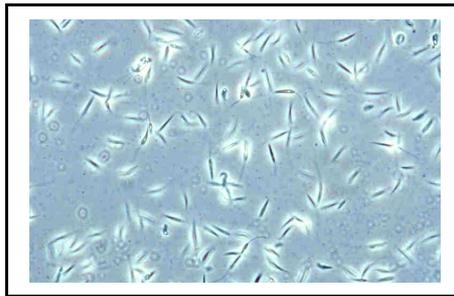


Fig.17: promastigoti di *L.infantum* in coltura (www.pasteur.it).

METODI MOLECOLARI

- *Polymerase chain reaction* (PCR). Tale metodica, altamente sensibile e specifica, partendo da acido nucleico estratto, consente di amplificare esponenzialmente *in vitro*, una o più specifiche sequenze nucleotidiche. Fondamentale, per una corretta esecuzione della tecnica, è la scelta dei primers; per la diagnosi di leishmaniosi si possono utilizzare primers universali, che amplificano sequenze conservate comuni a diverse specie del genere *Leishmania*, oppure primers specie-specifici.

Per quanto riguarda la sequenza target, può essere costituita da tratti di DNA cromosomico o DNA cinetoplastico. La scelta è condizionata dal tipo di applicazione. In ambito diagnostico il target di elezione è rappresentato da DNA cromosomico, la cui amplificazione garantisce alta specificità, con valore predittivo attorno al 100%. Frammenti di DNA cinetoplastico vengono, invece, amplificati nel corso di indagini epidemiologiche mirate ad evidenziare la circolazione del parassita. Ciò in quanto l'amplificazione di tale target è caratterizzata da una più alta sensibilità, infatti è in grado di evidenziare una concentrazione di 10^{-3} parassiti per ml di sangue, rispetto alle metodiche che utilizzano come target DNA cromosomico, in grado di evidenziare una concentrazione di circa 2 parassiti per ml di sangue (Lachaud *et al.*, 2002).

Il DNA oggetto di amplificazione può essere estratto a partire da diversi substrati: sangue intero, buffy coat, biopsie cutanee, aspirati midollari e linfonodali. La scelta del campione è condizionata da diversi fattori; ad esempio il prelievo ematico offre l'indubbio vantaggio di essere poco invasivo e di facile esecuzione, per contro ha una scarsa sensibilità (90%), che però può aumentare estraendo dalla frazione leucocitaria sanguigna (Reithinger *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda l'impiego di biopsia cutanea i pareri sono discordanti. Presenta il vantaggio di non essere una pratica invasiva; d'altro canto, in area endemica, vista la diffusione del parassita nell'ambiente, potrebbero verificarsi falsi positivi (Berrahal *et al.*, 1996); da qui la necessità di raccogliere i campioni durante il periodo di "non trasmissione" al fine di ridurre il più possibile le contaminazioni (Di Muccio *et al.*, 2004).

Il livello più alto di sensibilità (circa 100%) si ottiene, infine, a partire da aspirati midollari e linfonodali, pur essendo il

prelievo invasivo e non di facile esecuzione (Reale *et al.*, 1999; Reithinger *et al.*, 2003).

La PCR presenta indubbi vantaggi quali, richiedere minor dispendio di tempo rispetto all'isolamento e di non essere condizionata dalla vitalità del parassita (Gramiccia *et al.*, 2002; Di Muccio *et al.*, 2004), pur avendo una specificità sovrapponibile a quella dell'isolamento.

Inoltre, il suo utilizzo risulta vantaggioso nel rilevare stadi precoci dell'infezione o nei casi transitori ed autolimitanti (Gradoni *et al.*, 2004) e può anche essere applicata direttamente sul flebotomo per evidenziarne l'infettività.

Infine, con la variante quantitativa (PCR *Real Time*) è possibile quantificare in maniera precisa e riproducibile il DNA presente nel campione in esame al fine di stimare il carico parassitario (Jung *et al.*, 2000); la quantificazione di *L. infantum* può costituire un affidabile metodo per il monitoraggio del trattamento dei cani infetti e per formulare ipotesi di ricaduta associata alla concentrazione parassitaria tissutale persistente dopo trattamento (Mortarino *et al.*, 2004).

La PCR presenta però anche numerosi svantaggi quali gli alti costi di esecuzione e la necessità di strutture e personale qualificato che non rendono questa tecnica facilmente applicabile. Inoltre non vi sono evidenze sostanziali di una correlazione diretta tra PCR positività e infettività per il vettore, in quanto le infezioni rilevate possono essere di tipo criptico-latente con presenza scarsa o nulla di parassiti vitali nel derma e/o sangue periferico del cane (Gradoni, 2002).

Infine, altro limite è la scarsa standardizzazione della metodica, infatti a tutt'oggi persistono difformità relative al campione di partenza e al target da amplificare (Reale *et al.*, 1999; Gramiccia *et al.*, 2002; Di Muccio *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2004; Paglia *et al.*, 2004; Brianti *et al.*, 2005).

B) Esami indiretti.

METODI SIEROLOGICI

Sono tecniche di laboratorio che sfruttano la reattività immunologica per rilevare e quantificare gli anticorpi (Ab) e gli antigeni (Ag). Nel caso specifico sono rivolte a mettere in evidenza la presenza di anticorpi anti-leishmania nel siero dell'ospite. Vista la rapidità di esecuzione e i bassi costi, tali metodiche rappresentano il più importante strumento diagnostico ed epidemiologico. Nonostante abbiano buoni valori di specificità e sensibilità, non sempre possono rappresentare l'unico test di valutazione infatti, in caso di titoli anticorpale dubbi e in presenza di sospetto clinico, è necessario un approfondimento attraverso metodiche dirette. Inoltre, poiché la risposta immunitaria umorale non è protettiva, il titolo anticorpale non ha significato prognostico.

Per la diagnosi di leishmaniosi esistono numerosi test diagnostici che differiscono tra loro per il tipo di Ag utilizzato e per il metodo con cui vengono ricercati gli Ab anti-leishmania. Come Ag possono essere utilizzati organismi interi in forma promastigote (Ag figurati), oppure Ag solubili ottenuti in seguito ad estrazione. Tra gli esami sierologici ricordiamo:

- **Immunofluorescenza indiretta (IFI).** Rappresenta la metodica "Gold Standard", secondo *Organisation Mondiale de la Santé Animale* (OIE, 2004), per scopi diagnostici, per screening di massa e per la comparazione con nuove metodiche sierologiche. E' la tecnica che, a tutt'oggi, accoppia i più alti valori di sensibilità (96%) e specificità (98%). L'IFI permette di evidenziare e titolare gli Ab anti-leishmania presenti nel siero di sangue. Per l'esecuzione della metodica vengono utilizzati, come Ag, promastigoti fissati su vetrino. La presenza

di Ab specifici nel siero in esame viene svelata con l'aggiunta di Ab anti-immunoglobuline di specie, coniugati con isotiocianato di fluoresceina che, in sieri positivi, conferisce ai promastigoti una netta fluorescenza verde brillante, in seguito all'osservazione al microscopio a luce ultravioletta. Il risultato viene espresso in titolo anticorpale; il valore soglia è pari alla diluizione 1/40. Cani che presentano titoli anticorpali di 40 e 80 vengono considerati sospetti, nel senso che potrebbero essere animali resistenti oppure preclinici. Tali soggetti devono essere controllati con metodi sierologici a distanza di mesi oppure con altro test affidabile. Titoli ≥ 160 sono considerati indici di infezione, anche in assenza di sintomatologia (Gradoni *et al.*, 2004).

L'IFI presenta, tuttavia, alcuni svantaggi quali la rilevazione di positività dopo 5-8 mesi dal contatto con il parassita. Di conseguenza, nel corso di indagini epidemiologiche, il monitoraggio sierologico deve essere eseguito nel periodo febbraio-maggio, al fine di evidenziare la risposta anticorpale ad un'infezione contratta nella precedente stagione di trasmissione. Inoltre, non sempre i cani infetti manifestano una risposta umorale evidenziabile (leishmaniosi criptica) (Gradoni *et al.*, 2004). Infine, l'IFI non è un test adeguato a monitorare l'andamento del trattamento terapeutico in quanto, non sembra esserci correlazione tra titolo anticorpale e gravità dei sintomi (Gravino, 2004).

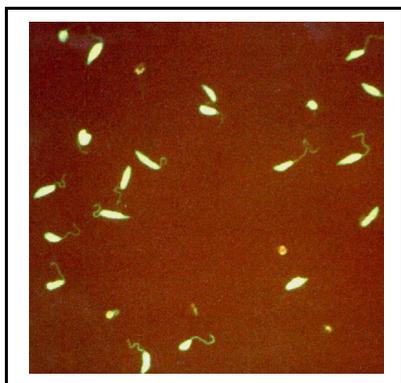


Fig.18: IFI, siero positivo di cane (www.dspvpa.unibo.it)

- **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** E' un test immunoenzimatico che utilizza un enzima come marker dell'Ab e, per evidenziare la reazione Ag-Ab, il substrato di questo enzima. L'Ag (solubile o figurato), adsorbito passivamente alle pareti dei pozzetti delle piastre microtitre, viene messo a contatto con il siero in esame; in seguito vengono aggiunti Ab anti-immunoglobuline di specie marcati con l'enzima. Se nel siero sono presenti anticorpi anti-leishmania si formano dei complessi Ag-Ab-anti-Ab marcati, che vengono evidenziati aggiungendo il substrato dell'enzima. In caso di positività si sviluppa una reazione colorimetrica osservabile visivamente o allo spettrofotometro. Numerose metodiche ELISA sono state messe a punto per la diagnosi di leishmaniosi, tra queste ricordiamo:
- ELISA, utilizzando Ag solubili purificati (Mancianti *et al.*, 1995).
 - Dot- ELISA, utilizzando promastigoti metaciclici interi fissati su un supporto di nitrocellulosa. Tale metodica prevede la lettura ad occhio nudo e viene pertanto utilizzata "in campo" (Mancianti *et al.*, 1996).
 - Dot-ELISA, utilizzando come Ag una proteina solubile del promastigote applicata ad una membrana di nitrocellulosa. E' un test molto rapido che permette di avere il risultato in soli 30 minuti (Vercammen *et al.*, 1998).
 - Slide-ELISA, nella quale si fissano i promastigoti su un vetrino (Vercammen *et al.*, 1997).
 - ELISA-rk39, utilizzando un Ag ricombinante k39, proteina presente in diverse specie di leishmania, che

viene fatta esprimere da *Escherichia coli* (Scalone *et al.*, 2002).

Le metodiche Elisa mostrano valori di specificità e sensibilità inferiori all'IFI quindi, pur essendo di più rapida lettura non la possono sostituire. L'unica competitiva con l'IFI è l'ELISA-rk39, che, oltre a risultare molto maneggevole, mostra elevati livelli di sensibilità (97,1%) e specificità (98,8%).

Recentemente, è stato eseguito uno studio in cui vengono paragonate sensibilità e specificità di un test rapido ELISA (Snap®) con quelle ottenute da IFI e Western blot (WB). Lo Snap® , confrontato con l'IFI, ha mostrato sensibilità e specificità rispettivamente del 91% e 99%; confrontato con il WB ha mostrato una sensibilità del 93 % e una specificità del 98%. In questo studio viene consigliato l'utilizzo di tale test in quanto di rapida e facile esecuzione ma, in caso di positività, si consiglia di associarlo ad altro test quantitativo quale l'IFI per determinare un titolo anticorpale.(Ferroglia *et al.*, 2007).

- **Agglutinazione diretta (DAT).** Questa metodica prevede l'impiego di Ag figurati (promastigoti di leishmania) che danno reazione di agglutinazione in presenza di specifici Ab. Nei pozzetti di piastre microtitre viene messo a contatto l'Ag con diluizioni seriali per raddoppio del siero in esame. Se nel siero sono presenti gli Ab, si vedrà comparire, nel giro di trenta minuti, agglutinazione (Poli, 1996). Tale metodica è tuttavia condizionata da valori di sensibilità e specificità relativamente bassi. Al titolo soglia di 1/320, si rileva una sensibilità del 70,9% e una specificità dell' 84,9% (Mohebbi *et al.*, 2004).
- **Western blot o immunoblotting (IB).** Si tratta di una tecnica immunologica basata sulla caratterizzazione degli Ag proteici costituenti il microrganismo. La prima fase prevede

l'applicazione di una SDS-Page (sodio dodecilsolfato-polyacrylamide gel electrophoresis) sulla miscela proteica, che viene estratta dalle leishmanie attraverso appositi detergenti. Tale saggio consente la separazione delle frazioni polipeptidiche costituenti la miscela, mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Successivamente, si ha il trasferimento e la fissazione delle bande ottenute, dal gel ad una membrana di nitrocellulosa, tramite campo elettrico. Tale membrana viene quindi esposta al siero in esame e l'eventuale presenza di Ab anti-immunoglobuline di specie è svelata aggiungendo Ab anti-immunoglobuline di specie marcati con un enzima e il relativo substrato cromogeno (Poli, 1996). Da studi condotti in aree endemiche in Spagna, è stato evidenziato che l'IB ha una specificità del 100% e una sensibilità del 95,8%, quando vengono considerate le bande antigeniche a peso molecolare di 12, 14, 16, 28, 30 e 46 kD. Inoltre, sembra che i due Ag con peso molecolare di 12 e 14kD possano essere utilizzati per individuare stadi precoci di malattia (Aisa *et al.*, 1998). L'utilizzazione di tale metodica risulta tutt'ora limitata in quanto laboriosa e non ancora standardizzata; può tuttavia essere utilizzata per la conferma di singoli casi sospetti.

- **Test rapidi di immunomigrazione e di tipo immunocromatografico.** Si trovano sottoforma di kit commerciali, non richiedono particolari attrezzature o personale qualificato e sono quindi molto diffusi in ambito ambulatoriale. Hanno valori di sensibilità e specificità molto variabili (Gradoni *et al.*, 2004; Mancianti, 2004a). Danno risultati falsamente positivi in maniera trascurabile, mentre sono frequente i falsi negativi. Si può anche incorrere in risultati dubbi, dovuti a risposte crociate con altri agenti eziologici (Rivò *et al.*, 2000).

3. Test intradermico.

E' un test volto ad evidenziare la risposta immunitaria cellulo-mediata che segue l'infezione intradermica dell'antigene leishmania. Il test si considera positivo quando, nelle successive 24-48 ore dall'inoculazione, si ha la comparsa di un nodulo cutaneo più o meno grande, causato dall'ipersensibilità dei linfociti T. L'utilizzo di questo test non ha fini diagnostici ma è volto alla determinazione dello stato immunitario di un soggetto o di una popolazione.

Si possono avere diverse tipologie di risposta al test:

- in cani asintomatici resistenti si ha una positività associata ad un basso titolo anticorpale;
- in cani asintomatici preclinici o negli oligosintomatici si può avere o una risposta debolmente positiva oppure negativa, associata ad un titolo anticorpale elevato;
- in cani sintomatici si ha una risposta negativa al test associata a titoli anticorpali elevati (Scarampella e Noli, 2000).

TERAPIA

I farmaci oggi utilizzati nella terapia della leishmaniosi canina sono in gran parte di derivazione umana. Nell'uomo la pratica terapeutica permette, se la diagnosi viene fatta precocemente e non sussistono condizioni di immunodeficienza, la completa guarigione. Nel cane ciò non succede in quanto i farmaci consentono un buon recupero clinico e un abbassamento della carica parassitaria (di notevole importanza epidemiologica), senza però raggiungere la sterilizzazione parassitologica; infatti sono frequenti le ricadute a distanza variabile di tempo dalla sospensione della terapia. Questo fatto è imputato a diversi fattori quali il profondo squilibrio immunitario che il parassita determina, l'emergere di ceppi resistenti e per la difficoltà dei farmaci a raggiungere aree poco vascolarizzate dell'organismo in cui il parassita replica (Oliva *et al.*, 1996). In ogni caso, prima di intraprendere qualsiasi terapia il veterinario deve considerare il grado di compromissione clinica, il profilo ematologico, la funzionalità epato-renale e lo stato immunitario dell'animale infetto poiché questi fattori possono influenzare l'efficacia della terapia (Oliva *et al.*, 2004). Il protocollo terapeutico che, sulla base di ampia esperienza clinica e di alcuni studi comparativi, dimostra la migliore efficacia in termini di riduzione della carica parassitaria e di prolungata risoluzione clinica della malattia è l'associazione di antimonio di N- metilglucammina (Glucantime[®]) (100- 150 mg/kg/die per os per almeno 1 mese) con allopurinolo (Zyloric[®]) (10- 30 mg/kg/die per os per 6- 8 mesi) (Gradoni *et al.*, 2004). L'azione leishmanicida dei composti antimoniali sembra legata all'inibizione di alcuni enzimi necessari alla glicolisi; questi composti possono dare numerosi effetti collaterali. Per ridurre le dosi, allo scopo di diminuire la loro tossicità del farmaco e di abbassare il costo della terapia, si utilizza l'associazione con allopurinolo, un composto analogo all'ipoxantina. Le leishmanie non sono in grado di autosintetizzare le purine e debbono, pertanto,

assumerle dall'esterno; l'allopurinolo, assorbito dal parassita al posto di una base azotata, va ad inibire la normale sintesi proteica (Oliva *et al.*, 1996). I cicli di terapia, escluso quello eseguito subito dopo la diagnosi, devono essere intrapresi durante i mesi immediatamente precedenti la trasmissione (tra maggio e giugno), in modo da tenere gli animali infetti in una condizione di persistente "eclissi parassitologica" (Oliva *et al.*, 1996).

La terapia eseguita con dosaggi inadeguati di antimonio di N-metilglucammina sia nel cane che nell'uomo, ha contribuito alla selezione di ceppi di leishmania resistenti a questa sostanza (Gramiccia *et al.*, 1992). Questo fenomeno è alla base dei sempre più frequenti insuccessi terapeutici registrati in tutto il mondo, sia nell'uomo che nel cane.

Farmaci considerati alternativi sono l'amfotericina B classica o liposomizzata, l'amminosidina e la pentamidina. Vengono poco utilizzati per via della loro marcata tossicità renale (amfotericina B classica ed amminosidina) ed epatica (pentamidina). La forma liposomizzata dell'amfotericina B (AmBisome[®]) è di gran lunga meno tossica di quella non veicolata; attualmente rappresenta il farmaco più utilizzato in Italia nell'uomo, con percentuali di guarigione pressoché totali negli immunocompetenti. Nel cane ha fornito ottimi risultati in termini di guarigione clinica ma, analogamente agli altri farmaci, non consente la sterilizzazione parassitologica. Per questo motivo viene fortemente sconsigliato l'uso di questa molecola in medicina veterinaria, al fine di evitare la possibile comparsa di ceppi chemioresistenti (Oliva *et al.*, 2004).

Di recente introduzione è l'utilizzo della miltefosina e dei suoi derivati; i primi risultati ottenuti da trattamenti sull'uomo appaiono incoraggianti (Oliva, 2003), ma non vi sono a tutt'oggi studi abbastanza ampi per valutarne l'efficacia nel cane.

Di attualità sono anche gli studi sull'impiego di farmaci immunomodulanti; si tratta di sostanze, solitamente proteine, prodotte

dalle leishmanie stesse, capaci a modulare selettivamente l'attivazione dei Th1 e la produzione di linfocine protettive. Pertanto tali sostanze potrebbero essere utilizzate oltre che a scopo terapeutico, anche a scopo profilattico per evocare una risposta immunitaria prevalentemente di tipo cellulo-mediato. Tra queste ricordiamo i glicocorticoidi, l'azatioprina, l'interferone γ e citochine ad azione timica (Gangneux *et al.*, 1999; Mancianti e Bizzetti, 2000; Oliva, 2004; Rufenacht *et al.*, 2005).

PROFILASSI

La leishmaniosi rappresenta una tematica emergente di sanità pubblica veterinaria, in relazione sia al carattere zoonotico dell'infezione, sia alle problematiche di sanità animale che comporta. La LVZ è una grave malattia trasmessa da flebotomi che ha nel cane l'unico serbatoio domestico. Attualmente la mancanza di misure di protezione e di controllo, unita alla mancanza di protocolli terapeutici nel cane, non permette di interrompere il ciclo del parassita.

Il controllo della leishmaniosi risulta difficile, in quanto non esiste attualmente un vaccino ad uso umano o veterinario di comprovata efficacia, mancano misure praticabili per il controllo su larga scala degli insetti vettori e l'applicazione dell'eutanasia risulta inapplicabile e inutile (Gradoni *et al.*, 2004).

Un buon vaccino anti-leishmania dovrebbe indurre una risposta immunitaria cellulo-mediata stabile, di tipo Th1. Inoltre dovrebbe essere efficace contro tutti gli stadi del protozoo e poco costoso. In quest'ultimo decennio numerose formulazioni sono state sperimentalmente studiate, sia nel cane che nell'uomo, tra cui vaccini costituiti da parassiti morti o vivi, da frazioni purificate di *Leishmania*, da Ag parassitari ricombinanti (gp63) e da DNA parassitario. Nonostante l'efficacia dimostrata nelle prove sperimentali (*in vitro* ed *in vivo*), non sono risultati idonei a stimolare una risposta protettiva quando applicati in condizioni naturali di infezione (Gradoni, 2001). Relativamente al cane, risultati incoraggianti si sono riscontrati in Brasile con un vaccino formato da Ag glicoproteici di *Leishmania donovani* associati a una saponina. Il vaccino brasiliano ha mostrato un'efficacia clinica del 76- 80% senza però dimostrare una protezione dall'infezione (Borja Cabrera *et al.*, 2004). Nagar *et al.* (2005) hanno invece condotto uno studio avvalendosi di tecniche diagnostiche specifiche quali l'immunoistochimica e la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) riportando una protezione verso la malattia e l'infezione del

100%. Sulla scorta di questi risultati è iniziata, nel Novembre del 2005, la prima sperimentazione di campo italiana di un presidio immunizzante per la leishmaniosi canina. Tale studio si pone l'obiettivo di arruolare 400 cani, di cui 200 verranno sottoposti all'inoculazione di un vaccino costituito da una frazione purificata di *Leishmania infantum* non coniugata a saponine e gli altri 200 verranno sottoposti all'inoculazione di un placebo. I soggetti saranno sottoposti trimestralmente a controllo clinico, prelievo ematico e aspirato linfonodale e midollare per l'esecuzione di esame biochimico, colturale e PCR (www.evsrl.it/vet.journal/).

Un controllo su larga scala degli insetti vettori non è, allo stato attuale, praticabile in Italia per l'impossibilità di effettuare trattamenti a tappeto, data l'ubiquità del flebotomo; tali trattamenti inoltre, implicherebbero enormi costi e potrebbero selezionare vettori resistenti all'insetticida stesso (Maroli e Houry, 2004). Tra gli insetticidi ad azione residua che potrebbero essere utilizzati per tale scopo ricordiamo il DDT, Malathion, Permetrina, Deltametrina e Lambda-cialotrina.

L'interruzione del meccanismo di trasmissione mediante soppressione dei cani infetti si è dimostrato inapplicabile in aree endemiche, sia per ragioni etiche sia in relazione alla difficoltà di individuare ed eliminare tutti gli animali infetti (Dietze *et al.*, 1997). L'eutanasia può essere applicata in singoli casi nei quali la terapia risulti inefficace, non tollerata, non voglia essere intrapresa e in particolari condizioni epidemiologiche, quando casi sporadici rischierebbero di dare avvio ad un nuovo ciclo autoctono di trasmissione in un'area indenne.

In considerazione di quanto affermato sopra, l'unica risorsa disponibile per il controllo della LVZ è rappresentata da metodi di controllo della trasmissione applicati al serbatoio canino. Il controllo del serbatoio deve attuarsi su tre piani (Gradoni *et al.*, 2004):

1. sorveglianza attiva dell'infezione canina nel territorio;
2. terapia dei soggetti infetti;

3. utilizzo di misure antivettoriali per il controllo della trasmissione.

Per quanto riguarda la sorveglianza, deve essere volta a quantificare l'infezione nei territori panendemicici quali Liguria, Toscana, Lazio, Campania, Basilicata, Calabria, Puglia, Molise, Abruzzo, Sicilia, Sardegna e Isole Minori, a identificare nuovi focolai e quantificare l'infezione nei vecchi focolai dei territori endemico-sporadici (Umbria, Marche e Emilia Romagna Orientale) ed infine ad identificare soggetti infetti da *Leishmania* in quei territori nei quali si siano accertati solo di recente casi autoctoni di infezione (Emilia Romagna Occidentale, Veneto, Piemonte, Lombardia, Valle D'Aosta, e Trentino).

Le operazioni di sorveglianza vanno condotte, con la collaborazione di veterinari liberi professionisti, strutture pubbliche, enti di ricerca e proprietari di animali nel periodo compreso tra Febbraio e Maggio, periodo in cui, nei nostri climi, vi è la maggiore probabilità di identificare nuovi casi di infezione.

Le linee guida per il controllo del serbatoio canino della LVZ in Italia (Gradoni *et al.*, 2004) indicano l'utilizzo della sierologia, non solo per motivazioni pratiche, ma soprattutto per l'evidenza scientifica che lo stato di infettività di un soggetto nei confronti del vettore è strettamente associato al titolo anticorpale.

Le tecniche sierologiche affidabili per uno screening di massa sono l'immunofluorescenza indiretta (IFI), varie formulazioni di ELISA (dot- ELISA, rk39- ELISA) e l'agglutinazione diretta (DAT), ma in Italia solo l'IFI è ampiamente disponibile e utilizzata di routine presso numerosi centri pubblici di riferimento.

A seguito dello screening mediante IFI i cani vengono inseriti in tre "categorie":

- "sospetti infetti": soggetti clinicamente sani con titolo anticorpale 1/40 o 1/80. Tali soggetti dovranno essere

ricontrollati con altra metodica affidabile, oppure con IFI a distanza di 6 mesi;

- “infetti asintomatici”: soggetti clinicamente sani con titolo anticorpale $\geq 1/160$. Questi animali rappresentano forme asintomatiche d’infezione, potenzialmente infettanti e pertanto da sottoporre a terapia;
- “infetti sintomatici”: soggetti con segni clinici riferibili a leishmaniosi, con titolo IFI $\geq 1/160$. questi animali sono altamente infettanti per il flebotomo e quindi da sottoporre a terapia. In questa categoria rientrano pure i soggetti polisintomatici, per i quali la mancata risposta alla terapia può indicare il ricorso all’eutanasia.

Per quanto riguarda l’utilizzo di tecniche molecolari come la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e sue modificazioni, queste presentano un’efficacia diagnostica indubbiamente molto elevata. Purtroppo però tali metodiche sono attualmente applicate da un numero limitato di centri di riferimento pubblici e non presentano tuttora criteri di standardizzazione per uno screening di massa; inoltre non vi sono evidenze sostanziali di una correlazione diretta tra PCR-positività e infettività per il vettore.

La terapia dei soggetti infetti è necessaria sia come misura protettiva individuale, sia come misura protettiva di massa. Le terapie esistenti non consentono la guarigione parassitologica, però alcuni regimi farmacologici portano ad una netta riduzione dell’infettività nei confronti del vettore durante e nei primi mesi successivi al trattamento stesso. I cicli di terapia, escluso quello eseguito subito dopo la diagnosi, devono essere intrapresi durante i mesi immediatamente precedenti la trasmissione (Maggio-Giugno) al fine di tenere gli animali infetti in una condizione di “eclissi parassitologia”; in tal modo gli animali costituiscono un rischio minore per la trasmissione della malattia (Oliva *et al.*, 1996).

Le misure antivettoriali da applicare per il controllo del serbatoio canino hanno il duplice obiettivo di proteggere l'animale non infetto e di contenere il potenziale infettante dell'animale infetto. Pertanto devono essere applicate a tutti gli animali che vivono in territori panendemici, endemo-sporadici e di recente endemia. Il periodo di applicazione di tali misure deve coincidere con il periodo di attività dei vettori, che va da Maggio a Novembre, con variazioni dipendenti dalle condizioni climatiche (Gradoni *et al.*, 2004).

Le misure antivettoriali presenti sul mercato italiano, corredate da una documentazione scientifica che comprova la loro efficacia anche contro i vettori di leishmaniosi sono quattro:

1. una specialità a base di permetrina 65% per applicazione topica, ad elevato effetto protettivo e letale della durata di circa un mese (Molina *et al.*, 1999);
2. un'associazione permetrina/piriproxifene per applicazione topica ad elevato effetto protettivo e letale della durata di circa un mese (Mercier *et al.*, 2004);
3. un'associazione permetrina/imidacloprid per applicazione topica ad elevato effetto protettivo e letale della durata di due settimane (Mercier *et al.*, 2004)
4. un complesso deltametrina-trifenilfosfato per applicazione tramite banda protettiva (collare), ad elevato effetto protettivo e letale della durata di circa 5-6 mesi (Killick- Kendrick, 2001; Maroli *et al.*, 2002; Maroli, 2003).

A questo proposito è stata condotta una sperimentazione per confermare l'efficacia protettiva dei collari, ma anche di valutare un possibile impatto di tale misura protettiva sull'evoluzione della malattia nei soggetti che avessero acquisito una leishmaniosi nonostante l'uso del collare. La sperimentazione è stata protratta per un periodo di 20 mesi, in modo da comprendere due stagioni di trasmissione e sono stati arruolati 150 cani (60 sieronegativi con collare, 60 sieronegativi senza collare e 30 sieropositivi). I risultati del presente studio hanno evidenziato come la protezione conferita dal collare sia stata del 72,5% al termine del primo anno e del 56% dopo due stagioni. Molto interessanti sono i dati riguardanti il decorso clinico di cani che, nonostante la protezione, hanno sierconvertito ed erano generalmente asintomatici. Il decorso clinico particolarmente favorevole potrebbe essere in relazione ad una minore carica antigenica ricevuta dai soggetti protetti (Foglia Manzillo *et al.*, 2005). I piretroidi sono considerati di prima scelta per la lotta ai vettori in quanto sono lipofili e si legano alla frazione lipidica della cute e del pelo; sono resistenti all'acqua e quindi mantengono la loro efficacia anche quando il cane si bagna; hanno un effetto sia *anti-feeding* (proteggono il cane dalla puntura del flebotomo), sia biocida (hanno un'attività tossica nei confronti del vettore). Il fatto di avere contemporaneamente entrambe le azioni risulta molto importante in quanto l'effetto anti-feeding protegge l'animale sano dalla puntura di flebotomi infetti e l'effetto biocida fa sì che, anche se un vettore si infetta da un cane leishmaniotico, non sarà comunque in grado di trasmettere l'infezione (Fig.19).

Da qui la necessità di applicare tali misure sia sui soggetti sani che su quelli infetti.

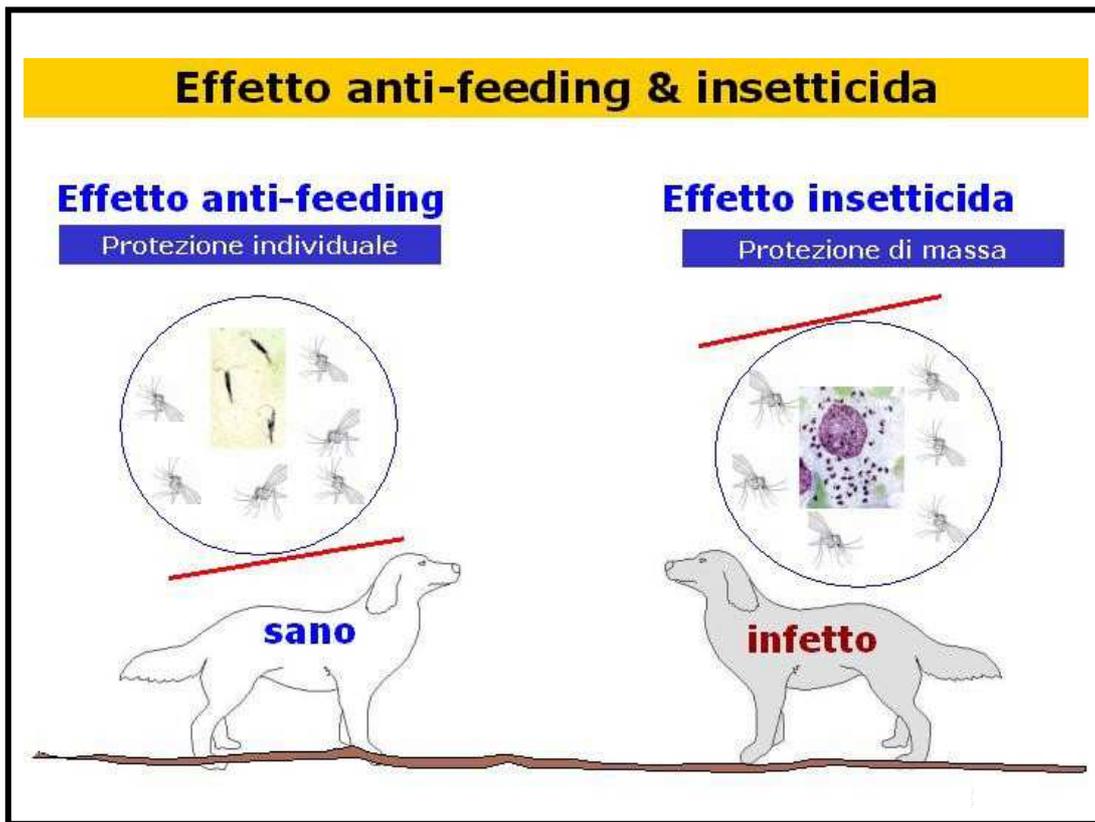


Fig.19: effetto anti-feeding e insetticida (Maroli, 2006)

Nella lotta al flebotomo, oltre all'utilizzo di sostanze chimiche, possono essere utilizzati anche mezzi fisici quali, zanzariere a maglie molto fitte da utilizzare nelle abitazioni o nei ricoveri notturni dei cani, oppure ventilatori per disturbare il volo dei vettori.



Fig.20: canile dotato di zanzariera a maglia fitta (Maroli, 2006).

PREMESSA ALLA PARTE SPERIMENTALE

La leishmaniosi rappresenta una tematica emergente di sanità pubblica veterinaria, in relazione sia al carattere zoonotico dell'infezione, sia alle problematiche di sanità animale che comporta.

Fino a vent'anni fa tutte le regioni del Nord Italia, ad esclusione della Liguria e di una piccola parte dell'Emilia Romagna, erano indenni da leishmaniosi canina.

Nel Centro-Sud Italia la malattia era invece già presente in forma endemica.

A partire dagli anni novanta, parallelamente ad un aumento della consistenza e del numero dei focolai nelle aree storicamente endemiche, sono iniziate, nelle regioni del Nord, le segnalazioni di focolai autoctoni stabili di LCan, all'interno dei quali sono comparsi alcuni casi umani.

Con lo scopo di monitorare la diffusione della LCan e dei flebotomi vettori nel Nord Italia è nato, alla fine del 2002, il network scientifico denominato LeishMap™, costituito da una unità centrale di coordinamento scientifico ubicata presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma e da quattro unità operative situate presso quattro Università del Nord Italia (Bologna, Milano, Padova e Torino).

Nell'ambito delle attività di tale network, nel periodo 2003- 2004 sono stati controllati mediante IFI 6603 cani; 177 (2,7%) sono risultati positivi per *L. infantum*; di questi, 118 animali erano casi autoctoni di LCan. Quindici nuovi focolai sono stati identificati in 5 delle 6 regioni controllate e nella Repubblica di San Marino e 4 "vecchi" focolai sono stati confermati.

Il monitoraggio entomologico ha ribadito che il vettore maggiormente diffuso in Italia è *P. perniciosus*, con la presenza in alcune aree di *P. perfiliewi* e *P. neglectus*.

L'analisi elettroforetica degli enzimi eseguita sui ceppi di *L. infantum* isolati in 7 focolai ha indicato la presenza di un solo zimodema: MON1 (Rossi *et al.*, 2005) .

Le attività di monitoraggio svolte dall'unità operativa del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVPA) dell'Università di Bologna nella regione Emilia-Romagna sono riportate come I parte delle sperimentazioni che costituiscono oggetto della presente tesi.

La II parte tratta degli studi effettuati allo scopo di valutare l'utilità diagnostica di tecniche biomolecolari, in soggetti a diversi stadi di infezione (criptica, acuta, cronica, sintomatica e non).

Un'accurata identificazione dei casi di LCan è auspicabile sia ai fini del controllo della LVZ, sia per la gestione dei singoli casi nel cane. La diagnosi presenta a tutt'oggi alcune carenze. L'immunofluorescenza indiretta (IFI) è considerata la metodica Gold Standard dall'*Organisation Mondiale de la Santé Animale* (OIE, 2004) ed è la tecnica che, a tutt'oggi, accoppia i più alti valori di sensibilità (96%) e specificità (98%). Essa tuttavia presenta alcuni svantaggi quali la rilevazione di positività dopo 5-8 mesi dal contatto con il parassita; la mancata risposta umorale in caso di leishmaniosi criptica (Gradoni *et al.*, 2004); l'inadeguatezza della metodica nel monitoraggio del trattamento terapeutico (Gravino, 2004).

E' stata pertanto effettuata una ricerca, scegliendo come area di studio la zona di Firenze in considerazione dello stato di iperendemicità, che avrebbe permesso di trovare più facilmente cani nelle diverse fasi d'infezione.

In Toscana la LCan è stata studiata a partire dagli anni '70 e i lavori pubblicati sull'argomento sono poco recenti. Studi sieroepidemiologici effettuati in varie zone della regione (Bacinello, Argentario, Isola d'Elba, Val di Cornia, Castiglione della Pescaia, Pisa, Pistoia) hanno messo in evidenza prevalenze che vanno da un 3% nella Provincia di Grosseto a un 38,8% nella Provincia di Pisa

(Favati *et al.*, 2000). Per quanto riguarda la città di Firenze sono a tutt'oggi disponibili i risultati di due sole indagini sieroepidemiologiche che hanno rilevato prevalenze pari al 22,4% (Palarchi *et al.*, 1979) e al 27,8% (Andreani *et al.*, 1995). Nel primo caso si trattava di un'indagine eseguita su 611 cani, residenti nel territorio di Firenze e nei Comuni limitrofi (Fiesole, Bagno a Ripoli, Settignano, Vagli Impruneta, Sesto Fiorentino, Grassano e Incisa Val D'Arno). I campioni sono stati testati in fissazione del complemento, utilizzando come soglia positiva il titolo 16 e in IFI utilizzando come soglia di positività il titolo 20. Nel secondo caso trattavasi di 2705 cani, prevalentemente da caccia, residenti nelle Province di Firenze, Livorno e Piacenza, che al momento del prelievo si presentavano in buono stato di salute. Tali cani erano stati esaminati in IFI, considerando come soglia di positività il titolo 40.

I PARTE

Indagine epidemiologica in Emilia-Romagna e Repubblica di San Marino

MATERIALI E METODI

1. Territorio in esame.

Il territorio oggetto dell'indagine si trova in diverse Province dell'Emilia-Romagna e nella Repubblica di San Marino. In particolare modo sono stati controllati cani residenti nelle seguenti Province: Bologna, Forlì-Cesena, Modena, Parma, Piacenza, Ravenna e Reggio Emilia.

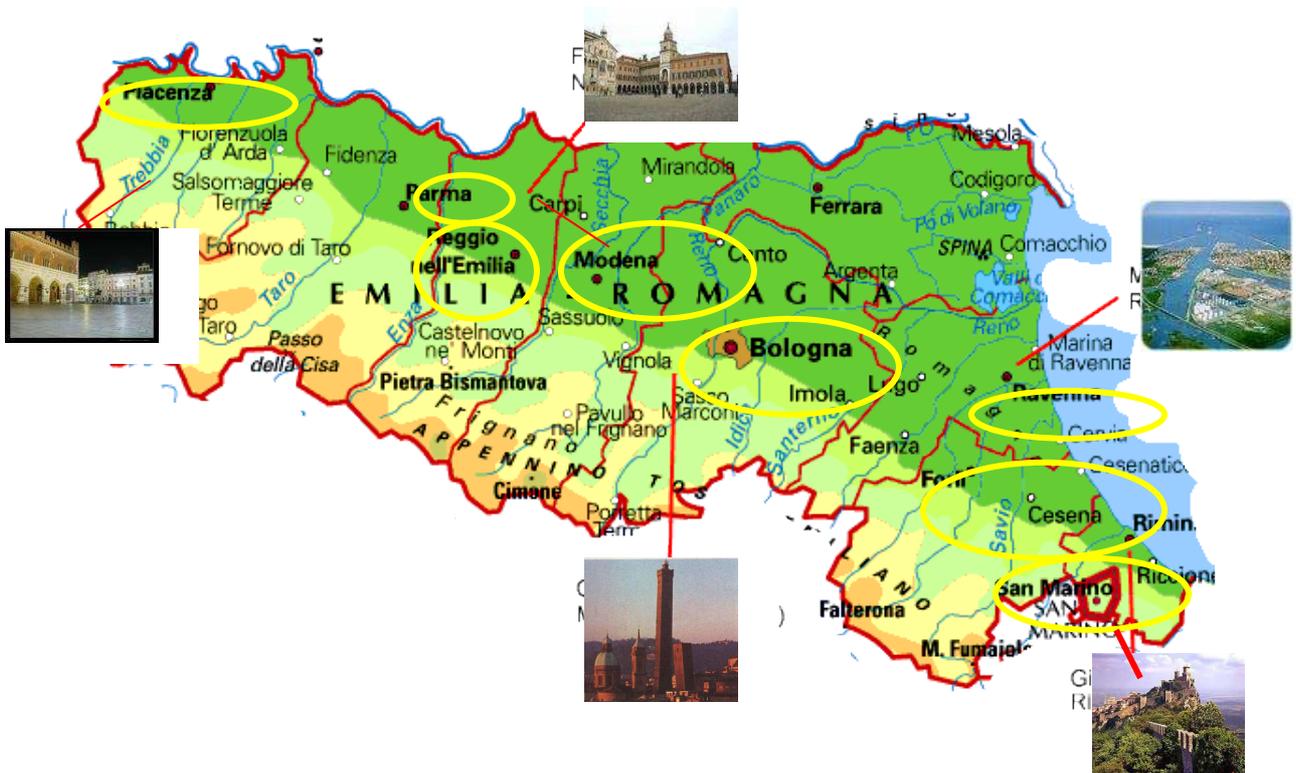


Fig.21: cartina Emilia Romagna. I cerchi gialli indicano le aree interessate dall'indagine.

1) Bologna (BO).

I campioni sono stati raccolti in 3 diverse aree: Alta Valle del Reno, Fascia collinare a ovest di Bologna e Fascia collinare tra Ozzano dell'Emilia e Castel S. Pietro.

L'Alta Valle del Reno si trova sull'Appennino Tosco-Emiliano; è un'area collinare distribuita ai due lati del Reno, caratterizzata dall'alternanza di aree boschive, aree prative e insediamenti urbani di piccole e medie dimensioni. L'indagine ha interessato numerosi Comuni quali, Castel di Casio, Gaggio Montano, Granaglione, Grizzana Moranti, Porretta Terme e Vergato.

Il territorio della fascia collinare a ovest di Bologna ha interessato in particolar modo quattro Comuni: Bazzano, Marzabotto, Monteveglio e Sasso Marconi. La fascia di territorio valutata comprende zone rurali e periurbane, caratterizzate da aree collinari e pedecollinari inframezzate da territori agricoli, prevalentemente vigneti.

La fascia collinare tra Ozzano-Emilia e Castel S.Pietro ha interessato in particolar modo il Comune di Ozzano-Emilia e la località Palesio (Castel S.Pietro). Il territorio valutato è caratterizzato da aree rurali e periurbane con zone pianeggianti dove si susseguono aree coltivate, boschi, vallate e calanchi.

2) Forlì-Cesena (FC).

L'area interessata si trova lungo la valle del fiume Savio e nell'area collinare compresa tra Savignano sul Rubicone, Longiano, Roncofreddo e Borghi. I Comuni interessati sono Cesena, Mercato Saraceno, Sarsina e Bagno di Romagna. Questi territori sono localizzati in una posizione geografica di confine tra la Pianura Padana, a Nord, e l'Appennino centrale a Sud, presentando i caratteri tipici delle zone di transizione.

3) Modena (MO).

L'indagine si è svolta prevalentemente nei Comuni di Fiorano Modenese, Formigine, Maranello e Sassuolo. Tali Comuni si trovano nella fascia pedemontana tra l'Appennino Emiliano e la Pianura Padana. Il territorio è un susseguirsi di paesaggi diversi; infatti si susseguono aree agricole, zootecniche, calanchi, aree industriali e boschive.

4) Parma (PR).

La Provincia di Parma si localizza tra gli Appennini e la Pianura Padana. I Comuni prevalentemente interessati dall'indagine sono Collecchio, Felino, Fontanellato, Fontevivo, e Noceto. Tale area è caratterizzata da paesaggi rurali con alternanza di campi agricoli, boschi e piccole aree urbane.

5) Piacenza (PC).

Tale area è stata indagata dall'unità operativa competente per la Lombardia (Università di Milano); per completezza si inseriscono comunque i dati, in quanto provincia della regione Emilia-Romagna.

6) Ravenna (RA).

Il territorio oggetto dell'indagine si trova nella Pianura Padana ed è caratterizzato da aree rurali con campi coltivati e allevamenti prevalentemente avicoli e suinicoli, alternate ad aree urbane e suburbane. Lo studio ha interessato in particolar modo i Comuni di Ravenna, Russi e la frazione Coccolia.

7) Reggio-Emilia (RE).

La provincia di Reggio-Emilia è compresa tra il fiume Po a nord e il crinale dell'Appennino Tosco Emiliano a sud. Nel territorio si susseguono aree di pianura, fortemente antropizzate, aree collinari, pedecollinari e di montagna. L'indagine ha interessato in particolar

modo, i seguenti Comuni: Albinea, Bibbiano, Canossa, Scandiano e S.Polo.

8) Repubblica di San Marino (RSM).

Il territorio, compreso tra le valli del Marecchia a nord e del Conca a sud, si trova tra le Province di Rimini e di Pesaro-Urbino. Confina con i Comuni di Rimini, Coriano, Montescudo, Verrucchio, Montegrimano, San Leo e Sassofeltrio. L'area è sottoposta a coltura intensiva di grano, viti e frutteti. L'indagine si è accentrata prevalentemente all'interno e nelle aree limitrofe al canile, in località Faetano.

2. Campioni.

L'indagine è stata effettuata grazie alla collaborazione di enti pubblici e veterinari liberi professionisti operativi nelle diverse aree indagate.

Il campionamento, casuale e non basato sul sospetto clinico, non è stato attuato secondo criteri statisticamente predefiniti perché, oltre alla difficoltà di conoscere il reale numero di cani presenti sul territorio, non si poteva prevedere quante strutture pubbliche e private e quanti proprietari avrebbero aderito all'iniziativa.

Vista l'intenzione di evidenziare casi autoctoni di LCan, l'indagine è stata rivolta principalmente a cani di proprietà, per i quali risulta più facile reperire notizie circa la provenienza ed eventuali spostamenti dal comune di residenza. Situazione particolare è costituita dal canile della Repubblica di San Marino in quanto per tale canile, sottoposto a controlli sierologici fin dal 1999, erano disponibili informazioni relativamente alla permanenza degli animali all'interno della struttura e alle variazioni del titolo anticorpale nel corso del tempo.

In alcune situazioni i campioni venivano raccolti presso ambulatori privati in occasione di altre indagini effettuate da tali strutture.

In altri casi il campionamento era mirato ad allargare le indagini in aree limitrofe a presunti casi autoctoni da noi confermati.

In altri casi ancora il monitoraggio sul serbatoio ha avuto origine dalla segnalazione di casi umani in una determinata area, comportando controlli su animali residenti nella medesima.

Per quanto concerne i cani di proprietà, il prelievo veniva eseguito previo consenso dei proprietari, ai quali era specificato che l'adesione al test era gratuita e volontaria. Per ogni cane testato veniva compilata una scheda con lo scopo di avere un quadro anamnestico dell'animale (Allegato 1). Oltre ai dati generali del cane, erano posti quesiti sull'habitat e sulle abitudini di vita, sulla convivenza con altri cani, sulla provenienza, su eventuali spostamenti e sulla presenza di segni clinici riferibili a leishmaniosi.

Anche per i cani residenti in canile veniva compilata una scheda anamnestica in cui oltre ad informazioni generali sul cane come data di ingresso in canile, provenienza presunta ed eventuali segni clinici, venivano richiesti dati riferiti al canile quali habitat, ricovero notturno, numero di cani presenti ed eventuali trattamenti disinfestanti (Allegato 2).

3. Esami di laboratorio.

A) Immunofluorescenza indiretta

Nel periodo Gennaio 2003-Dicembre 2006 sono stati testati 2311 cani di proprietà residenti in diverse province dell'Emilia-Romagna e 317 cani residenti nella RSM, di questi 76 erano cani di proprietà e 241 ospitati nel canile (tabella 1).

Aree di indagine	Numero cani testati
Provincia di Bologna (BO1) (Alta Valle del Reno)	268
Provincia di Bologna (BO2) (Fascia collinare ovest)	621
Provincia di Bologna (BO3) (Ozzano-Castel S. Pietro)	14
Provincia di Forlì-Cesena	174
Provincia di Modena	509
Provincia di Parma	142
Provincia di Piacenza	14
Provincia di Ravenna	176
Provincia di Reggio-Emilia	76
Repubblica di S.Marino	317
Totale	2311

Tabella 1: cani testati in IFI

I campioni prelevati e le relative schede venivano portate al Laboratorio di Prova di Sierologia del DSPVPA dell'Università di Bologna dove, dopo accettazione e registrazione, venivano sottoposti ad esame sierologico volto a svelare la presenza di anticorpi anti-*L.infantum*.

Come test sierologico è stato utilizzato l'immunofluorescenza indiretta (IFI), tecnica *gold standard* per la diagnosi di leishmaniosi (OIE, 2004). L'IFI è stata eseguita secondo le indicazioni riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.004 (Allegato 4). Come antigene sono stati utilizzati promastigoti di *L.infantum* del ceppo di riferimento dell'OMS MHOM/TN/80/IPT1, coltivati secondo le modalità indicate nella SOP MIPAV SIE 10.01.001 (Allegato 5). I vetrini sono stati

allestiti secondo le procedure riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.002 (Allegato 6).

La reazione è stata eseguita utilizzando immunoglobuline anti-IgG di cane, coniugate con isotiocianato di fluoresceina; la diluizione scelta per l'uso si otteneva tramite titolazione, secondo le procedure indicate dalla SOP MIPAV SIE 10.01.003 (Allegato 7).

Per ciascun siero è stata allestita una prova di screening, saggiando le diluizioni 1/40 e 1/80. In caso di positività alla diluizione 1/80 i sieri venivano sottoposti a diluizioni per raddoppio al fine di determinare il titolo anticorpale.

Ai fini della valutazione dello stato di infezione gli animali con titolo ≥ 160 sono stati considerati infetti; quelli con titolo 40 e 80 sono stati considerati "sospetti" e ricontrollati con IFI a distanza di alcuni mesi (Gradoni *et al.*, 2004).

B) Esame colturale.

Alcuni dei soggetti che hanno mostrato titoli anticorpali elevati, previa autorizzazione del proprietario o del Veterinario responsabile del canile, sono stati sottoposti a puntato midollare e/o linfonodale per un tentativo di isolamento colturale. Da un cane tale tentativo è stato eseguito seminando un a porzione di milza, prelevata in sede autoptica, previa omogeneizzazione in grinder. Purtroppo è stato possibile eseguire questo test solo su 12 cani, in quanto, essendo il prelievo midollare e/o linfonodale certamente più invasivo rispetto ad un prelievo di sangue, molti proprietari si sono rifiutati.

Residenza del cane	Numero cani
Comune di Monteveglio (BO2)	1
Comune di Ozzano-Emilia, località Palesio (BO3)	2
Comune di Sassuolo (MO)	3
Canile RSM	6
Totale	12

Tabella 2: cani sottoposti a tentativo di isolamento culturale

Il tentativo di isolamento di *Leishmania sp.* è stato effettuato seminando i campioni, in condizioni di sterilità, su terreno di Tobie modificato da Evans (EMTM), secondo le modalità indicate nella SOP MIPAV SIE 10.01.001 (Allegato 5). I tubi di coltura sono stati controllati ogni 7-10 giorni e sottoposti a passaggi “ciechi”. Dopo 4 settimane, in assenza di sviluppo di leishmanie, venivano considerati negativi. Le colture nelle quali veniva evidenziata crescita di microrganismi riferibili a leishmanie venivano inviate al Laboratorio di riferimento del Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate (Istituto Superiore di Sanità, Roma), al fine di eseguire tipizzazione dell’isolato mediante analisi elettroforetica degli isoenzimi.

C) Polymerase Chain Reaction tipo nested (n-PCR).

Cinque cani, mostranti titolo anticorpale ≥ 160 , sono stati testati in n-PCR; di questi, 3 cani erano residenti nell’area definita Bologna 2 (fascia collinare ad ovest) e 2 in Bologna 3 (Ozzano-Castel S.Pietro).L’amplificazione genica, di un tratto di una regione conservata della sequenza codificante l’rRNA 18S del genere leishmania, è stata eseguita su così pochi soggetti in quanto la metodica è stata messa a punto in un secondo momento, quando la maggior parte dei campioni era stata raccolta; inoltre tale prova è

meno indicata per indagini eseguite su ampia scala rispetto alle prove sierologiche (Gradoni *et al.*, 2004). La n-PCR è stata eseguita secondo le metodiche indicate nella SOP MIPAV SIE 10.01.027 (Allegato 8). Dai 3 cani di Bologna 2 e da 1 di Bologna 3 la n-PCR è stata allestita a partire da sangue intero; relativamente al secondo cane di Bologna 3, da sangue, midollo, linfonodo e milza, quest'ultima prelevata in sede autoptica.

Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento automatico (Servizio di Sequenziamento automatico M-Medical). Le sequenze ottenute sono state confrontate con la stessa regione del ceppo di riferimento disponibile in GenBank (Accession number: X07773). L'allineamento è stato eseguito mediante il programma ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), utilizzando il software Bioedit v. 7.2 (Hall, 1999).

4. Indagine entomologica

Per accertare la presenza dei vettori nel territorio interessato dall'indagine è stato effettuato un monitoraggio entomologico nei periodi di attività vettoriale. Tale monitoraggio è stato eseguito in alcune aree della fascia collinare ad ovest di Bologna in luglio e in settembre del 2004; a Ravenna in luglio 2004 e 2005 e in località Palesio (fascia collinare tra Ozzano e Castel S.Pietro) e in alcune aree della Provincia di Forlì-Cesena, nel mese di luglio del 2005 (Tabella 3).

Le stazioni di raccolta venivano scelte prevalentemente in relazione alla presenza di cani sieropositivi e la trappole venivano posizionate in aree considerate idonee alla sopravvivenza del vettore quali: luoghi riparati dal vento, non troppo grandi, con poca luce, in prossimità di viti e frutteti e vicino ad animali.

La cattura è stata eseguita mediante trappole oleate, costituite da un foglio di carta bianca 20 x 20 cm, imbevuto di olio di ricino (*sticky traps*).

Le trappole venivano lasciate *in loco* per 2 notti.

In caso di cattura di flebotomi, venivano conservati in alcool al 70% e inviati per l'identificazione al del Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori e Sanità Internazionale, Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate (Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Area di indagine	Periodo	Habitat	N°stazioni
Comune di Monteveglio (BO2)	Luglio 2004	Pollaio, box cani	2
Comune di Marzabotto (BO2)	Settembre 2004	Pollaio, box cani	2
Comune di Ozzano-Emilia, località Palesio (BO3)	Luglio 2005	Pollaio	1
Comuni di Cesena, Mercato Saraceno e Sarsina (FC)	Luglio 2005	Pollaio, box cani, conigliera	8
Comune di Ravenna	Luglio 2004	Pollaio, stalle cavalli	3
Comune di Ravenna	Luglio 2005	Pollaio, box cani, stalla vacche	4

Tabella 3: siti di cattura

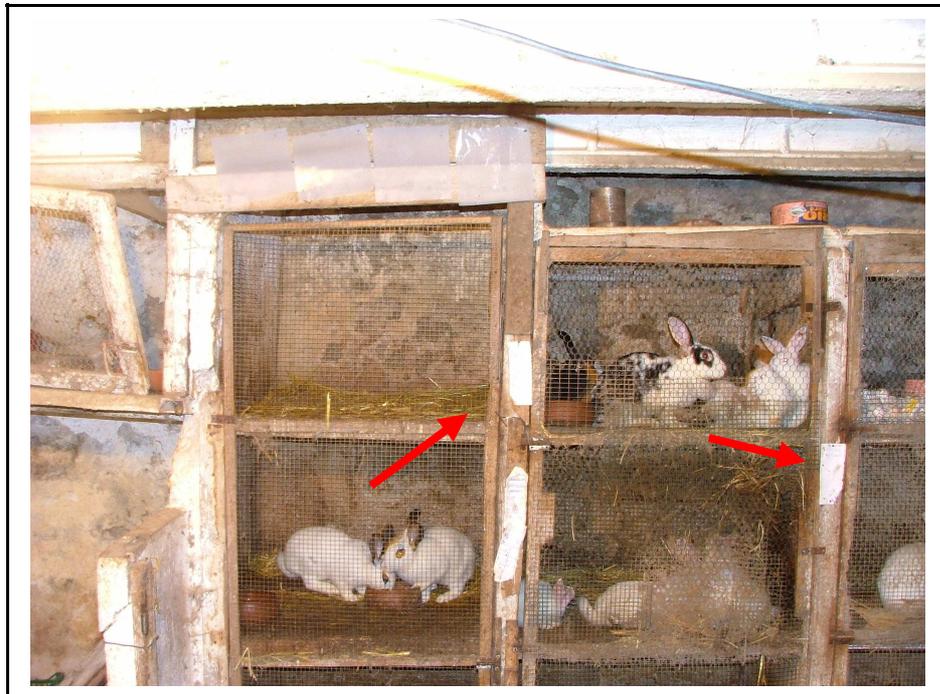
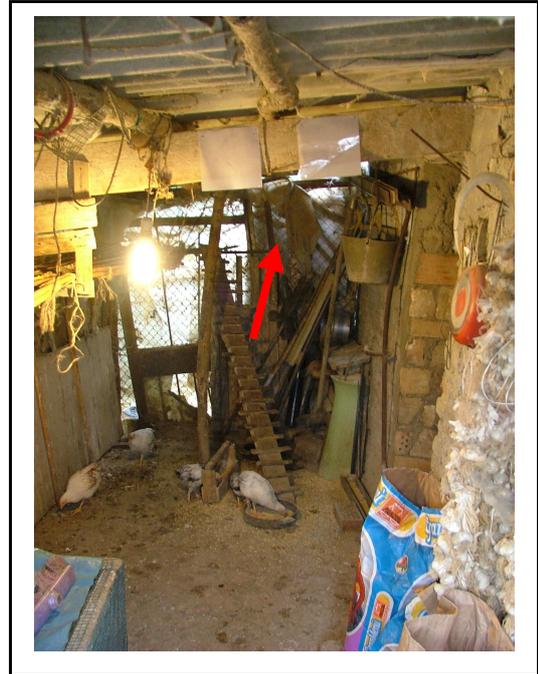
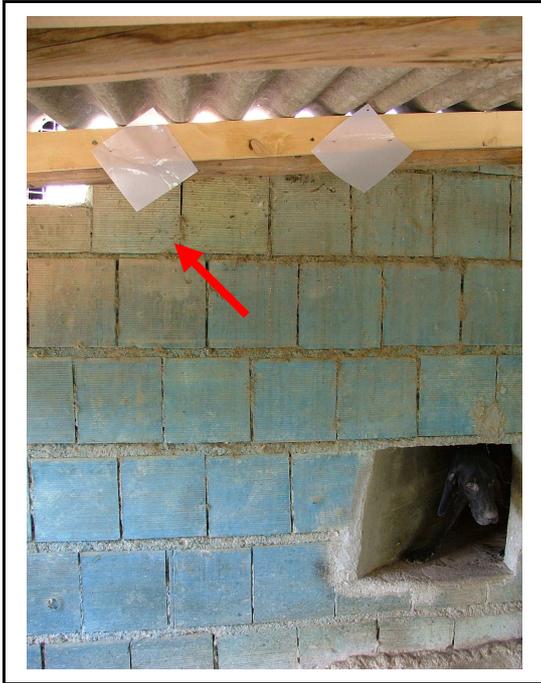


Fig.22: stazioni di cattura dei flebotomi

RISULTATI

1. Indagine epidemiologica.

A) Immunofluorescenza Indiretta.

In tabella 4 sono riportati i risultati delle prove di IFI. Relativamente agli animali con titolo 40 e 80, sono indicati solo quelli che ai successivi controlli hanno riconfermato il titolo.

I risultati dell'IFI hanno evidenziato, su un totale di 2311 cani esaminati, 90 positivi con titolo anticorpale ≥ 40 e una prevalenza complessiva del 3,9%. Dei 90 cani positivi, 61 sono casi autoctoni. La prevalenza complessiva considerando solo gli autoctoni risulta del 2,6% (tabella 4).

Area Indagata	N° esaminati	N° positivi in IFI con titolo		Totale positivi	Totale autoctoni
		< 160	≥ 160		
Prov. di BO 1	268	1	2	3	1
Prov. di BO 2	621	2	14	16	8
Prov. di BO 3	14	1	2	3	3
Prov. di FC	174	6	1	7	7
Prov. di MO	509	3	12	15	12
Prov. di PR	142	1	0	1	1
Prov. PC	14	0	4	4	3
Prov. di RA	176	3	6	9	7
Prov. di RE	76	0	7	7	2
Repubblica di San Marino	317	14	11	25	17
Totale	2311	31	59	90 (3.9%)	61 (2.6%)

Tabella 4: risultati IFI; (Bologna 1: Alta Valle del Reno; Bologna 2: Fascia Collinare Ovest; Bologna 3: Fascia Collinare tra Ozzano Emilia e Castel S.Pietro)

B) Esame colturale

Residenza del cane	Numero cani	Esito
Comune di Monteveglio (BO2)	1	negativo
Comune di Ozzano-Emilia, località Palesio (BO3)	2	1 negativo, <u>1 positivo</u> (ZMON1)
Comune di Sassuolo (MO)	3	2 negativi, <u>1 positivo</u>
Canile RSM	6	5 negativi, <u>1 positivo</u> (ZMON1)
Totale	12	9 negativi, <u>3 positivi</u>

Tabella 5: risultati dell'esame colturale

Su un totale di 12 tentativi di isolamento, da soggetti che mostravano un titolo anticorpale ≥ 320 , solamente 3 hanno dato esito positivo. Il mancato isolamento del parassita da 9 soggetti potrebbe essere dovuto al fatto che il passaggio dalla fase amastigote presente nell'ospite vertebrato alla fase promastigote in coltura, rappresenta un evento estremamente critico, che può essere compromesso dall'utilizzo di componenti del terreno di coltura di non recentissima ricostituzione, seppur nel rispetto delle date di scadenza e delle modalità di conservazione. Due isolati sono stati tipizzati su base isoenzimatica indicando la loro appartenenza alle specie *L. infantum* zimodema MON1.

I tre cani dai quali si è isolato sono autoctoni; tutti e 3 vivevano e dormivano all'aperto e mostravano sintomatologia riferibile a leishmaniosi. Tali soggetti residenti a Bologna 3, Modena e RSM, mostravano un titolo anticorpale rispettivamente di 5120, 5120 e 1280. Dal cane residente nella RSM e da quello residente in provincia di Modena si è isolato a partire da aspirato midollare, mentre si è isolato da una porzione di milza del cane residente a Bologna 3.

C) Polymerase Chain Reaction tipo nested (n-PCR)

Dei 5 cani testati in PCR, solo 2 sono risultati positivi; di questi 1 era residente a Montevoglio (Bologna 2) e 1 a Palesio (Bologna 3).

Dal I cane (Bologna 2) l'amplificazione è stata eseguita a partire da sangue periferico; dal II cane (Bologna 3) a partire da sangue, midollo, linfonodo e milza.

Il cane residente a Palesio è risultato positivo in PCR a partire da midollo, linfonodo e milza; mentre non ha mostrato la banda attesa a partire da sangue. Il cane di Bologna 2 è risultato positivo in PCR a partire da sangue, ciò fa supporre che il soggetto si trovasse in uno stato acuto dell'infezione con disseminazione del protozoo a livello ematico e quindi altamente infettante per il vettore.

Gli amplificati positivi sottoposti a sequenziamento e allineamento con la sequenza di riferimento hanno mostrato, con quest'ultima, una similarità del 99%.

2. Indagine entomologica.

I risultati dell'indagine entomologica sono riportati in Tabella 6.

In tutte le aree indagate, fatta eccezione per quelle relative al Comune di Ravenna, sono stati catturati flebotomi identificati come appartenenti alle specie vettrici "provate": *P. perniciosus* e *P. perfiliewi*. In tre aree è stata rilevata la presenza esclusiva di *P. perfiliewi*.

Area indagata	Periodo	Habitat	N°stazioni	N° stazioni +	Esemplari
Comune di Monteveglio (BO2)	Luglio 2004	Pollaio, box cani	2	2	<i>P. perfiliewi</i>
Comune di Marzabotto (BO2)	Settembre 2004	Pollaio, box cani	2	2	<i>P. perniciosus</i> <i>P. perfiliewi</i>
Comune di Ozzano-Emilia, località Palesio (BO3)	Luglio 2005	Pollaio	1	1	<i>P. perniciosus</i> <i>P. perfiliewi</i>
Comuni di Cesena, Mercato Saraceno e Sarsina (FC)	Luglio 2005	Pollaio, box cani, conigliera	8	2	<i>P. perfiliewi</i> <i>P. papatasi</i>
Comune di Ravenna	Luglio 2004	Pollaio, stalle cavalli	3	0	nessun esemplare
Comune di Ravenna	Luglio 2005	Pollaio, box cani, stalla vacche	4	0	nessun esemplare
Canile RSM	Luglio 2004	canile	1	1	<i>P. perfiliewi</i>

Tabella 6: risultati indagine entomologica.

La cattura dei flebotomi è stata eseguita, da altri Autori, in altre zone del territorio oggetto dell'indagine (Rossi *et al.*, 2005).

In particolare sono stati evidenziati:

- ✓ esemplari di *P. perniciosus* a Piacenza;
- ✓ esemplari di *P. perniciosus* e di *P. perfiliewi* a Reggio Emilia;
- ✓ *P. perniciosus* e *P. perfiliewi* a Modena.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presente indagine, condotta con lo scopo di valutare la diffusione di Lcan nella regione Emilia-Romagna, è parte integrante del progetto *LeishMap*TM.

Le prevalenze da noi osservate, del 3,9% se si considerano tutti i positivi, e del 2,6% considerando solo i casi autoctoni, sono sovrapponibili a quelle osservate dalle altre unità operative del progetto nelle altre Regioni del Nord Italia (Rossi *et al.*, 2005).

Tale studio ha evidenziato 5 focolai autoctoni e diversi casi sporadici di LCan in aree collinari e pedemontane a sud della via Emilia (fig.23). In particolare si rileva:

- la conferma della stabilità del vecchio focolaio a Bologna 3 (fascia collinare compresa tra Ozzano-Emilia e Castel San Pietro);
- la comparsa di focolai autoctoni nella località di Monteveglio (Bologna 2), nelle Province di Modena, Piacenza e nella RSM;
- la comparsa di casi autoctoni in alcune aree della Provincia di Bologna (fascia collinare ad ovest e Alta Valle del Reno) a Forlì-Cesena, Ravenna e Reggio Emilia.

Per quanto riguarda l'indagine entomologica, in tutti i siti risultati positivi è stata evidenziata la presenza di *P. perfiliewi*, generalmente associato a *P. perniciosus* e soltanto nelle stazioni di Forlì-Cesena associato a *P. papatasi*.

P. perfiliewi è vettore provato di *L. infantum* (Maroli e Khoury, 1998) ed è la seconda specie per diffusione in Italia. Per quanto specie con minore capacità vettoriale rispetto a *P. perniciosus* (Maroli *et al.*, 1980), è comunque in grado di mantenere la circolazione dell'infezione, seppure con bassi valori di prevalenza nella popolazione canina (Gradoni *et al.*, 1980). La presenza preponderante di *P. perfiliewi*, anche in assenza di *P. perniciosus*, è una costante dei

focolai emiliano-romagnoli fin dalle indagini eseguite sul focolaio di LVZ dei primi anni '70 (Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Baldelli *et al.*, 1999; Baldelli *et al.*, 2001).

P. papatasi non è vettore di *L. infantum*, ciò nonostante la sua presenza non deve essere sottovalutata perché in altre situazioni epidemiologiche e geografiche, è in grado di trasmettere altre specie di *Leishmania* quali *L. major* (Gramiccia *et al.*, 2004).



Fig. 23: focolai e casi autoctoni di LCan in Emilia Romagna

Vediamo in dettaglio la situazione emersa nelle diverse province:

Provincia di Bologna

Sono state indagate tre aree della provincia. Nell'Alta Valle del Reno (Bologna 1) la presenza di leishmaniosi non era mai stata indagata prima d'ora. L'unico dato relativo a quest'area risale al 1987, con la segnalazione di un caso a Porretta Terme, su cui però non fu possibile eseguire ulteriori accertamenti (Baldelli e Di Francesco, 1992). Questa zona è sempre stata considerata indenne anche per le caratteristiche pedoclimatiche, ritenute non idonee alla sopravvivenza del vettore.

Il monitoraggio di quest'area, eseguito tra Novembre 2003 e Maggio 2004, su 268 cani ha evidenziato 3 sono positivi; di questi 2 provenivano da aree endemiche mentre 1 era autoctono. Il caso autoctono presentava un titolo di 80, in assenza di sintomatologia; per mancata collaborazione da parte dei proprietari non è stato possibile eseguire ulteriore controlli necessari stabilire lo stato di animale "resistente" o "preclinico".

Sulla base dei dati a nostra disposizione sembrerebbe che, allo stato attuale, focolai autoctoni di LCan non siano attivi nell'Alta Valle del Reno; non devono però essere sottovalutati i casi non autoctoni, seppur sporadici che, se venisse evidenziata la presenza del vettore, potrebbero fungere da innesco a nuovi focolai a trasmissione autoctona.

Il monitoraggio della fascia collinare ovest di Bologna, eseguito nel periodo Aprile 2004-Aprile 2006, su 621 cani ha messo in evidenza 16 positivi, dei quali 8 erano casi autoctoni. Di questi, 3 provenivano dal Comune di Monteveglio. In tale area sono stati controllati 2 diversi allevamenti di cani da caccia per tre anni consecutivi, testando una trentina di soggetti. In uno dei 2 allevamenti a 2 soggetti risultati positivi nel 1° anno, si è aggiunto un terzo soggetto (precedentemente negativo) nel 2° anno: i 3 cani hanno confermato la positività anche nel 2006.

Nonostante il fallimento dei tentativi d'isolamento, la presenza di *L. infantum* è stata confermata tramite amplificazione genica, infatti il prodotto risultante dalla n-PCR ha mostrato una similarità del 99% con la sequenza del gene SSUrRNA del genere *Leishmania*, disponibile in GenBank.

In entrambi gli allevamenti sono stati rinvenuti esemplari di *P. perfiliewi*.

Nonostante il numero così basso di soggetti testati in tale località, è comunque possibile trarre alcune considerazioni. Innanzitutto va rilevata la presenza di un focolaio autoctono, per quanto limitato, la cui stabilità andrebbe confermata mediante un monitoraggio sistematico dei cani residenti nella zona.

Inoltre il mancato riscontro di nuovi casi, durante il terzo anno di sorveglianza, potrebbe essere dovuto all'implementazione di misure di profilassi quali, trattamento farmacologico dei cani positivi atto ad abbassare la carica parassitaria; applicazione, su tutti i soggetti dei due allevamenti, di un collare impregnato di un complesso deltametrina-trifenilfosfato.

Relativamente alla fascia collinare compresa tra Ozzano-Emilia e Castel S.Pietro, la nostra indagine, svoltasi nella primavera-estate del 2005, si è accentrata in particolare sulla località di Palesio, sita nel territorio interessato nei primi anni '70 dal focolaio di LVZ. (Mantovani *et al.*, 1982) ed oggetto di un'indagine sieroepidemiologica negli anni 2001-2002, che ha evidenziato il riemergere del focolaio storico (Mollicone *et al.*, 2002; Mollicone *et al.*, 2003; Mollicone e Baldelli, 2003). Su 14 cani testati 3 sono risultati positivi, dei quali 2 con titoli di 5120 e 640. Tali cani, entrambi sintomatici e residenti in località Palesio, erano già stati controllati nel 2001 dal Laboratorio di Prova di Sierologia del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale con esito negativo. Dal momento che dai dati anamnestici risultavano non essersi mai spostati da Palesio, è possibile affermare che si tratti di

infezione autoctona. Il cane che mostrava titolo anticorpale di 5120 è stato soppresso per volere del proprietario e da esso è stato possibile isolare un ceppo di leishmania identificato come Z-MON1; la presenza del parassita è stata ulteriormente confermata dall'evidenziazione in n-PCR di un amplificato, identificato come una porzione di sequenza del gene SSUrRNA del genere *Leishmania*. Ulteriore attestazione della presenza e della stabilità del focolaio si è avuta dalla conferma della presenza delle 2 specie vettrici.

Provincia di Forlì-Cesena:

Il controllo sierologico eseguito nel periodo Dicembre 2004-Luglio 2005 su 174 cani, ha permesso di evidenziare 7 animali positivi, tutti autoctoni. Uno di questi presentava un titolo anticorpale di 1280, inequivocabilmente indicativo di infezione in atto, che ha confermato il sospetto clinico.

Gli altri 6 animali possedevano titoli anticorpali dubbi, ma comunque indicativi di contatto con il parassita. Titoli anticorpali pari a 40 e 80 possono essere riferiti a soggetti “resistenti” o “preclinici”, che andrebbero ricontrollati a distanza di mesi. Solo 4 di questi animali sono stati ritestati: 2 si sono negativizzati e 2 hanno mantenuto il titolo dubbio. Il rinvenimento, variabile nel tempo, di titoli bassi o nulli, sembrerebbe ascrivibile a una forma di resistenza alla malattia (Oliva, 2004).

Pur tenendo in considerazione la scarsità dei dati raccolti sia al controllo sierologico sia al monitoraggio entomologico, che ha comunque evidenziato la specie vettrice *P. perfiliewi* in uno dei siti di raccolta, non va dimenticato che esistono tutti i presupposti all'instaurarsi di un focolaio stabile di trasmissione nel territorio in esame.

Provincia di Modena:

In occasione del focolaio di LVZ degli anni '70, un caso dei 60 segnalati si riferiva alla Provincia di Modena. Più recentemente un'indagine sierologica, eseguita all'inizio del 2002 in cani ospitati nei canili di competenza dell'A.U.S.L. di Modena, aveva messo in evidenza una prevalenza complessiva dell'1,4%, senza che fosse possibile per nessun caso affermarne l'origine autoctona (Mollicone, 2003). Il canile infatti non è un buon osservatorio epidemiologico per la valutazione del carattere autoctono di un focolaio, in quanto non è possibile reperire notizie certe su provenienza e spostamenti dei cani.

A seguito della segnalazione di 3 casi autoctoni di LCan nel Comune di Maranello, a partire dal giugno 2003 è iniziata un'indagine sierologica dapprima incentrata su cani residenti nella stessa area dei 3 cani originali, e successivamente estesa principalmente a Comuni limitrofi, anche in relazione a 1 sospetto caso autoctono di LVZ individuato nel Comune di Fiorano.

Complessivamente, su 509 cani controllati, 15 sono risultati positivi e per 12 è stato possibile definire l'origine autoctona dell'infezione. Tali animali risultavano tutti residenti nella zona compresa tra i Comuni di Fiorano (3), Maranello (8) e Sassuolo (1).

E' stato isolato un ceppo di leishmania che non è stato possibile tipizzare.

Entrambe le specie vettrici "provate" *P. perfiliewi* e *P. perniciosus* sono state evidenziate all'interno del focolaio.

Dal nostro studio si rileva la presenza di un focolaio stabile localizzato in un'area collinare a sud-ovest di Modena, comprendente i Comuni di Fiorano, Maranello e Sassuolo.

Provincia di Ravenna:

Nel periodo compreso tra Gennaio 2003 e Marzo 2005, sono stati rilevati 9 casi di LCan (7 autoctoni) su 176 soggetti.

La presenza di casi autoctoni di LCan in un territorio con caratteristiche pedoclimatiche non compatibili con la presenza del vettore ha suscitato il nostro interesse. Per due stagioni di trasmissione consecutive (2004/05) è stata quindi tentata la cattura dei flebotomi che ha però sempre dato esito negativo.

La discrepanza epidemiologica tra presenza di casi autoctoni e assenza di vettori potrebbe essere imputabile ad una raccolta poco scrupolosa dei dati anamnestici che ha portato a considerare come autoctoni casi che in realtà non lo erano. Rimane di fatto un interrogativo sulla reale situazione in tale territorio che andrebbe pertanto ulteriormente indagata.

Province di Parma e Reggio-Emilia:

Le indagini effettuate nelle Province di Parma e Reggio-Emilia sono risultate incomplete rispetto a quelle effettuate in altre Province della Regione, in relazione o all'esequità numerica del campione controllato o ai mancati approfondimenti parassitologici e entomologici.

In Provincia di Parma su 142 animali di varia provenienza, è stato evidenziato, in un'area collinare a sud di Parma, un solo caso autoctono, peraltro con titolo dubbio che non è stato possibile ricontrollare successivamente. Il monitoraggio entomologico non è stato effettuato.

In Provincia di Reggio-Emilia l'indagine sierologica da noi effettuata su 76 cani, ha mostrato 4 positivi, nessuno dei quali risultava autoctono. Si trattava però di animali residenti in un'area dalla quale sono successivamente giunte segnalazioni di sporadici casi autoctoni, per i quali potevano aver costituito l'innesco. Nello stesso territorio è stata da altri rilevata la presenza dei flebotomi vettori.

Repubblica di San Marino:

Il canile della RSM è stato controllato per la prima volta dal Laboratorio di Prova di Sierologia del DSPVPA nel 1999. Allora tutti i cani erano risultati sieronegativi.

A partire dal Maggio 2003 il canile viene sottoposto a sorveglianza annuale. Durante il primo anno il controllo dei 148 cani ospitati nel canile, ha permesso di osservare positività in 2 soggetti con titoli anticorpali di 160 e 1280. Il cane con titolo 160 proveniva dalla regione Campania, area storicamente endemica per leishmaniosi. Il cane mostrante titolo 1280 era presente in canile dal 1997 e, ad un precedente controllo eseguito nel 1999, era risultato negativo. Si può quindi ragionevolmente ritenere che il soggetto abbia contratto l'infezione dopo il suo ricovero in canile e quindi all'interno del canile stesso. Dallo stesso soggetto è stato isolato un ceppo di *L.infantum* tipizzato come Z-MON1.

L'anno successivo sono stati controllati 168 cani, 112 dei quali già testati l'anno precedente. Dei dodici risultati positivi in IFI, 6 erano negativi nel 2003, residenti in canile da diverso tempo e quindi presumibilmente infettatisi all'interno del canile stesso.

Sempre nel 2004 è stata effettuata la cattura di esemplari di *P. perfiliewi* all'interno della struttura.

In considerazione del fatto che il canile era precedentemente indenne da LCan è probabile che l'infezione sia stata introdotta da cani infetti provenienti da aree storicamente endemiche (come ad esempio il cane campano da noi segnalato) e che la presenza del vettore abbia permesso la trasmissione agli altri soggetti innescando un focolaio autoctono.

Tutti e 12 i soggetti risultati positivi sono stati soppressi e su tutti gli animali ricoverati nel canile sono state adottate misure di prevenzione individuale con l'applicazione a tutti i soggetti di un collare a base di deltametrina-trifenolfosfato. Parallelamente si è deciso di controllare

sierologicamente i nuovi ingressi e i cani di proprietà residenti nelle zone limitrofe al canile. Nel 2005 sono stati controllati 142 soggetti. Tutti i controlli eseguiti nel 2005 sia in cani del canile sia in cani di proprietà hanno dato esito negativo. Alla luce di questi risultati sembrava possibile che il focolaio fosse limitato al canile e che le misure adottate, quali soppressione e applicazione dei collari, avessero interrotto la trasmissione dell'infezione.

Il successivo controllo effettuato nel 2006 su 125 cani del canile (tutti già controllati precedentemente) ha evidenziato 8 nuovi positivi con titoli compresi tra 40 e 640. Inoltre, è stata evidenziata positività in 5 cani di proprietà (4 con titolo anticorpale ≥ 160) residenti in aree limitrofe al canile e mai spostatisi da esse. Si ipotizza quindi una riemergenza del focolaio all'interno del canile ed esteso alle aree limitrofe, a conferma del fatto che la soppressione non possa essere considerata un metodo efficace per eradicare l'infezione, come dimostrato anche da uno studio eseguito in Brasile da Dietze *et al.* (1997). In tale indagine 80.000 cani risultati sieropositivi su 4.500.000 furono soppressi, ciononostante nei 12 mesi successivi all'intervento l'incidenza della malattia nell'uomo continuò ad aumentare, passando dal 15% al 54 % nelle aree sottoposte all'intervento e, dal 14% al 54% nell'area di controllo.

I fallimenti dei programmi di eliminazione di massa sono da collegare principalmente a tre fattori: l'alta incidenza nelle aree endemiche, la scarsa sensibilità dei test diagnostici nello svelare tutti i soggetti infetti e al tempo che intercorre tra la diagnosi e la soppressione (Courtenay *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2004).

Le indagini da noi effettuate sembrano indicare la presenza stabile, in forma endemica, della LCan in Emilia-Romagna. I casi autoctoni e i focolai accertati, così come la presenza del flebotomo vettore, sono concentrati nelle zone collinari e pedemontane a sud della via Emilia, lungo una linea virtuale che, partendo dalla Provincia di Rimini e dal

territorio della RSM ad essa contigua e in prosecuzione del focolaio marchigiano, raggiunge l'estremo limite della Provincia di Piacenza.

In tale "macro" focolaio la trasmissione è assicurata dalla presenza della specie vettrice *P. perfiliewi*, caratteristica costante del focolaio emiliano-romagnolo, non sempre associato al vettore più efficiente *P. perniciosus*.

Fa eccezione il focolaio della Provincia di Piacenza, localizzato in un territorio al confine con l'oltre Po Pavese e caratterizzato, come altri focolai del Nord Italia, dalla presenza costante e/o esclusiva di *P. perniciosus*.

Risulta evidente come la situazione epidemiologica sia rapidamente mutata negli ultimi 20 anni a partire da una situazione pressoché indenne (fatta eccezione per il focolaio "bolognese"). Certamente la maggior attenzione da parte di soggetti pubblici e privati ha contribuito a svelare la condizione attuale, che trova come cause principali i cambiamenti climatici, favorevoli la sopravvivenza del flebotomo vettore, e le modificate abitudini di vita uomo/cane, dove il cane, divenuto parte integrante del nucleo familiare, viene coinvolto in viaggi e spostamenti anche in aree endemiche.

II PARTE

**Comparazione di tecniche
biomolecolari e sierologiche
eseguite su cani del canile
sanitario di Firenze**

Nel corso delle indagini che costituiscono l'oggetto della I parte della presente tesi abbiamo avuto l'opportunità di applicare metodiche biomolecolari su substrati diversi da animali sieropositivi, dai quali sono stati ottenuti 2 amplificati riconducibili a parte di una sequenza codificante l'rRNA 18S del genere leishmania.

Nella II parte della tesi le stesse metodiche sono state applicate nel corso di uno studio atto a valutare le possibilità di utilizzo della diagnosi biomolecolare in alternativa o in affiancamento alla diagnosi sierologica tramite IFI.

MATERIALI E METODI

1. Campioni.

Lo studio è stato effettuato su cani ospitati nel canile sanitario di Firenze, situato nel territorio di competenza del Servizio di Igiene Urbana Veterinaria dell'Azienda Sanitaria di Firenze). Nel periodo compreso tra dicembre 2005 e dicembre 2006 sono stati controllati, mediante IFI e n-PCR, 58 cani di nuova introduzione nel canile.

Il campionamento, non basato sul sospetto clinico, non è stato attuato secondo criteri statisticamente predefiniti in quanto non si poteva prevedere il numero di nuovi ingressi nel canile.

Per ogni soggetto veniva compilata una scheda anamnestica con lo scopo di reperire informazioni quali: dati generali del cane, eventuale presenza di sintomatologia riferibile a leishmaniosi ed eventuali terapie eseguite (Allegato 3).

I cani venivano classificati come asintomatici (nessun segno clinico), oligosintomatici (1/2 segni clinici), sintomatici (3 o più segni clinici).

Ad ogni cane venivano prelevati circa 6 ml di sangue; 3 ml venivano sperati e destinati all'esecuzione dell'IFI e 3 ml, addizionati di anticoagulante, venivano utilizzati per l'esecuzione della n-PCR.

Su tutti e 58 i cani è stato possibile eseguire l'IFI e la n-PCR da *buffy coat*; da 55 cani è stato possibile eseguire un puntato midollare e da 17 cani un puntato linfonodale entrambi destinati all'esecuzione della n-PCR. Quindi solo questi 17 animali sono stati controllati con tutte e quattro le metodiche (IFI e PCR sui diversi substrati).

Il puntato midollare è stato eseguito, utilizzando una siringa da 10 ml con ago innestato da 18G, dalla II o III sternebra, con l'animale in posizione latero-laterale e con l'arto anteriore superiore flesso e iperabdotto (Fig 24); il puntato linfonodale è stato eseguito solo sui cani che mostravano linfadenomegalia prescapolare o poplitea (Fig. 25).

I soggetti, che ad un primo screening presentavano risultati dubbi (mancante concordanza tra i tests; titoli anticorpali compresi tra 40 e 80), venivano ricontrollati più volte, a distanza di un paio di mesi l'uno dall'altro.

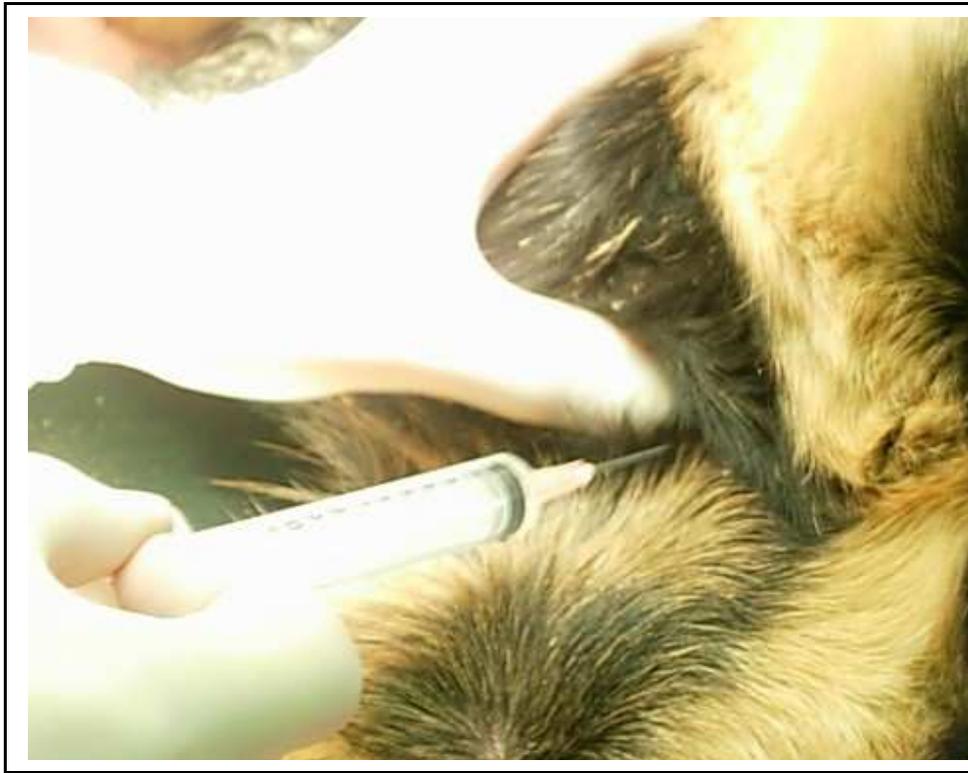


Fig. 24: prelievo midollare



Fig. 25: linfonodo precapolare ingrossato

2. Esami di laboratorio.

A) Immunofluorescenza indiretta.

E' stata utilizzata la metodica già impiegata per le indagini sierologiche oggetto della I parte della tesi, eseguite secondo le indicazioni riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.004 (allegato 4).

Per ciascun siero è stata allestita una prova di screening, saggiando le diluizioni 1/40 e 1/80. I sieri con titolo 40 e 80 sono stati considerati dubbi e ricontrollati in IFI e in n-PCR a distanza di alcuni mesi; quelli con titolo >80 sono stati sottoposti a diluizioni per raddoppio al fine di determinare il titolo anticorpale.

B) Estrazione del DNA.

I campioni midollari, linfonodali ed ematici, questi ultimi ottenuti previo isolamento del *buffy coat* (frazione leucocitaria sanguigna) sono stati sottoposti a estrazione del DNA. L'isolamento del *buffy coat* è stato eseguito utilizzando un reagente del commercio (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences) seguendo le indicazioni riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.026 (Allegato 9).

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando un kit del commercio (DNA Tissue Kit, Qiagen) basato sull'uso di colonnine contenenti una membrana di silice, che lega elettivamente il DNA cellulare. La metodica di estrazione di tale kit prevede una prima fase di lisi cellulare, una seconda fase di precipitazione mediante etanolo in cui si realizza il legame elettivo tra DNA e membrana di silice e quindi una terza fase di eluizione, preceduta da due lavaggi per rimuovere eventuali contaminanti e inibitori enzimatici.

I protocolli seguiti per l'estrazione del DNA da *buffy coat*, puntato midollare e linfonodale sono riportati rispettivamente nelle SOP MIPAV SIE 10.01.026 (Allegato 9), 10.01.024 (Allegato 10) e 10.01.025 (Allegato 11).

Gli estratti venivano conservati a -20°C fino all'esecuzione della n-PCR.

C) Polymerase Chain Reaction tipo Nested (n-PCR).

La n-PCR è una metodica ad elevata sensibilità e specificità, caratterizzata da due amplificazioni successive, eseguite mediante l'uso di due coppie di primers specifici, diverse per ciascuna reazione; in particolare la seconda coppia di primers permette l'amplificazione di una regione interna al target oggetto della prima amplificazione.

La n-PCR per *Leishmania sp.* è stata eseguita secondo le indicazioni di van Eys *et al.* (1992) ed è in grado di evidenziare il DNA di 0.01 parassita (Cruz *et al.*, 2002).

Il target amplificato corrispondeva ad una regione conservata della sequenza codificante l'rRNA 18S del genere leishmania (Fig. 26). Nella prima PCR la coppia di primers era costituita dal primer R221 (5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG - 3') e dal primer R332 (5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG- 3'), che consentivano l'amplificazione di un tratto di 603 paia di basi (bp). Nella seconda reazione i primers utilizzati erano R223 (5'-TCCCATCGCAACCTCGGTT-3') e R333 (5'-AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3'), in grado di amplificare un prodotto di 358 bp.

La reazione di amplificazione genica è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate nella SOP MIPAV SIE 10.01.027 (Allegato 8). Come controllo negativo è stato utilizzato un estratto di DNA di cane risultato negativo per *Leishmania sp.* in n-PCR e in IFI. Come controllo positivo è stato utilizzato un estratto di DNA di cane risultato sieropositivo nel corso dell'indagine sieroepidemiologica in Emilia-Romagna e dal quale era stato isolato un ceppo di *L. infantum* tipizzato ZMON1. L'amplificato ottenuto da tale estratto era stato precedentemente sottoposto a purificazione e a sequenziamento. La sequenza ottenuta era stata allineata mediante programma Clustal W

con la stessa regione del ceppo di riferimento disponibile in GenBank (Accession number: X07773), mostrando con quest'ultimo una similarità del 99%.

```
ggttcctttc ctgatttacg catgtcatgc atgccagggg gcgcccgatga  
ttttttactg tgactaaaga agcgtgacta aagcagtcac ttgacttgaa  
ttagaaagca tgggataaca aaggagcagc ctctaggcta ccgtttcggc  
ttttgttggt tttaaaggtc tattggagat tatggagctg tgcgacaagt  
gctttcccat cgcaacctcg gttcgggtgtg tggcgccttt gaggggttta  
gtgcgtccgg tacgagctcc ggttcgtccg gccgtaacgc cttttcaact  
cacggcctct aggaatgaag gagggtagtt cgggggagaa cgtactgggg  
cgtcagaggt gaaattctta gaccgcacca agacgaacta cagcgaaggc  
attcttcaag gataccttcc tcaatcaaga accaaagtgt ggagatcgaa  
gatgattaga gaccattgta gtccacactg ccaaacgatg acacccatga  
attggggatc ttatggggccg gcctgcggca gggtttacc tgtgtccagc  
accgcgcccg cttttaccaa cttacgtatc ttttctattc ggcctttacc  
ggcc
```

Fig. 26: regione conservata del gene codificante l'rRNA 18S. Sono state evidenziate in blu le sequenze bersaglio dei primers utilizzati nella prima amplificazione, in rosso quelle dei primers impiegati nella seconda (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Gli estratti di DNA di animali, che allo screening presentavano positività in PCR senza mostrare reattività anticorpale, sono stati sottoposti a prove di ripetibilità al fine di escludere fenomeni di contaminazione.

D) Esame citologico.

Da 24 cani è stato possibile allestire preparati citologici strisciando su vetrino aspirato midollare e/o linfonodale. I vetrini così ottenuti venivano lasciati asciugare all'aria, fissati in metanolo per 1min., colorati con il metodo Giemsa (OIE, 2004) e osservati al microscopio ottico con un ingrandimento 100X ad immersione.

3. Elaborazione statistica dei dati.

Le tecniche diagnostiche utilizzate (IFI e n-PCR a partire dai tre diversi substrati) sono state confrontate a due a due mediante il Test di McNemar (Siegel, 1980).

Con lo stesso test le singole metodiche sono state confrontate diagnostiche con la presenza/assenza di sintomatologia, considerando come sintomatici solo gli animali che presentavano più di due segni clinici.

Su 17 cani è stato possibile eseguire tutte e quattro le modalità diagnostiche; le prevalenze osservate con ogni metodica sono state quindi confrontate tra loro mediante il test-t di Student per il confronto tra proporzioni (Statistica for Windows; Release 4,5), al fine di valutare se differivano in maniera significativa.

Considerando come veri positivi (infetti) i soggetti che presentavano all'IFI un titolo anticorpale ≥ 160 , sono stati calcolati i valori di sensibilità e specificità delle n-PCR a partire dai diversi substrati.

E' stata calcolata inoltre la sensibilità relativa dell'IFI con soglia 40 rispetto a quella con soglia 160.

Per i 17 cani ai quali sono state applicate tutte le metodiche diagnostiche, sono stati calcolati i valori di sensibilità di ogni test, considerando come veri positivi i cani che mostravano positività ad almeno una metodica, considerando positivi in IFI solo i soggetti con titolo ≥ 160 .

RISULTATI

1. Esami di laboratorio.

A) IFI e n-PCR.

In tabella 7 sono riportati i risultati relativi allo screening eseguito sui 58 cani.

Tutti i cani sono stati esaminati tramite due o più tecniche diagnostiche e 12 su 58 (20,7%) sono risultati positivi ad almeno un test.

Su 17 cani è stato possibile eseguire tutte e quattro le metodiche diagnostiche.

Relativamente ai dati dell'IFI, considerando positivi gli animali con titolo anticorpale ≥ 40 , indicativo di un contatto con il patogeno, otteniamo una prevalenza complessiva del 17,24 %; considerando invece come positivi solo i soggetti con titolo ≥ 160 , indicativo di infezione in atto, evidenziamo una prevalenza del 10,34%.

Per quanto riguarda i dati relativi alle n-PCR dai diversi substrati: 5 cani su 58 (8,6%) sono risultati positivi a partire da *buffy coat*; 4 su 55 (7,3%) sono risultati positivi a partire da midollo; 4 cani su 17 (23,5%) sono risultati positivi a partire da linfonodo (Fig. 26).

Considerando la classificazione clinica dei soggetti: 22 erano soggetti asintomatici, 28 oligosintomatici e 8 sintomatici.

Dei 6 cani con titolo anticorpale ≥ 160 , 5 risultavano positivi anche in n-PCR ad almeno un substrato.

Soltanto due cani (campioni: 3, 16), risultavano positivi solo in n-PCR senza mostrare alcuna reattività anticorpale.

Sei cani (campioni numero: 3, 16, 19, 21, 50 e 51) sono risultati dubbi, o perché mostravano un titolo anticorpale basso (40, 80), oppure perché non si evidenziava concordanza tra IFI e n-PCR. Questi 6 cani sono stati riesaminati più volte a distanza di un paio di mesi, su altri due cani è stato effettuato un successivo controllo in corso di terapia. I risultati dei cani controllati più volte sono riportati in Tabella 8.

Campione	IFI	n-PCR buffy coat	n-PCR midollo	n-PCR linfonodo	Sintomatologia
1	neg	neg	neg	/	A
2	neg	neg	neg	/	A
3	neg	+	neg	+	O
4	+ 160	+	neg	neg	A
5	+ 2560	+	+	+	S
6	neg	neg	neg	/	A
7	neg	neg	neg	/	O
8	neg	neg	neg	/	O
9	+ 5120	+	neg	neg	S
10	neg	neg	/	/	A
11	neg	neg	neg	/	O
12	neg	neg	neg	/	O
13	neg	neg	neg	/	O
14	neg	neg	neg	/	O
15	neg	neg	neg	/	O
16	neg	neg	+	/	A
17	neg	neg	neg	/	A
18	neg	neg	neg	neg	S
19	+ 80	neg	neg	neg	S
20	neg	neg	neg	/	O
21	+ 40	neg	neg	/	A
22	neg	neg	neg	/	O
23	neg	neg	neg	/	O
24	neg	neg	neg	/	A
25	neg	neg	neg	/	O
26	neg	neg	/	/	A
27	neg	neg	neg	neg	A

Tabella 7: risultati dello screening; i campioni evidenziati sono quelli dubbi, che sono stati sottoposti a più campionamenti. Colonna Sintomatologia: (A) Asintomatico; (O) Oligosintomatico; (S) Sintomatico.

28	neg	neg	neg	/	A
29	neg	neg	neg	/	A
30	neg	neg	neg	/	A
31	neg	neg	neg	/	A
32	neg	neg	neg	/	O
33	+ 160	neg	+	+	O
34	neg	neg	neg	neg	O
35	neg	neg	neg	neg	O
36	neg	neg	neg	/	O
37	neg	neg	neg	/	O
38	neg	neg	neg	neg	S
39	neg	neg	neg	/	O
40	neg	neg	neg	/	A
41	neg	neg	/	/	O
42	neg	neg	neg	/	O
43	neg	neg	neg	/	A
44	neg	neg	neg	/	A
45	neg	neg	neg	/	O
46	+ 5120	+	+	+	S
47	neg	neg	neg	/	A
48	neg	neg	neg	/	A
49	neg	neg	neg	neg	O
50	+ 160	neg	neg	/	O
51	+ 80	neg	neg	neg	O
52	neg	neg	neg	neg	O
53	neg	neg	neg	/	A
54	neg	neg	neg	/	O
55	neg	neg	neg	/	A
56	neg	neg	neg	neg	S
57	neg	neg	neg	neg	S
58	+ 80	neg	neg	/	O

Tabella 7: segue.

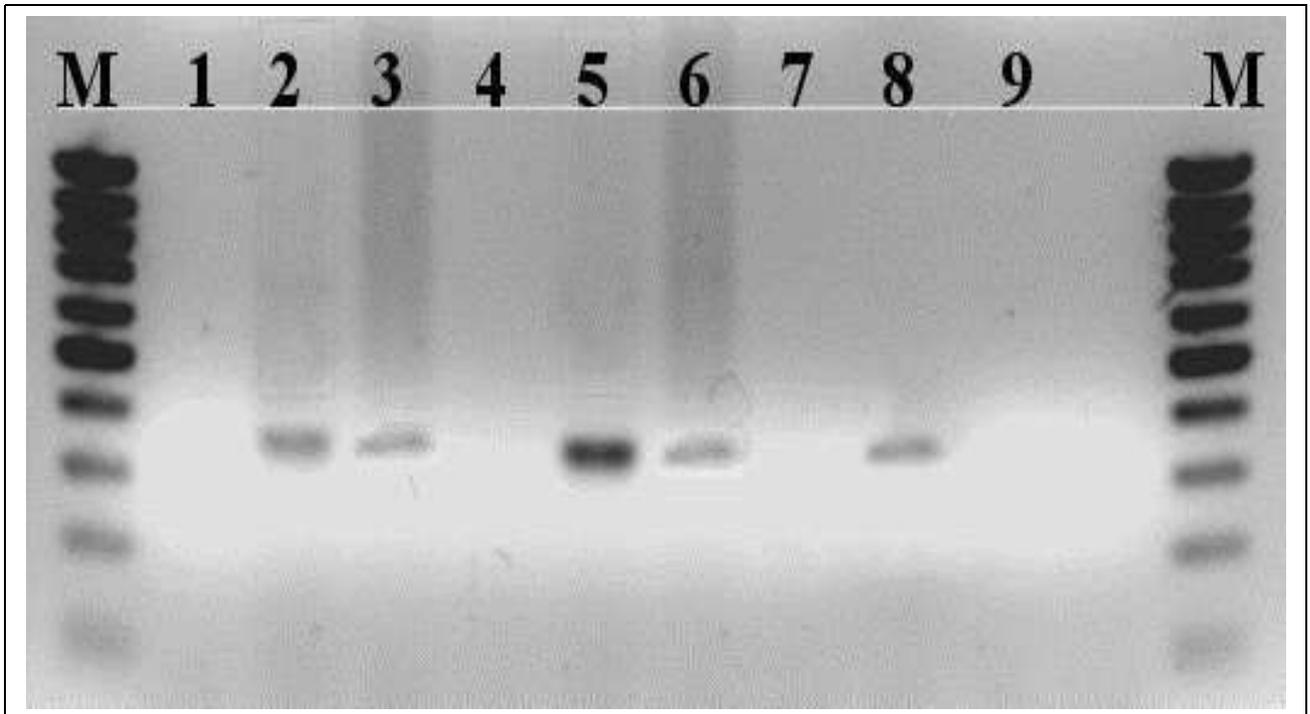


Fig. 26: elettroforesi su gel di agarosio di 4 amplificati alla n-PCR. Lanes: (M) Marker molecolare; (1,4,9) Bianchi; (2,3,5,6) Campioni; (7) Controllo negativo; (8) Controllo positivo.

Campione	I controllo	II controllo	III controllo	IV controllo	V controllo
3	IFI: - n-PCR b.: + n-PCR m.: - n-PCR l.: +	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: + 40 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -
4	IFI: +160 n-PCR b.: + n-PCR m.: - n-PCR l.: +	IFI: + 160 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO
16	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: +	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO
19	IFI: +80 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: +40 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: +80 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	NON ESEGUITO
21	IFI: +40 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	IFI: +40 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	IFI: +80 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	NON ESEGUITO
33	IFI: +160 n-PCR b.: - n-PCR m.: + n-PCR l.: +	IFI: +320 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO
50	IFI: +160 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	IFI: +80 n-PCR b.: - n-PCR m.: -	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO
51	IFI: +80 n-PCR b.: - n-PCR m.: - n-PCR l.: -	IFI: - n-PCR b.: - n-PCR m.: -	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO	NON ESEGUITO

can. (n-PCR b.= n-PCR a partire da buffy coat; n-PCR m.= n-PCR a partire da aspirato midollare; n-PCR l.= n-PCR a partire da aspirato linfonodale)

Relativamente ai campioni testati più volte (Tabella 8) si può notare come titoli anticorpali si siano riconfermati, oppure siano variati di una diluizione tranne per il cane 51, per il quale, essendo stato esaminato solo due volte, non si può escludere una variazione del titolo anticorpale in un momento successivo. Le positività osservate in n-PCR durante il primo prelievo in nessun caso si sono riconfermate.

B) Esame citologico.

Come si evince dalla Tabella n. 9, dei 24 cani testati attraverso esame citologico da aspirato midollare e/o linfonodale, soltanto uno (campione n.46) è risultato positivo (Fig. 27). Tale cane, con sintomatologia riferibile a leishmaniosi (linfadenomegalia, dermatite furfuracea, onicogrifosi, congiuntivite e perdita di peso), mostrava inoltre un titolo anticorpale di 5120 ed era risultato positivo in n-PCR a partire da tutti e tre i substrati.

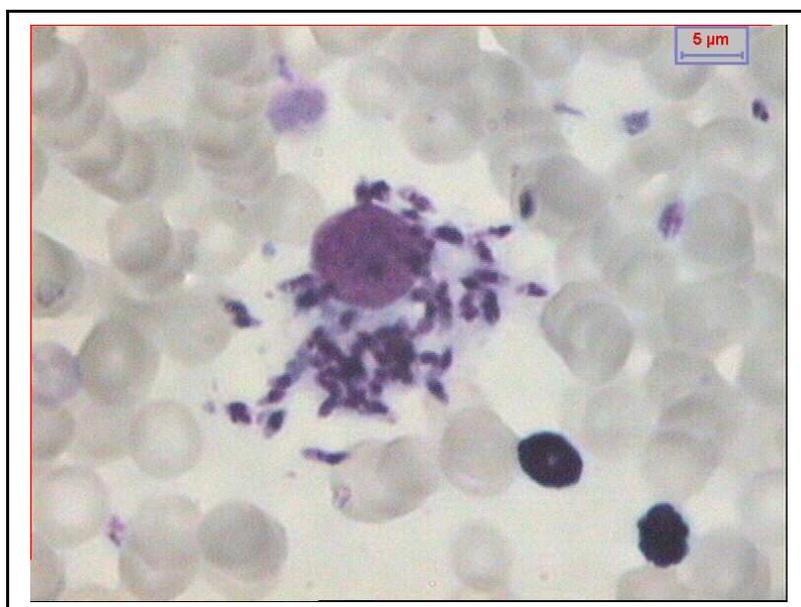


Fig.27: preparato citologico positivo da aspirato midollare del cane n.46.

Campione	Midollo	Linfonodo
3	neg	/
16	neg	/
19	neg	neg
21	neg	neg
25	neg	/
27	neg	/
29	neg	/
30	neg	/
31	neg	/
32	neg	/
33	neg	neg
34	neg	/
35	neg	/
36	neg	/
37	neg	/
38	neg	/
39	neg	/
40	neg	/
42	neg	/
46	pos	pos
47	neg	/
49	neg	/
51	/	neg
52	/	neg

Tabella 9: risultati dell'esame citologico a partire da aspirato midollare e linfonodale.

2. Elaborazione statistica dei dati.

Confrontando i risultati dell'IFI e delle n-PCR a partire dai tre diversi substrati, a due a due, attraverso il test di McNemar, si è evidenziata una concordanza fra tutti i test.

Lo stesso risultato è stato ottenuto confrontando i risultati delle metodiche diagnostiche con quelli ottenuti considerando la presenza/assenza di segni clinici.

Confrontando, mediante il test-t di Student, le prevalenze ottenute considerando solo i 17 cani sui quali è stato possibile eseguire le 4 metodiche diagnostiche (IFI; n-PCR buffy coat, n-PCR midollo e n-PCR linfonodo), non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa.

Considerando come veri positivi i soggetti con titolo anticorpale ≥ 160 , i valori di sensibilità e specificità calcolati per le n-PCR dai tre substrati sono riportati in Tabella 10.

	Sensibilità	Specificità
n-PCR buffy coat	66%	98%
n-PCR midollo	50%	97%
n-PCR linfonodo	75%	92%

Tabella 10: sensibilità e specificità della n-PCR a partire da tre diversi substrati

La sensibilità relativa dell'IFI con soglia 40 è risultata superiore del 60% rispetto a quella con soglia 160.

Relativamente ai 17 soggetti testati con tutte e quattro le metodiche, considerando come veri positivi quelli risultati positivi ad almeno un

test, sono stati calcolati i valori di sensibilità di ogni metodica (Tabella 11).

	Sensibilità
IFI (+ \geq 1/160)	83%
n-PCR buffy coat	83%
n-PCR midollo	50%
n-PCR linfonodo	70%

Tabella 11: valori di sensibilità dei diversi test, valutati per i 17 animali testati con tutte le metodiche, considerando come veri positivi quelli risultati positivi ad almeno un test.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le prevalenze osservate del 17,4 % se consideriamo come titolo soglia 40, oppure del 10,3 %, considerando come soglia di positività 160, risultano indicative di elevata diffusione dell'infezione per quanto inferiori a quelle osservate in precedenti indagini svolte nella Provincia di Firenze (Palanchi *et al.*, 1979; Andreani *et al.*, 1995).

L'elaborazione statistica dei dati ha mostrato come non esistano differenze statisticamente significative tra le prevalenze ottenute con le diverse metodiche (sierologia e PCR) possono essere sostanzialmente diversi. Ad esempio il cane n. 3 mostrava positività in n-PCR da buffy coat e linfonodo al primo prelievo, senza presentare alcuna reattività anticorpale; un titolo di 40 è stato rilevato solo al quarto campionamento, eseguito circa 7 mesi dopo. I risultati ottenuti dai diversi controlli eseguiti su detto cane ci inducono a considerarlo come probabile soggetto "resistente"; infatti nonostante abbia avuto contatto con il patogeno, come dimostrato sia dall'evidenziazione di DNA di leishmania, sia da reattività anticorpale, sembra non sviluppare l'infezione.

Una volta esclusa la presenza di falsi positivi attraverso prove di ripetibilità, il fatto di ottenere quindi PCR negative ai prelievi successivi al primo, ci induce a pensare che si sia creato una sorta di equilibrio tra sistema immunitario dell'ospite e parassita che mantiene quest'ultimo a livelli talmente bassi da non essere evidenziati in PCR (Paranhos-Silva *et al.*, 2003).

Discorso analogo può essere fatto per il cane n. 16, che ha mostrato solo una positività in n-PCR da midollo al primo prelievo, risultando poi sempre negativo a tutte le prove nei successivi controlli.

In uno studio condotto su 43 cani di razza beagle esposti a tre stagioni di trasmissione in area storicamente endemica e controllati a distanza di 1-3 mesi attraverso IFI, n-PCR da midollo, esame citologico e isolamento colturale, gli Autori hanno ipotizzato che una sorta di

“accumulo” del parassita nelle diverse stagioni di trasmissione possa spiegare come soggetti risultati inizialmente positivi solo in n-PCR e successivamente negativi per diverso tempo si siano infine positivizzati a tutti i test (Oliva *et al.*, 2006).

Sulla base di tale ipotesi, sembrerebbe opportuno prolungare le nostre indagini, al fine di verificare il “comportamento” degli animali in un periodo di tempo più “congruo”. Se l’ipotesi formulata da Oliva *et al.* (2006), venisse ulteriormente confermata, risulterebbe evidente come un contatto con il parassita non protegga gli animali da successive infezioni, ne tanto meno dalla progressione della malattia.

Dei 6 cani che mostravano al I controllo titolo anticorpale ≥ 160 , 5 presentavano positività in n-PCR da almeno un substrato. In tali soggetti non è stato però osservato un comportamento omogeneo relativamente ai risultati ottenuti dai diversi substrati (Tabella 7). Un titolo anticorpale ≥ 160 (indicativo di infezione in atto) si associa comunque sempre ad una positività in n-PCR. Fa eccezione un animale (cane n. 50), risultato negativo alla PCR su due substrati, per il quale peraltro non si può escludere una positività da linfonodo, non essendo stato possibile eseguire tale prelievo.

Analizzando questi dati appare quindi evidente come non risulti un prelievo più idoneo di un altro per evidenziare uno stato di infezione, ma sia necessario eseguire la n-PCR contemporaneamente da più substrati.

Due cani (n.4 e 33) positivi al primo controllo sia in IFI (160) sia in PCR (da due substrati), sono risultati negativi in PCR nei successivi controlli. Ciò potrebbe essere imputabile ad un protocollo terapeutico a base di sali quaternari di ammonio e allopurinolo che ha probabilmente abbassato la carica parassitaria al di sotto della soglia di sensibilità della n-PCR.

Relativamente ai 24 cani sottoposti all’esame citologico, soltanto uno è risultato positivo. Tale animale presentava un titolo anticorpale di 5120 ed era risultato positivo in n-PCR a partire da tutti i substrati.

Dei 23 negativi al citologico, 17 erano risultati negativi a tutte le prove; gli altri 6 erano risultati positivi ad almeno una delle altre metodiche utilizzate. Si può quindi dedurre come tale esame, altamente specifico, sia dotato di scarsa sensibilità, come evidenziato anche da altri Autori (Scarampella e Noli, 2000; Gradoni, 2002).

Calcolando i valori di sensibilità e specificità delle n-PCR a partire dai diversi substrati, considerando come veri positivi i cani con titolo anticorpale ≥ 160 , si può osservare come la n-PCR da linfonodo risulti la più sensibile, come indicato anche da altri Autori (Di Muccio *et al.*, 2004; Mancianti *et al.*, 2006). Tale valore non può però essere considerato come assoluto in quanto la n-PCR da linfonodo è stata eseguita su un basso numero di campioni (17), rispetto al totale (58) e andrà quindi verificata estendendo la prova a più soggetti. La n-PCR da midollo si è rilevata invece quella con la performance più scarsa, contrariamente a quanto osservato in altri studi (Di Muccio *et al.*, 2004; Mancianti *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2006). Tale discordanza potrebbe essere dovuta al fatto che da alcuni cani è stato possibile prelevare una scarsa quantità di materiale midollare, che potrebbe aver portato all'estrazione di poco acido nucleico.

Relativamente ai 17 soggetti sui quali è stato possibile eseguire tutte le metodiche, il calcolo delle sensibilità dei test ha evidenziato una maggior sensibilità dell'IFI e della n-PCR da buffy coat.

I valori di sensibilità da noi osservati risultano più bassi di quelli rilevati in letteratura (Reale *et al.*, 1999; Reithinger *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2004). Ciò potrebbe essere imputato al basso numero di campioni da noi esaminati con tutte e quattro le metodiche, ma anche dal tipo di campionamento da noi eseguito non basato sul sospetto clinico campioni peraltro scelti non in base a sintomatologia manifesta.

Dai nostri dati la n-PCR da *buffy coat* risulta la più sensibile, a differenza di quanto rilevato in altri Lavori in cui si evidenzia una maggior sensibilità a partire da midollo e linfonodo (Reithinger *et al.*,

2003; Manna *et al.*, 2004). Se i nostri risultati venissero confermati ampliando il campione, potrebbe essere facilitata l'applicazione routinaria della n-PCR, in quanto l'esecuzione di un prelievo ematico risulta certamente meno indaginoso rispetto ad un prelievo midollare o linfonodale.

Nonostante il basso numero di campioni esaminati, il presente studio ci permette di trarre alcune considerazioni che andranno poi confermate estendendo l'indagine a più animali.

Innanzitutto l'IFI si riconferma il *gold standard* per la diagnosi di LCan, accoppiando i più alti valori di sensibilità e specificità evidenziati anche da altri Autori (OIE, 2004; Mancianti *et al.*, 2006) alle applicabilità in indagini su ampia scala, in relazione anche al costo contenuto.

Altro dato che risulta dalla presente indagine è che non sembra esserci un substrato più idoneo di un altro per l'esecuzione della n-PCR, come dimostrato dall'assenza di differenze statisticamente significative tra le prevalenze ottenute partendo da differenti substrati.

Nessuna conclusione può essere tratta, dai dati in nostro possesso, relativamente all'impiego preferenziale dell'una o dell'altra metodica e alla scelta di un substrato piuttosto che un altro, ai fini della diagnosi in momenti diversi dell'infezione.

A tutt'oggi l'IFI rappresenta ancora la metodica più idonea per la diagnosi di LCan, mentre le metodiche biomolecolari possono essere utilizzate in affiancamento alla sierologia e come test di conferma nei casi in cui l'IFI dia risultati dubbi.

BIBLIOGRAFIA

- Aisa M.J., Castllejo S., Gallego M., Fisa R., Riera M.C., De Colamenares M., Torras S., Roura X., Sentis J., Portus M. (1998). Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (2), 154-159.
- Alvar J. (1999). Leishmania and HIV co – infection in the Mediterranean countries. Canine leishmaniasis: an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*. Barcelona, Spain, 78-81.
- Andreani E., Cerri D., Mancianti F., Pedrini A., Nuvolosi R., Ebani V., Mani P. (1995). Gli animali di affezione quali serbatoio e vettori di agenti patogeni per l'uomo. *Rivista Italiana d'Igiene*, Anno LV, 3 (4), 100-112.
- Ashford R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30, 1269- 1281.
- Baldelli R., Di Francesco A. (1992). Leishmaniosi in Italia: risultati di indagine sierologiche condotte su cani di diversa provenienza geografica. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 46, 1395-1399.
- Baldelli R., Di Francesco A. (1997). Sorveglianza della leishmaniosi canina in Emilia Romagna. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 51, 325-326.
- Baldelli R., Di Francesco A., Della Salda L., Stegagno G., Esposito S. (1999). Leishmaniosi canina: Segnalazione di casi autoctoni in Emilia Romagna. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 12, 21-24.

- Baldelli R., Battelli G., Maroli M., Mollicone E., Gudi A., Stegagno G., Tasini G. (2001). A new stable focus of canine leishmaniosis in Northern Italy. *Parassitologia*, 43, 151-153.
- Baldi L., Mizzoni A., Guarino A. (2004). Vecchi e nuovi focolai di leishmaniosi canina in Campania. *Parassitologia*, 46, 217-220.
- Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S. (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55 (3), 273-277.
- Bettini S., Gradoni L. (1986). Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implication for human leishmaniasis. *Insect Science and its Application*, 7, 241-245.
- Boari A., Vita S., Petrotta E., Lucani A., Britti D. (2005). Feline leishmaniasis: serological investigation in Abruzzo. *Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis, 10- 15 April 2005, Terrasini (Palermo)*, 115.
- Bogdan e Röllinghoff (1998). The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28, 121- 134.
- Bongiorno G., Habluetzel A., Traldi G., Maroli M. (2002). Notes on the sand fly fauna and their feeding habitus from an inland focus of canine leishmaniasis in central Italy (Marche region). *Parassitologia*, 44 (1), 23.
- Borja Cabrera GP., Santos FN., Paraguai de Souza E., Parra LM., Menz I., Xu Z., Chu HJ., Palatnik de Sousa CB. (2004). Phase I safety and immunogenicity trial of Leishmune® in dogs of brazilian endemic areas. *Abstract book of Third World Congress on Leishmaniosis, 10- 15 April 2005, Terrasini (Palermo)*, 116.
- Brianti E., Ludovisi A., Di Muccio T., Sorgi C., Gaglio G., Gramoccia M., Poglayen G. (2004). Natural case of leishmaniasis

- in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Parassitologia*, 46 (Suppl.1), 29.
- Brianti E., Gaglio G., Giannetto S., Poglayen G., Gramiccia M., Gradoni L. (2005). A cross-sectional study of canine leishmaniasis with serology and Nested Polymerase Chain Reaction in Salina Island (Southner Italy). Abstract book of the third World Congress on Leishmaniosis. Palermo-Terrasini Sicily, Italy, 10-15 April 2005, 119
 - Bulle B., Millon L., Bart J.M., Gallego M., Gambarelli F., Portus M., Schunur L., Jaffe CL., Fernandez- Barredo S., Alunna JM., Piarroux R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (9), 3391- 3397.
 - Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortasino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M. (2004). Monitoraggio della leishmaniosi canina in Nord Italia: aggiornamenti da un network scientifico. *Parassitologia*, 46, 193-197.
 - Capelli G., Di Muccio T., Gramiccia M., Natale A., Schievenin E., Vascellari M., (2004a). A new focus of canine leishmaniasis in Veneto region? Atti congresso Internazionale sulla Leishmaniosi Canina, Napoli (Italia), 17-18 Aprile 2004, 95-96.
 - Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141, 539-543.
 - Corazza M., Mancianti F., Poli A., Torres S. (1999). Immunologia della leishmaniosi. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 4, 13-25.
 - Corona M., Ciaramella P., Pelagalli A., Cortese L., Pero M.E., Santoro D., Lombardi P. (2003). Valutazione dell'aggregazione piastrinica in cani affetti da leishmaniosi a diverso stadio clinico.

Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, LVII, Ischia, Napoli, 327-328.

- Courtenay O., Quinnell R.J., Dye C. (2001). The role of foxes (*carnivora: canidae*) in the maintenance and transmission of *Leishmania infantum*: implications for peridomestic control. Summaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Crete (Greece), 20- 24 May 2001, 17-23.
- Courtenay O., Quinnell R.J., Garcez L.M., Shaw J.J., Dye C. (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *Journal of Infectious Diseases*, 186 (9), 1314-1320.
- Cruz I., Canavate C., Rubio J.M., Morales M., Chicharro C., Laguna F., Jimenez-Mejias M., Sirera G., Videla S., Alvar J., and the Spanish HIV-Leishmania Study Group. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosis and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96 (suppl.1), 185-189.
- Day M.J. (2004). Implications of the immune system during infection by *Leishmania* organism in canine. Atti congresso internazionale sulla leishmaniosi canina. Napoli (Italia), 17- 18 April 2004, 21- 28.
- Dereure J., Pratlong F., Dedet J.P. (1999). Geographical distribution and the identification of parasites causing canine Leishmaniasis in the Mediterranean basin. *Canine Leishmaniasis: an update*, Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcellona (Spain), 28 – 31 January 1999, 18- 25.
- Diaferia M., Veronesi F., Piergili Fioretti D. (2005). Leishmaniosi canina nella regione Umbria: aggiornamenti epidemiologici. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, 59, 131-132.
- Dietze R., Barros G.B., Teixeira L., Harris J., Michelson K., Falqueto A., Corey R. (1997). Effect of eliminative seropositive

- canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 25 (5), 1240-1242.
- Di Muccio T., Scalone A., Ludovisi A., Orsini S., Brianti E., Gaglio G., Forino D., Idone P., Libranti L., Gradoni L., Poglayen G., Gramiccia M., Giannetto S. (2004). Comparative performances of serological, parasitological and molecular techniques for the detection of canine leishmaniasis in the endemic focus of Salina Island, Italy. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 39.
 - Euzeby J. (1994). Histoire naturelle des Leishmanioses. *Revue de Medicine Veterinaire*, 145, 97- 105.
 - Favati V., Macchioni F., Mancianti F. (2000). Epidemiologia della leishmaniosi in Toscana. *Il Progresso Veterinario*, 15 (23), 33-35.
 - Ferrer L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. Summaries of Presentations of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcellona (Spain), 28-31 January 1999, 6-10.
 - Ferrer L. (2002). The pathology of canine leishmaniasis. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6- 9 February 2002, 21- 24.
 - Ferroglio E., Mignone W., Saracco M., Raimondo C., Gastaldo S., Trisciuglio A., Mancianti F., Guiso P., Tarello V., Ambrogio M., Trentin C., Balocchi E., Furno R., Sala L. (2002). Prevalence of seroreactors to *Leishmania infantum* in the canine population of North-west Italy. *Parassitologia*, 44 (Suppl.1), 68.
 - Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L. (2005). Canine leishmaniasis Italy. *Emerging infectious diseases*, 11, (10), 1618-1620.
 - Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Trisciuglio A. (2007). Evaluation of an ELISA rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology*, 144 (1-2), 162-166.

- Foglia Manzillo V., Pagano A., Manna L., Gradoni L., Maroli M, Oliva G. (2005). Controllo della leishmaniosi canina mediante l'uso di collari impregnati di Deltametrina: studio di fattori condizionanti l'evoluzione della malattia. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, 59, 279- 280.
- Foglia Manzillo V., Restucci B., Pagano A., Gradoni L., Oliva G. (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis". Veterinary Record, 158 (20), 690-694.
- Gallego M., Pratlong F., Fisa R., Riera C., Rioux J.A. Dedet J.P., Portus M. (2001). The life – cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95, 269-271.
- Gangneux J.P., Chau F., Sulahian A., Derouin F., Garin Y.J. (1999). Effects of immunosuppressive therapy on murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniosis. European Cytokine Network, 10 (4), 557- 9.
- Gradoni L. (1996). Epidemiologia. Quaderni di Veterinaria. La leishmaniosi canina a cura di S. Pizzirani, 18-22.
- Gradoni L. (1999). Aspetti epidemiologici recenti della Leishmaniosi Viscerale Umana in Italia. Atti: Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 14-16 dicembre 1999, 127.
- Gradoni L. (2001). Recenti Sviluppi nella terapia delle leishmaniosi. Annali dell' Istituto Superiore di Sanità, 37 (2), 255-263.
- Gradoni L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6-9 February 2002, 21- 24.
- Gradoni L., Ponzio E., Bettini S., Gramiccia M. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine

- leishmaniasis in two foci of Grosseto Province". Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 74, 421-422.
- Gradoni L., Scalone A., Gramiccia M. (1993). HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87 (1), 94-96.
 - Gradoni L., Gramiccia M. (1994). Leishmania infantum Tropism: Strain Genotype or Host Immune Status?. Parasitology Today, 10 (7), 264-267.
 - Gradoni L., Pizzuti R., Scalone A., Russo M., Gramiccia M., di Martino L., Pempinello R., Gaeta G.B. (1996). Recrudescenze of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90, 234-235.
 - Gradoni L., Gramiccia M., Khoury C., Maroli M. (2004). Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. Rapporti dell'Istituto Superiore di Sanità, 12.
 - Gramiccia M. (1997). La Leishmania del Vecchio mondo. Annali Istituto Superiore di Sanità, 33 (2), 231-239.
 - Gramiccia M., Gradoni L., Orsini S. (1992). Decreased sensitività to meglumine antimonite (Glucantime) in Leishmania infantum isolated from dogs after several courses drugs treatment. Annals of Tropical Medicine and Parassitology, 86 (6), 613- 620. Abstract. Fonte: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.htm>, 26 luglio 2004
 - Gramiccia M., Ludovisi A., Tardoni S., Di Muccio T., Mancianti F. (2002). PCR and Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood from dogs living in endemic areas of Italy. The Journal of Eukariotic Microbiology, 50, 36.
 - Gramiccia M., Di Muccio T., Marinucci M. (2004). Identificazione del parassita nella sorveglianza dei casi importati di leishmaniosi in Italia. Parassitologia, 46, 207- 210.

- Gramiccia M., Gradoni L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169-1180.
- Gravino A.E. (2004). Interpretazione del dato di laboratorio in corso di leishmaniosi criptica nel cane. *Parassitologia*, 46, 207-210.
- Jung R., Soondrum K., Neumaier M. (2000). Quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38, 833-883.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Killick-Kendrick R. (2001). Deltamethrin- impregnated dog collars (Scalibor Protector Band ®) protect dogs from sand fly bites. Summeries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Crete (Greece), 20- 24 May 2001, 24- 31.
- Killick- Kendrick R. (2002). The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and trasmission of leishmaniasis by bite. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6-9 February 2002*, 57- 68.
- Killick- Kendrick R., Ready P.D., Pampiglione S. (1977). Notes on the prevalence and host preferences of *Phlebotomus perfiliewi* in Emilia Romagna, Italy. In: *Ecologie des leishmaniosis. Colloques Internationaux CNRS- n° 239*: 169-175.
- Killoick-Kendrick R., Killick-Kendrick M. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcellona (Spain), 28-31 January 1999*, 26- 31.
- Kontos V.J. e Koutinas A.F. (1993). Old World Canine Leishmaniasis. *The Compendium*, 15 (7), 949-961.
- Lachaud L., Marchergui- Hammami S., Chabbert E., Dereure J., Dedet J.P., Bastien P. (2002). Comparison of Six PCR Methods

- Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (1), 210-215.
- Le Fichoux I., Quaranta J.F., Auvévre J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J. (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicità in Southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), 1953-1957.
 - Macrì G. (1999). La leishmaniosi canina: aspetti clinici ed epidemiologici con particolare riferimento alla diffusione della malattia a Roma e nel Lazio. Atti: Congresso di Igiene Urbana Veterinaria, Roma, 14-16 dicembre 1999, 129-130.
 - Mancianti F. (2004). Leishmaniosi felina: quale ruolo epidemiologico? *Parassitologia*, 46, 203-206.
 - Mancianti F. (2004a). Current diagnostic approach for canine leishmaniasis. Atti Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi Canina, Napoli (Italia), 17-18 Aprile 2004, 59-61.
 - Mancianti F., Gradoni L., Gramoccia M., Pieri S., Marroncini A. (1986). Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Tropical medicine and parasitology*, 37, 110-112.
 - Mancianti F., Falcone M.L., Giannelli C., Poli A. (1995). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and in direct immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 59, 13-21.
 - Mancianti F., Pedonese F., Poli A. (1996). Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with in direct immunofluorescence assay. *Veterinary Parasitology*, 65, 1-9.
 - Mancianti F. e Bizzetti M. (2000). Terapia della leishmaniosi canina. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 2000; 5, 7-17.

- Mancianti F., Darini B., Merildi V., Franceschi A. (2006). Comparison of PCR and IFAT in the diagnosis of leishmaniasis in naturally infected dogs. *Parassitologia*, 48, 321.
- Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L.M., Rinaldi L., Cingoli G., Gravino A.E. (2004). Comparative study on different tissue sampling types for PCR- based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 50.
- Mansueto S., Di Leo R., Miceli M.D., Quartararo P. (1982). Canine leishmaniosis in three foci of Western Sicily. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 565.
- Mantovani A., Canestri-Trotti G., Battelli G., Nipoti C., Pampiglione S. (1982). Considerazioni sull'indagine sierologica di massa eseguita in occasione dell'episodio di leishmaniosi viscerale verificatesi in Emilia-Romagna (1971- 1972). *Giornale di malattie Infettive e Parassitarie*, 34, 1488-1492.
- Marcato P.S. (2002). *Dermatologia*. In: *Patologia Sistemica Veterinaria. Ed agricole*, 1° edizione, Bologna, 137-142.
- Maroli M. (1999). I vettori di Leishmaniosi in ambiente urbano. *Atti: Congresso di Igiene Urbana Veterinaria*, Roma 14-16 Dicembre 1999, 131- 135.
- Maroli M. (2003). Controllo della leishmaniosis canina mediante l'uso di di massa di una banda protettiva. *Controllo della Leishmaniosi: Veterinari e Medici a confronto*, Sintesi delle presentazioni, Roma, 25 maggio 2003, 11.
- Maroli M. (2004). Leishmap: the network for monitorino the spreading of canine leishmaniasis and phlebotomine vectors in Northern Italy. *Atti congresso internazionale sulla leishmaniosis canina*, Napoli (Italia), 17-18 Aprile 2004, 109-112.

- Maroli M., Pozio E., Gradoni L., Gramoccia M., Bettini S. (1980). Osservazioni sui vettori della leishmaniosi in provincia di Grosseto. *Parassitologia*, 22, 331-332.
- Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L. (1987). Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81 (4), 596-598.
- Maroli M., Sansoni L., Bigliocchi F., Khoury C., Valsecchi M. (1995). Reperimento di *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (= *P. major* s.l.) in un focolaio di leishmaniosi del Nord Italia (Provincia di Verona). *Parassitologia*, 37, 241-244.
- Maroli M., Khoury C. (1998). Leishmaniasis vectors in Italy. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, 3 (3-4), 67-71.
- Maroli M., Mizzoni V., Baldi L., Oliva G., Gradoni L. (2002). The control of canine leishmaniasis with Scalibor Protector Bands ® in southern Italy: pilot field studies. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (Spain), 6- 9 February 2002*, 81- 86.
- Maroli M., Khoury C., Bianchi R., Ferroglio E., Natale A. (2002a). Recent findings of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 in Italy and its western limit of distribution. *Parassitologia* 44: 103-109.
- Maroli M., Cavallini C., Khoury C., Miceli N., Manilla G. (2004). Entomological survey of sandflies (Diptera, Psychodidae) in the province of l'Aquila (Abruzzo). *Parassitologia*, 1991, 33 (2-3), 127-131.
- Maroli M. e Khoury C. (2004). Prevenzione e controllo dei vettori di leishmaniosi: attuali metodologie. *Parassitologia*, 46, 211-215.
- Marini A., Squaranti C., Cometti M., Boni V. (1994). Diagnosi della leishmaniosi nel cane. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 15 (12), 9-13.

- Masucci M., De Majo M., Contarino R.B., Borrato G., Vitale F., Pennini M.G. (2003). Canine Leishmaniasis in the Newborn Puppy. *Veterinary Research Communications*, 27 (Suppl.1), 771-774.
- Mencke N., Volf P., Volfova V., Stanneck D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) on dogs. *Parassitological Research*, 90, 108- 111.
- Mercier P., Jasmin P., Sanquer A. (2004). Prevention of sandfly attack by topical application of a permethrin –pyroxyfen combination on dogs. *Atti Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi Canina, Napoli (Italia), 17- 18 Aprile 2004*, 106-108.
- Mylonakis M.E., Papaioannou Saridomichelakis M.N., Koutinas A.F., Billinis C., Kontos V.I. (2005). Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary and Clinical Pathology*, 34 (3), 243- 247.
- Mohebbi M., Taran M., Zarei Z. (2004). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology*, 121, 239-245.
- Molina R., Lohse J.M., Nieto J. (1999). Efficacia della permetrina nei confronti di *Phlebotomus perniciosus*. *Documenti veterinari*, 7/8, 57- 61.
- Mollicone E. (2003). Epidemiologia e controllo della leishmaniosi canina: indagini in Emilia-Romagna nel triennio 2000-2002. Tesi di Dottorato in Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi - XV ciclo. *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna.
- Mollicone E., Battelli G., Baldelli R. (2002). Autochthonous focus of canine leishmaniosis in the Bologna Province (Italy). *Parassitologia*, 44 (Suppl.1),113.

- Mollicone E., Battelli G., Gramiccia M., Maroli M., Baldelli R. (2003). A stable focus of canine leishmaniosis in the Bologna Province, Italy. *Parassitologia*, 45, 85-88.
- Mollicone E., Baldelli R. (2003). Leishmaniosi canina: indagine epidemiologica in un comune della provincia di Bologna. *Veterinaria*, 3, 49-55.
- Moreira E.D. Jr., Mendes de Souza V.M., Sreenivasan M., Nascimento E.G., Pontes de Carvalho L. (2004). Assesment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary Parasitology*, 122 (4), 245-252.
- Moreno J.e Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 68 (9), 399- 404.
- Mortarino M., Franceschi A., Mancianti F., Mazzocchi C., Genchi C., Bandi C. (2004). PCR quantitativa nella diagnosi di *Leishmania*. *Parassitologia*, 46, 163-167.
- Natale A., Capelli G., Passarini G., Frangipane di Regalbono A., De Guelfi S., Vascellari M., Gramoccia M., Pietrobelli M. (2005). Surveillance of CanL in a new colonized area by *Leishmania infantum* in north-eastern Italy in 2004. Abstrat book of Third World Congress on Leishmaniosis, 10- 15 April 2005, Terrasini (Palermo), 181.
- Nogueira F.S., Moreira M.A.B., Borja-Cabrera G.P., Santos F.N., Menz I., Parra L.E., Xu Z., Chu H.J., Palatnik-de-Sousa C.B., Luvizotto M.C.R. (2005). Leishmune vaccine blocks the transmission of canine leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, 23, 4805- 4810.
- Noli C. (1999). La leishmaniosi del cane. *Waltham focus*, 9(2), 16-24.

- Norsworthy N.B., Sun J., Elnaiem D., Lanzaro G., Soong L. (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and Immunity*, 72, 3, 1240- 1247.
- OIE, (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial Animals* 5th ed., OIE, Paris.
- Oliva G. (2003). Simposio, Controllo della Leishmaniosi: Veterinari e Medici a confronto, sintesi delle presentazioni, Roma, 25 Maggio 2003, 15- 17.
- Oliva G. (2004). Clinical aspects of canine leishmaniasis in Italy. *Atti Congresso Internazionale sulla Leishmaniosi Canina*, Napoli (Italia), 17- 18 Aprile 2004, 63- 65.
- Oliva G., Cortese L., Ciaramella P., De Luna R. (1996). Trattamento terapeutico della leishmaniosi del cane. *Veterinaria*, 10 (3), 115-127.
- Oliva G., Foglia Manzillo V., Pagano A. (2004). Evoluzione dei protocolli terapeutici in corso di leishmaniosi canina. *Parassitologia*, 46, 231- 234.
- Oliva G., Scalone A., Foglia Manzillo V., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T., Gradoni L. (2006). Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serological, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4), 1318-1322.
- Palarchi M., Villini E., Cavallini R., Zanchi R., Tasselli E. (1979). Indagini sulla leishmaniosi del cane nel territorio di Firenze. *Atti SISVet*, 33, 280.
- Pampiglione S., Schlick G., La Placa M. (1974). Studies on Mediterranean leishmaniasis. An outbreak of visceral leishmaniasis in northern Italy. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68 (5), 349-359.

- Paglia M.G., Gentile M., Pupillo L.P. (2004). Evaluation of PCR-RFLP analysis for detection and identification of *Leishmania* species. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1), 183.
- Paranhos-Silva M., Oliveira G.G., Reis E.A., de Menezes R.M., Fernandes O., Sherlock I., Gomes R.B., Pontes-de Carvalho L.C., dos-Santos W.L. (2003). A follow-up of beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology*, 114, 97-111.
- Pennisi M.G., Masucci M., Catarsini O. (1998). Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* in gatti FIV+ che vivono in zona endemica. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 52, 265-266.
- Pennisi M.G., Maxia L., Vitale F., Masucci M., Borrato G., Caracappa S. (2000). Studio dell'infezione da *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 54, 215-216.
- Pennisi M.G., Venza M., Reale S., Vitale F., Lo Giudice S. (2003). Leishmaniosi nel gatto: descrizione di quattro casi clinici. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Ischia, Napoli, 335-336.
- Poglayen G., Marangon S., Manca M.G., Capelli G., Della Pozza M., Casati D., Vantini E., Bressan G., Passarini G. (1997). A new outbreak of canine leishmaniosis in the North East of Italy. *Acta Parasitologica Turcica*, 21 (1), 143.
- Poli G. (1996). Diagnostica sierologica le reazioni antigene-anticorpo in vitro. In: *Microbiologia e Immunologia Veterinaria* (Poli G. e Cocilovo A.). UTET, Torino, 645-667.
- Poli A., Abramo F., Barsotti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi A., Mancianti F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 106 (3), 181-191.
- Pozio E., Maroli M., Gradoni L., Gramocchia M. (1985). Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of

- experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. . Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79, 524-526.
- Reale S., Maxia L., Vitale F., Glorioso N.S., Caracappa S., Vesco G. (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. Journal of Clinical Microbiology, 37 (9), 2931-2935.
 - Reale S., Vitale F., Manna L., Gravino A.E., Pennisi M.G., Li Vecchi L., Petrotta F. (2005). Analisi di microsatteliti per la tipizzazione di ceppi di leishmania. Atti SISVet., 59, 215- 216.
 - Reithinger R., Espinoza J.C., Courtenay O., Davies C.R. (2003). Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool to Detect *Leishmania (Viannia) spp.* In Domestic Dogs (*Canis familiaris*). Journal of Clinical Microbiology, 41 (4), 1486- 1493.
 - Requena J.M., Soto M., Quijada L., Alonso C. (1997). Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. Memorial Institutes Oswaldo Cruz, 92(6), 853-858.
 - Ribeiro JM. (1995). Blood- feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. Infectious agents and disease, 4 (3), 143- 152.
 - Rivò G., Poggi M., Mignone W., Mancianti F. (2000). Immunomigrazione nella diagnosi sierologia della leishmaniosi canina: prova comparativa con l'immunofluorescenza indiretta. Veterinaria, 14 (2), 61-64.
 - Romi R., Khoury C., Bigliocchi F., Maroli M. (1994). Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 33-42.
 - Rossi L., Ferroglio E., Guiso P., Ferrarsi P., Pancaldi P. (1999). Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese. Medicina Veterinaria Preventiva, 20, 20.
 - Rossi E., Buongiorno G., Scalone A., Di Muccio T., Ciolli E., Gramoccia M., Gradoni L., Maroli M. (2004). Epidemiological

- studies in a new canine leishmaniasis focus in Rome province, central Italy. *Parassitologia*, 46 (Suppl.1), 63.
- Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Ruggiero M. (2005). Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy. Third World Congress on Leishmaniosis. 10-15 April 2005, Palermo, Terrasini, Sicily (Italy), Abstract book, 201.
 - Rüfenacht S., Sager H., Müller N., Schaerer V., Heier A., Welle M.M., Roosje P.J. (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 156 (17), 542- 5.
 - Ruitenbergh E.J., Solano-Gallego L., Monen J., Pinelli E., Rutten V.P.M.G. (2001). Immune responses in canine leishmaniasis. Summaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum. Crete (Greece), 20- 24 May 2001, 32- 36.
 - Scalone A., De Luna R., Oliva G., Baldi L., Satta G., Vesco G., Mignone W., Trilli C., Mondesire R.R., Simpson D., Donoghue A.R., Frank G.R., Gradoni L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 104, 275-285.
 - Scarampella F., Noli C. (2000). La Leishmaniosi canina. *Summa*, 17 (8), 43- 50.
 - Shantz P., Steurer F., Jackson J., Rooney J., Akey B., Duprey Z., Breitschwerdt E., Rowton E., Gramiccia M. (2001). Emergence of visceral leishmaniasis in dogs in North America. Summaries of presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum. Crete (Greece), 20- 24 may 2001, 4-16.
 - Siegel S. (1980). *Statistica non parametrica per le scienze del comportamento*. Organizzazioni Speciali, Firenze.
 - Thompson J.D., Higgings D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

- Trees A.J., Howman P.J., Bates P., Noyes H.A., Pralong F., Blakely J., Niles J., Guy M. W. (2001). Summeries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum. Crete (Greece), 20 – 24 may, 2001, 1-3.
- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (2002). *Parassitologia Veterinaria*. UTET, 2° edizione, Torino.
- Van EysGJJM., Schoone G.J., Kroon NCM., Ebelling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51, 133-142.
- Vercammen F., Berkvens D., Le Ray D., Jacquet D, Vervoort T. (1997). Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Veterinary Record*, 141, 331-335.
- Vercammen F., Barkvens D., Brandt J., Vansteenkiste W. (1998). A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. *Veterinary Parasitology*, 79, 221-228.
- Vitale F. (2004). Canine leishmaniasis in the Mediterranean area: epidemiological aspects. *Atti Congresso Internazionale sulla leishmaniosis canina, Napoli (Italia), 17-18 Aprile 2004*, 79-81.



COORDINAMENTO SCIENTIFICO

Istituto Superiore di Sanità, Roma - L. Gradoni, M. Gramiccia, M. Maroli

UNITÀ OPERATIVE

- Uni Bologna, Medicina Veterinaria - Dipartimento SPVPA - R. Baldelli
- Uni Milano, Medicina Veterinaria - Dipartimento PAISPV - C. Genchi, M. Mortarino
- Uni Padova, Medicina Veterinaria - Dipartimento SSV - M. Pietrobelli, G. Capelli
- Uni Torino, Medicina Veterinaria - Dipartimento PAEE - L. Rossi, E. Ferroglio

SCHEDA RACCOLTA DATI LEISHMANIOSI CANINA

Data prelievo No. SCHEDA

Tipo di campione:

Siero

Sangue periferico

Aspirato linfonodale

Aspirato midollare

Microscopia

Coltura

IFAT

WB

PCR

ESITO ESAME:

Dati del soggetto: (nome)

Maschio Femmina Età..... Razza.....

Provenienza: nazione..... regione.....

Habitat abituale di vita:

urbano pianura

peri-urbano collina

rurale montagna

Luogo abituale di vita:

in appartamento all'aperto in canile

Ricovero notturno: all'aperto al chiuso

Convive con altri cani: NO SI (quanti).....

Spostamenti/viaggi: NO SI se si, Luogo.....

Periodo: anno.....

Stagione.....

Sintomatologia riferibile a leishmaniosi:

NO

SI: linfoadenomegalia (poplitei prescapolari retroscapolari sistemica)

dermatite furfuracea alopecie ulcere onicogrifosi epistassi

mucose pallide lesioni oculari splenomegalia perdita di peso

altro.....

Proprietario del cane

Nome/Cognome

Indirizzo: Città

Provincia CAP Telefono

Veterinario

Nome/Cognome.....

Indirizzo: Città

Provincia CAP Telefono

In caso di dubbi contattare

Allegato 2

SCHEDA ANAMNESTICA PER LEISHMANIOSI CANINA

Data prelievo sangue.....

SIE04/.....
(spazio riservato al laboratorio)

Nr. Provetta.....

ESITO.....

DATI del CANE:

nome/ numero:..... m f età.....
razza.....

data di ingresso nel canile.....

provenienza.....

sintomatologia riferibile a leishmaniosi:

NO

SI: linfoademealia (poplitei, prescapolari, retroscapola, sistemica)

dermatite furfuracea, alopecia, ulcere, onicogrifosi, epistassi,

mucose pallide, lesioni oculari, splenomegalia, perdita di peso,

altro.....

terapie effettuate

NO

SI: Quali?.....

Quando?.....

.....

.....

DATI DEL CANILE:

habitat: urbano, periurbano (pianura, collina, montagna), rurale.

Ricovero notturno: in box all'aperto al chiuso

Numero cani presenti..... capienza max canile.....

Trattamenti disinfestanti:

NO

SI: quali?.....quando?.....

SCHEDA ANAMNESTICA PER LEISHMANIOSI CANINA

Data prelievoNo. SCHEDA

Tipo di campione: <input type="checkbox"/> Siero <input type="checkbox"/> Sangue periferico <input type="checkbox"/> Aspirato linfonodale <input type="checkbox"/> Aspirato midollare
--

<input type="checkbox"/> Microscopia <input type="checkbox"/> Coltura <input type="checkbox"/> IFAT <input type="checkbox"/> WB <input type="checkbox"/> PCR
--

ESITO:

DATI del CANE:

nome/ numero:..... m f età.....
razza.....

data di ingresso nel canile.....

provenienza.....

sintomatologia riferibile a leishmaniosi:

NO

- SI: linfoademegalia (poplitei, prescapolari, retroscapola, sistemica)
 dermatite furfuracea, alopecia, ulcere, onicogrifosi, epistassi,
 mucose pallide, lesioni oculari, splenomegalia, perdita di peso,
 altro.....

terapie effettuate

NO

SI: Quali?.....

Quando?.....

.....
.....

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

PROVA DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFI) PER RICERCA DI IMMUNOGLOBULINE G ANTI - *LEISHMANIA INFANTUM* IN SIERI DI CANE



- **Modificata lista di distribuzione**
- **Testo eliminato nel sottocapitolo 6.1**
- **Testo modificato nel sottocapitolo 7.2**
- **Testo eliminato nel capitolo 10**

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Laureato frequentatore	Silvia Piva		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Raffaella Baldelli	03/10/03	Antonietta Di Francesco	06/10/03	Responsabile Laboratorio SIE	07/10/03

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Allegato 1: Schema vetrino per immunofluorescenza

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Diagnosi sierologica ed indagini sieroepidemiologiche per leishmaniosi canina, a scopo di ricerca e/o conto terzi.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.

2.2 Piergili Fioretti D., Curti M., Vitellozzi G. (1981) – La prova di immunofluorescenza nella diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina. Parassitologia, 23, 223-225.

2.3 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.4 SOP MIPAV SIE 10.01.002 “Preparazione antigene leishmania per immunofluorescenza indiretta”.

2.5 SOP MIPAV SIE 10.01.003 “Titolazione del coniugato per la prova di immunofluorescenza indiretta”.

2.6 SOP MIPAV 10.02.01 “Gestione del sistema di accettazione del Servizio MIPAV”

2.7 SOP MIPAV 10.02.02 “Gestione del campione presso il laboratorio di prova”

2.8 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.9 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

Coniugato = immunoglobuline anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina

Titolo (del siero) = massima diluizione del siero alla quale si evidenzia reazione positiva

Ag = antigene

Ig = immunoglobuline

IFI = immunofluorescenza indiretta

PBS = Phosphate Buffered Saline

< = inferiore

≥ = maggiore o uguale

≤ = inferiore o uguale

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- immunoglobuline anti-IgG (H+L) di cane, coniugate con isotiocianato di fluoresceina
- blu d'Evans 1%
- glicerina tamponata [testo eliminato]
- H₂O deionizzata
- Ag *Leishmania infantum*, preparato e conservato con le modalità descritte nella SOP MIPAV SIE 10.01.002
- siero di controllo positivo: siero di cane contenente IgG anti-leishmania, a titolo noto in IFI ≥ 1:80
- siero di controllo negativo: siero di cane con titolo IgG < 1:80 in IFI.

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore (– 20°C ± 3)
- microscopio a fluorescenza Leitz Diaplan dotato di sistema a luce incidente con obiettivo NPL Fluotar 40/0,70
- pHmetro (± 0,05%)
- termostato (37°C ± 1)
- cilindro graduato di vetro capacità 1 litro
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di vetro 12 × 100-120 mm
- pipette di vetro classe B 2 ml
- propipettatore
- micropipette a volume variabile da 5-40 µl e 40-200 µl
- puntali monouso da 5-200 µl
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro sui quali è stato fissato l'Ag *Leishmania* secondo le modalità descritte nella SOP MIPAV SIE 10.01.002
- vetrini coprioggetto
- camera umida
- contenitori di vetro per lavaggio vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Procedure preliminari

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

- Preparazione PBS: pesare 7,650 g di NaCl +0,724 g di Na₂HPO₄ + 0,210 g di KH₂PO₄, portare al volume di 1 litro con H₂O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4.
- Preparare gli schemi dei vetrini, riproducenti gli anelli dei vetrini per immunofluorescenza (vedi allegato 1), riportando il numero di identificazione del siero in esame e, per ogni anello, le diluizioni dello stesso. Riportare inoltre su ciascuno schema la data di esecuzione della prova, il numero progressivo del vetrino e la sigla dell'operatore.
- Togliere i vetrini dal congelatore, lasciarli a temperatura ambiente per 10 min circa, sciacquarli con H₂O deionizzata e lasciarli asciugare a temperatura ambiente.

7.2 Prova a screening

- Allestire in provetta, per ciascun siero in esame, due diluizioni in PBS pH 7,2-7,4, pari a 1:40 e 1:80; allestire in provetta una diluizione pari a 1:80 del siero di controllo positivo e del siero di controllo negativo.
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare 25 µl delle diluizioni 1:40 e 1:80 di ciascun siero in esame negli specifici anelli del vetrino e predisporre un anello per il controllo positivo (25 µl siero positivo), un anello per il controllo negativo (25 µl siero negativo) e un anello per il controllo Ag (25 µl PBS).
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare in tutti gli anelli 25 µl di coniugato alla diluizione d'uso (vedi SOP MIPAV SIE 10.01.003), addizionato con blu d'Evans 1:10.000.
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Dispensare in ciascun anello una goccia di glicerina tamponata e coprire i vetrini con vetrino coprioggetto.
- Leggere i vetrini al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40/0,70: la positività della reazione è indicata da fluorescenza giallo-verdastra delle leishmanie, su fondo scuro.

7.3 Prova a diluizione

Nella prova a diluizione vengono saggiati i sieri risultati positivi nella prova a screening alla diluizione di 1:80.

Di ogni siero vengono saggiate, secondo le modalità descritte al punto 7.2, diluizioni per raddoppio, a partire dalla diluizione pari a 1:40, fino al raggiungimento del titolo.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

Si considera positivo un siero che mostri reazione positiva ad una diluizione \geq 1:80.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 6 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Rev. 1

I risultati vengono riportati sul Registro Campioni del Laboratorio di Sierologia, con l'indicazione, in caso di positività, del titolo del siero (SOP MIPAV 10.02.02).

Rapporto di prova viene compilato secondo quanto previsto dalla SOP MIPAV 10.02.01, relativamente a prestazioni conto terzi; per quanto riguarda i risultati relativi a campioni esaminati a scopo di ricerca, questi vengono comunicati con modalità variabili con la tipologia della ricerca.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

NA

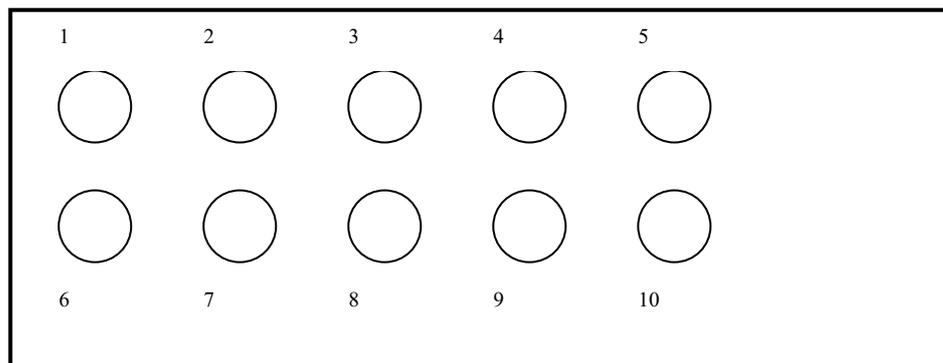
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

I puntali e i vetrini vengono raccolti, trattati e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). Le provette di vetro, utilizzate per le diluizioni dei sieri e del coniugato, [testo eliminato] vengono avviate agli opportuni trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. I contenitori utilizzati per i lavaggi dei vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.

<i>Università degli studi di Bologna</i> <i>Facoltà di Medicina Veterinaria</i> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Allegato 1
	SOP MIPAV SIE 10.01.004	Pag. 1 di 1 Rev. 0

ALLEGATO 1

Schema vetrino per immunofluorescenza



 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

MODALITÀ DI COLTURA DELLE LEISHMANIE

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Tecnico di laboratorio	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Emanuela Mollicone		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Antonietta Di Francesco	14/05/02	Emanuela Mollicone	03/06/02	Responsabile Laboratorio SIE	04/06/02

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Coltura di leishmanie da utilizzare come antigene nella reazione di immunofluorescenza indiretta.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Evans D.A. (1987) – *Leishmania*. In: Taylor A.E.R., Baker J.R.: *In vitro* methods for parasite cultivation. Academic Press, London, pp.59-.

2.2 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.

2.3 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.4 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.5 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

EMTM = Tobie medium modified by Evans

PBS = Phosphate Buffered Saline

TRIS = Trishydroxymethylaminomethane

≤ = inferiore o uguale

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- agar
- peptone da batteriologia
- estratto di carne
- H₂O deionizzata
- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

- KCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄12H₂O (min. 99%)
- CaCl₂2H₂O (min. 99%)
- MgSO₄7H₂O (min. 99%)
- MgCl₂6H₂O (min. 99%)
- L-prolina (min. 99%)
- C₄H₁₁NO₃ (TRIS) (min. 99,9%)
- gentamicina solfato (circa 600 µg/mg)
- siero fetale bovino
- sangue di coniglio defibrinato
- ceppo di riferimento OMS di *Leishmania infantum* (MHOM/TN/80/IPT1), fornito dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- autoclave
- agitatore per provette tipo vortex
- bagnomaria (48°C ± 1)
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore (- 20°C ± 3)
- frigorifero (5°C ± 3)
- microscopio ottico obiettivo 40 ×
- pHmetro (± 0,05%)
- termostato (23°C ± 1)
- termostato (37°C ± 1)
- becher di vetro da 1 litro
- cilindro graduato di vetro da 100 ml
- cilindro graduato di vetro da 1 litro
- matracci di vetro da 250 ml
- filtri sterili da siringa da 0,20 µ
- pipette di vetro classe B 10 ml ± 0,1
- pipette di vetro classe B 2 ml sterili o pipette 2ml monouso sterili
- pipette pasteur di vetro sterili
- propipettatore
- provette di vetro da minimo 10 ml, con tappo a vite
- provette di vetro 16 × 160 mm, con tappo cap-o-test
- inclinatore in acciaio per provette
- vetrini portaoggetto
- vetrini coprioggetto

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Preparazione del terreno di coltura: terreno EMTM

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

7.1.1 Preparazione della fase solida

- Misurare in un cilindro graduato circa 100 ml di H₂O deionizzata e travasarli in parte in un matraccio da 250 ml.
- Pesare 0,8 g di NaCl, 0,5 g di peptone da batteriologia e 0,3 g di estratto di carne; trasferirli nel matraccio in cui si aggiungerà la restante H₂O deionizzata fino ad un volume finale di 100 ml.
- Aggiungere nel matraccio 2 g di agar.
- Sciogliere la soluzione a bagnomaria e distribuirne 3 ml in provette di vetro 16 × 160 mm con tappo cap-o-test.
- Autoclavare le provette a 121°C per 15 min.
- Conservare il terreno in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 1 anno.

7.1.2 Preparazione della fase liquida

- Misurare in un cilindro graduato circa 500 ml di H₂O deionizzata e travasarne una parte in un becher.
- Eseguire su bilancia analitica le seguenti pesate.

KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,03 g
KH ₂ PO ₄	0,03 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0925 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,05 g
NaCl	4 g
L-prolina	0,5 g
- Sciogliere i reagenti nell'acqua deionizzata presente nel becher e quindi aggiungere la restante H₂O deionizzata fino al volume finale di 500 ml.
- pHare e aggiustare il pH a 7,2 con una soluzione di TRIS 0,05 M (0,606 g di C₄H₁₁NO₃/100 ml di H₂O deionizzata).
- Distribuire un volume di 5 ml in provette di vetro con tappo a vite.
- Autoclavare le provette a 121°C per 15 min.
- Conservare il terreno in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 1 anno.

7.1.3 Preparazione della fase liquida completa

- Preparazione PBS: pesare 0,765 g di NaCl + 0,072 g di Na₂HPO₄ + 0,021 g di KH₂PO₄, portare al volume di 100 ml con H₂O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4; sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
- Diluire la gentamicina solfato in PBS: 2,5 mg/ml di PBS sterile, filtrare attraverso filtri da 0,20 µ e conservare in aliquote in congelatore per massimo 6 mesi.
- Al momento dell'uso completare la fase liquida con l'aggiunta di siero fetale bovino (5%) e di gentamicina solfato diluita (10%): 4,25 ml di fase liquida + 0,25 ml di siero fetale bovino + 0,50 ml di gentamicina diluita.

7.1.4 Aggiunta di sangue defibrinato di coniglio alla fase solida

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 6 di 6
	SOP MIPAV SIE 10.01.001	Rev. 0

- Sciogliere a bagnomaria le provette contenenti il terreno in fase solida e collocarle in bagnomaria a 48°C per mantenere il terreno in fase liquida.
- Distribuire, in condizioni di sterilità, 0,45 ml di sangue di coniglio, defibrinato meccanicamente, in ciascuna provetta, che verrà poi agitata su vortex e collocata in posizione inclinata in apposito supporto in modo che il terreno solidifichi a becco di clarino.
- Eseguire controllo di sterilità mediante incubazione di una provetta in termostato a 37°C per 48 ore: eliminare tutto il lotto di terreno in caso di crescita batterica e/o fungina.
- Conservare in frigorifero per un periodo di tempo massimo di 60 giorni.

7.2 Trapianto di leishmanie

- Prelevare, da una coltura di *L. infantum*, con pipetta pasteur vetro sterile, in condizioni di sterilità, qualche goccia di sospensione di leishmanie e depositarne 2 gocce su di un vetrino; coprire con vetrino coprioggetto e osservare al microscopio ottico con obiettivo 40 x, al fine di controllare che la vitalità e il numero di leishmanie (almeno 10 per campo) siano idonei al trapianto.
- Dispensare, con pipetta sterile, in condizioni di sterilità, 2 ml di terreno in fase liquida completa in una provetta contenente la fase solida addizionata di sangue di coniglio.
- Prelevare sterilmente con pipetta pasteur sterile qualche goccia della sospensione di leishmanie, trasferirla nel terreno di cui al punto precedente che verrà poi posto in termostato a 23°C.
- Ripetere il trapianto ogni 7-10 giorni, a seconda della velocità di crescita delle leishmanie.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

NA.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere durante tutte le fasi relative alla manipolazione delle leishmanie.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Le pipette pasteur devono essere raccolte e smaltite come materiale contaminato trattato chimicamente, non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). I vetrini utilizzati per il controllo della crescita delle leishmanie vengono raccolti e trattati come materiale contaminato trattato chimicamente, riciclabile (SOP MIPAV 09.01.02). Le provette utilizzate per la coltura delle leishmanie vengono raccolte e trattate come materiale contaminato riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

PREPARAZIONE ANTIGENE *LEISHMANIA* PER IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Tecnico di laboratorio	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Emanuela Mollicone		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Antonietta Di Francesco	15/05/02	Raffaella Baldelli	30/05/02	Responsabile Laboratorio SIE	04/06/02

 <i>Università degli studi di Bologna</i> <i>Facoltà di Medicina Veterinaria</i> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Preparazione dell'antigene *Leishmania* da utilizzare nella reazione di immunofluorescenza indiretta.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Gradoni L., Gramiccia M. (2000) – Leishmaniosis. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties. 4th Ed., Paris-France. Cap.X.1, pp.803-812.

2.2 Piergili Fioretti D., Curti M., Vitellozzi G. (1981) – La prova di immunofluorescenza nella diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina. Parassitologia, 23, 223-225.

2.3 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.4 SOP MIPAV SIE 10.01.001 “Modalità di coltura delle leishmanie”.

2.5 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.6 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

2.7 SOP FT 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti di laboratorio di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di FT”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

Ag = antigene

PBS = Phosphate Buffered Saline

rpm = rotazioni per minuto

≤ = inferiore o uguale.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- acetone (min. 99%)
- H₂O deionizzata

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

- coltura di leishmanie (SOP MIPAV SIE 10.01.001)
- blu di metilene

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- autoclave
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- centrifuga
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- microscopio ottico con obiettivo $40\times$
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($37^{\circ}\text{C} \pm 1$).
- cilindro graduato di vetro capacità 500 ml
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di vetro coniche graduate capacità 15 ml sterili, con tappo
- pipette di vetro classe B 10 ml $\pm 0,1$ sterili o pipette 10 ml monouso sterili
- pipette pasteur di vetro sterili
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- vetrini portaoggetto
- vetrini coprioggetto
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro
- contenitori in vetro per vetrini
- contenitori per conservazione vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

- Preparazione PBS: pesare 3,825 g di NaCl + 0,362 g di Na_2HPO_4 + 0,105 g di KH_2PO_4 , portare al volume di 500 ml con H_2O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico, pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4 e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
- Prelevare con pipetta pasteur sterile il liquido di coltura delle leishmanie (SOP MIPAV SIE 10.01.001), dopo aver accertato al microscopio la buona crescita dei promastigoti; trasferirlo quindi in provetta conica graduata sterile, aggiungendo uguale volume di PBS sterile pH 7,2-7,4.
- Centrifugare a 2.000 rpm per 10 min.
- Togliere tutto il surnatante, sostituirlo con uguale volume di PBS sterile pH 7,2-7,4, agitare su vortex e centrifugare di nuovo a 2.000 rpm per 10 min. Ripetere l'operazione 3 volte.
- Togliere tutto il surnatante, risospendere il pellet aggiungendo uguale volume di PBS e agitando su vortex.
- Distribuire con pipetta pasteur sterile una goccia della sospensione su un vetrino portaoggetto, coprire con vetrino coprioggetto, valutare la concentrazione di leishmanie

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.002	Rev. 0

al microscopio con obiettivo 40 × e aggiungere, se necessario, PBS sterile pH 7,2-7,4 alla sospensione, fino ad osservare circa una decina di leishmanie per campo visivo.

- Prelevare con pipetta pasteur sterile una goccia della sospensione, dispensarla su un vetrino portaoggetto, lasciarla asciugare e colorarla con blu di metilene per 3 min. Controllare di nuovo la concentrazione di leishmanie al microscopio con obiettivo 40 ×. La concentrazione ottimale è quella alla quale si evidenziano circa 15 leishmanie per campo visivo.
- Distribuire 10 µl di tale sospensione in tutti gli anelli dei vetrini per immunofluorescenza.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Fissare i vetrini per 15 min all'interno di contenitori di vetro contenenti acetone precedentemente refrigerato.
- Lasciare asciugare i vetrini all'aria per circa 10 min e conservarli in appositi contenitori in congelatore a – 20 °C per un periodo massimo di tre mesi.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

NA.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere durante le fasi di manipolazione delle leishmanie.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

L'acetone viene smaltito con le modalità previste nella SOP FT 09.01.01.

Le pipette pasteur devono essere raccolte e smaltite come materiale contaminato trattato chimicamente, non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). I vetrini utilizzati per il controllo delle leishmanie vengono raccolti e trattati come materiale contaminato trattato chimicamente, riciclabile (SOP MIPAV 09.01.02). I puntali monouso vengono raccolti e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La vetreria contaminata da leishmanie viene raccolta e trattata come materiale contaminato riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02.

I contenitori utilizzati per il fissaggio dell'Ag ai vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

TITOLAZIONE DEL CONIUGATO PER LA PROVA DI IMMUNOFLUORESCENZA INDIRECTA (IFI)



- **Modificata lista di distribuzione**
- **Testo eliminato nel sottocapitolo 6.1**
- **Testo modificato nel capitolo 7**
- **Testo eliminato nel capitolo 10**

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
Responsabile Ass. Qualità	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Laureato frequentatore	Silvia Piva		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Raffaella Baldelli	03/10/03	Antonietta Di Francesco	06/10/03	Responsabile Laboratorio SIE	07/10/03

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Allegato 1: Schema vetrino per immunofluorescenza

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Determinazione della diluizione d'uso del coniugato fluorescente da utilizzare nelle reazioni di immunofluorescenza indiretta

2. RIFERIMENTI.

2.1 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.2 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.3 SOP MIPAV 09.01.02 “Gestione della cucina”

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

Coniugato = immunoglobuline anti-isotipo di specie coniugate con isotiocianato di fluoresceina

Titolo (del siero) = massima diluizione del siero alla quale si evidenzia reazione positiva

Ag = antigene

IFI = immunofluorescenza indiretta

PBS = Phosphate Buffered Saline.

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente, personale tecnico e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed esser stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- NaCl (min. 99%)
- Na₂HPO₄ (min. 99%)
- KH₂PO₄ (min. 99%)
- immunoglobuline anti-isotipo di specie, coniugate con isotiocianato di fluoresceina
- blu d'Evans 1%
- glicerina tamponata [testo eliminato]
- H₂O deionizzata
- Ag

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

- siero di controllo positivo: siero, appartenente alla specie verso cui è diretto il coniugato, contenente immunoglobuline anti-Ag a titolo noto in IFI e comunque con titolo superiore alla soglia di positività stabilita per quel determinato Ag in IFI
- siero di controllo negativo: siero, appartenente alla specie verso cui è diretto il coniugato, contenente immunoglobuline anti-Ag con titolo inferiore alla soglia di positività stabilita per quel determinato Ag in IFI.

6.2 Strumentario

- agitatore magnetico
- agitatore per provette tipo vortex
- bilancia analitica (prec. 1 mg)
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- microscopio a fluorescenza Leitz Diaplan dotato di sistema a luce incidente con obiettivo NPL Fluotar 40/0,70.
- pHmetro ($\pm 0,05\%$)
- termostato ($37^{\circ}\text{C} \pm 1$)
- cilindro graduato di vetro capacità 1 litro
- matraccio di vetro capacità 1 litro
- provette di plastica monouso da 3 ml, munite di tappo (da utilizzare per diluire sieri umani)
- provette di vetro $12 \times 100-120$ mm
- pipette di vetro classe B 2 ml
- propipettatore
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl e 40-200 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- vetrini per immunofluorescenza resistenti all'acetone con 10 anelli di 6 mm di diametro sui quali è fissato l'Ag
- vetrini coprioggetto
- camera umida
- contenitori in vetro per lavaggio vetrini

7. MODALITÀ OPERATIVE.

- Preparazione PBS: pesare 7,650 g di NaCl + 0,724 g di Na_2HPO_4 + 0,210 g di KH_2PO_4 , portare al volume di 1 litro con H_2O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico e pHare controllando che il range di pH sia di 7,2-7,4.
- Allestire i vetrini con l'Ag, con le specifiche descritte per ogni singola particolare applicazione.
- Preparare lo schema di distribuzione delle diluizioni del siero positivo di controllo negli anelli dei vetrini: utilizzare un vetrino per ogni diluizione del coniugato da saggiare (vedi allegato 1).
- Allestire in provetta diluizioni per raddoppio in PBS pH 7,2-7,4 del siero positivo di controllo, fino a raggiungere la diluizione superiore al titolo noto; allestire in provetta una diluizione del siero di controllo negativo, superiore al titolo soglia.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Rev. 1

- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare 25 µl di ciascuna diluizione del siero positivo di controllo nello specifico anello di ogni vetrino, partendo dalla diluizione più alta, e predisporre in ciascun vetrino un anello per il controllo negativo (25 µl siero negativo) e un anello per il controllo Ag (25 µl PBS).
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Allestire in provetta diluizioni per raddoppio, in PBS pH 7,2-7,4, del coniugato a partire da 1/10, e aggiungere a ciascuna di esse blu d'Evans 1:10.000
- Collocare i vetrini in camera umida.
- Dispensare in tutti gli anelli 25 µl di coniugato, destinando un vetrino a ciascuna diluizione.
- Incubare in termostato a 37°C per 30 min.
- Lavare i vetrini in PBS pH 7,2-7,4 in appositi contenitori: 3 lavaggi rapidi seguiti da 2 lavaggi di 10 min per immersione. Sciacquare i vetrini in H₂O deionizzata.
- Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente.
- Dispensare in ciascun anello una goccia di glicerina tamponata e coprire i vetrini con vetrino coprioggetto.
- Leggere i vetrini al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40/0,70: la positività della reazione è indicata da fluorescenza giallo-verdastra dell'Ag, su fondo scuro.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

La diluizione d'uso (titolo) del coniugato è rappresentata dalla massima diluizione del coniugato in grado di dare reazione positiva fino alla diluizione pari al titolo del siero di controllo positivo. Tale diluizione d'uso viene riportata sul contenitore nel quale viene stoccato a -20°C il coniugato titolato e suddiviso in aliquote.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere qualora si manipolino sieri umani .

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

I puntali, i vetrini e le provette di plastica vengono raccolti, trattati e smaltiti come materiale contaminato non riciclabile (SOP MIPAV 09.01.01). Le provette di vetro, utilizzate per le diluizioni dei sieri e del coniugato, [testo eliminato] vengono avviate agli opportuni trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. La restante vetreria utilizzata viene raccolta come materiale non contaminato riciclabile ed avviata ai trattamenti previsti dalla SOP MIPAV 09.01.02. I contenitori utilizzati per i lavaggi dei vetrini vengono sottoposti a ripetuti lavaggi con acqua corrente, seguiti da un ultimo risciacquo in H₂O deionizzata.



Università degli studi di Bologna
Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità Pubblica
Veterinaria e Patologia Animale

Istruzione Operativa

Pag. 6 di 5

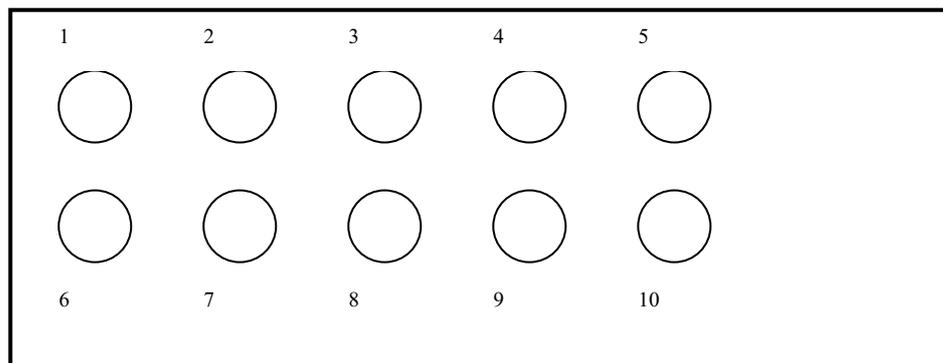
SOP MIPAV SIE 10.01.003

Rev. 1

<i>Università degli studi di Bologna</i> <i>Facoltà di Medicina Veterinaria</i> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Allegato 1
	SOP MIPAV SIE 10.01.003	Pag. 1 di 1 Rev. 0

ALLEGATO 1

Schema vetrino per immunofluorescenza



 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI TIPO NESTED (n-PCR) PER IL GENE SSU rRNA DEL GENERE *LEISHMANIA*

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
RAQD	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Silvia Piva		
Laureato frequentatore	Daniela Salvatore		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Silvia Piva	29/05/06	Antonietta Di Francesco	05/06/06	Responsabile Laboratorio SIE	07/06/06

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Amplificazione di una regione conservata della sequenza codificante l'rRNA 18S del genere *Leishmania* a partire da estratto di DNA, a scopo di ricerca.

2. RIFERIMENTI.

2.1 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.2 SOP MIPAV BIO 09.01.01 “Gestione del Laboratorio di Biotecnologie”.

2.3. SOP MIPAV SIE 10.01.024 “Estrazione del DNA da puntato midollare di cane”.

2.4 SOP MIPAV SIE 10.01.025 “Estrazione del Dna da puntato linfonodale di cane”.

2.5 SOP MIPAV SIE 10.01.026 “Estrazione del Dna da buffy coat”.

2.6 SOP MIPAV BIO 10.01.04 “Preparazione gel di agarosio”.

2.7 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.8 SOP FT 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia”.

2.9 manuale fornito dalla ditta produttrice della *Taq Polymerase*, Qiagen

2.10 Van Eys G.T., Schoone G.J., Kroon N.C., Ebeling S.B. “Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites”. Mol. Biochem. Parasitol. 51 (1), 133-42.

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

PCR = polymerase chain reaction = reazione polimerasica a catena

dNTPS = desossinucleotidi trifosfato

bp = base pair = paia di basi

mM = millimolare

pm = picomoli

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente e ricercatore e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed essere stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia; dovrà inoltre aver superato la verifica dell'addestramento per l'accesso al Laboratorio di Prova di Biotecnologie, previsto nella SOP MIPAV BIO 09.01.01, ed essere stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Prova di Biotecnologie.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

Attenersi a quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01.

La preparazione della mix di amplificazione va effettuata nell'area a ciò destinata nel Laboratorio di Prova di Sierologia, locale 24 del II piano.

Conservare i reagenti a – 20 °C.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- Qiagen PCR Buffer 10x (contenente $MgCl_2$ 15 mM)
- Q Solution 5x
- *Taq Polymerase* Qiagen
- dNTPs
- Acqua pura
- primers: R221 5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3' '
 - R332 5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'
- R223 5'-TCCCATCGCAACCTCGGTT-3'
- R333 5'-AAAGCGGGCGCGGTGCTG-3'
- gel di agarosio all'1%
- loading buffer 6x a base di blu di bromofenolo
- marker o campione a peso molecolare noto

6.2 Strumentario

- congelatore ($-20^{\circ} C \pm 3$)
- frigorifero ($5^{\circ} C \pm 3$)
- cappa a flusso laminare
- blocco refrigerante
- termociclatore
- cella elettroforetica
- alimentatore
- transilluminatore
- analizzatore di immagine
- provette tipo eppendorf da 1,5 ml
- provette tipo eppendorf da 0,2 ml
- micropipette 0,2-2 μ l
- micropipette a volume variabile da 0,5-10 μ l
- micropipette a volume variabile da 5-40 μ l
- micropipette a volume variabile da 40-200 μ l
- micropipette a volume variabile da 200-1000 μ l
- puntali monouso, DNasi e RNasi-free, con filtro, da 0,1-10 μ l
- puntali monouso, DNasi e RNasi-free, con filtro, da 5-40 μ l
- puntali monouso, DNasi e RNasi-free, con filtro, da 40-200 μ l
- puntali monouso, DNasi e RNasi-free, con filtro, da 200-1000 μ l

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Operazioni preliminari

- portare a T ambiente i seguenti reagenti: Buffer Qiagen, Q Solution Qiagen, dNTPs e la prima coppia di primers (R221 e R332), che andranno a costituire la MASTER MIX;
- impostare i seguenti programmi nel termociclatore (localizzato nel locale 24A del Laboratorio di Prova di Biotecnologie):

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

7.1a prima PCR: 94°C per 5 min, 35 cicli di 94°C per 30 sec, 60°C per 30 sec, 72°C per 30 sec e completamento della fase di estensione a 72°C per 10 min;

7.1b seconda PCR: 94°C per 5 min, 35 cicli di 94°C per 30 sec, 65°C per 30 sec, 72°C per 30 sec e completamento della fase di estensione a 72°C per 10 min.

7.2 Prova principale

Da eseguire sul bancone del Laboratorio di Prova di Sierologia allestito allo scopo.

Prima PCR:

- Preparare e contrassegnare tante provette da 0,2 ml quanti sono i campioni in esame + una o più provette per il bianco (inserire un bianco ogni 2 campioni), una per il controllo negativo e una per il controllo positivo. Le provette vanno lasciate aperte;
- preparare la MASTER MIX in una provetta da 1,5 ml in quantità pari al n. di campioni in esame + 1 bianco ogni due campioni + 1 controllo negativo + 1 controllo positivo + 1 ulteriore campione.

Attenersi alle seguenti quantità calcolate per 1 campione:

MASTER MIX prima PCR

Qiagen PCR Buffer 10x	5	µl
Q Solution 5x	10	µl
dNTPs mix (10 mM ciascuno)	1	µl
Primer R221 (50 pm)	1	µl
Primer R332 (50 pm)	1	µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25	µl
Acqua pura	21,75	µl
<u>Volume totale</u>	<u>40,00</u>	<u>µl</u>

- dispensare 40 µl della MASTER MIX in ciascuna provetta da 0,2 ml

Le micropipette e i puntali usati per l'allestimento della MASTER MIX devono essere utilizzati esclusivamente per questo scopo e quindi non devono essere spostati dal bancone del Laboratorio di Prova di Sierologia

- trasferire le provette sotto cappa senza attivarne il flusso
- aggiungere 10 µl di ciascun estratto di DNA nelle singole provette, dispensando 10 µl di acqua pura nelle provette destinate ai bianchi e trasferire le provette all'interno del blocco refrigerante. Il controllo positivo deve essere sempre manipolato per ultimo.

Il DNA non deve essere mai manipolato nel bancone destinato all'allestimento della MASTER MIX. L'aggiunta del DNA va eseguita con micropipetta e puntali da impiegare esclusivamente a questo scopo

- cambiare i guanti

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 6 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

- chiudere le provette e trasferirle rapidamente nel termociclatore presso il Laboratorio di Prova di Biotecnologie (locale 24A)
- avviare il programma indicato al punto 7.1a
- decontaminare con raggi UV la cappa per almeno 30 min.
- conservare gli amplificati in frigorifero oppure procedere subito alla visualizzazione del risultato tramite corsa elettroforetica; a tale scopo utilizzare un gel all'1% di agarosio, preparato secondo le indicazioni della SOP MIPAV BIO 10.01.04
- pipettare 10 µl di amplificato in 5 µl di loading buffer 6x a base di blu di bromofenolo
- caricare nei pozzetti del gel i campioni e 5µl di marker
- eseguire la corsa elettroforetica a 100V per 50 min e visualizzare il risultato al transilluminatore o all'analizzatore di immagine.

Seconda PCR:

- Contrassegnare tante provette da 0,2 ml quanti sono gli amplificati della prima PCR (compresi i controlli) più due nuovi campioni di bianco da inserire come primo e ultimo campione. Le provette vanno lasciate aperte
- Preparare la MASTER MIX in una provetta da 5 ml in quantità pari al numero totale di campioni più uno.

Attenersi alle seguenti quantità calcolate per 1 campione:

MASTER MIX seconda PCR

Qiagen PCR Buffer 10x	5	µl
Q Solution 5x	10	µl
dNTPs mix (10 mM ciascuno)	1	µl
Primer R223 (50 pm)	1	µl
Primer R333 (50 pm)	1	µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25	µl
Acqua pura	28,75	µl
<u>Volume totale</u>	<u>47,00</u>	<u>µl</u>

- dispensare 47 µl della MASTER MIX in ciascuna provetta da 0,2 ml
- trasferire le provette sotto cappa senza attivarne il flusso
- aggiungere 3 µl di ciascun amplificato dalla prima PCR nelle singole provette; dispensare 3 µl di acqua pura nelle due provette destinate ai nuovi campioni di bianco e trasferire le provette all'interno del blocco refrigerante
- collocare le provette nel termociclatore attivando il programma indicato al punto 7.1b
- la decontaminazione ambientale e la lettura dei risultati mediante elettroforesi verrà eseguita come precedentemente descritto.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

In caso di esito positivo, gli amplificati ottenuti dalla seconda PCR produrranno, dopo elettroforesi, la banda attesa di 358 bp.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 7 di 7
	SOP MIPAV SIE 10.01.027	Rev. 0

I prodotti di amplificazione della prima PCR, corrispondenti ad un amplificato di 603 bp, il più delle volte non sono evidenziabili. Nel caso fosse evidenziabile il prodotto di amplificazione della prima PCR e non quello della seconda, si può ipotizzare un eccesso di DNA nel campione di partenza, che va ad inibire la *Taq* Polimerasi; occorre quindi risottoporre tale campione alla reazione, previa sua diluizione in acqua pura.

I risultati della reazione di amplificazione vengono riportati su apposito quaderno di laboratorio.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Attenersi a quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01.

Uso di guanti a perdere in tutte le fasi operative.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Per lo smaltimento dei rifiuti biologici e la gestione del materiale contaminato si fa riferimento alla SOP MIPAV 09.01.01. I rifiuti tossici solidi e liquidi vengono raccolti secondo quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 e smaltiti secondo le procedure indicate nella SOP FT 09.01.01.

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.026	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

ESTRAZIONE DEL DNA DA BUFFY COAT

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
RAQD	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Silvia Piva		
Laureato frequentatore	Daniela Salvatore		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Silvia Piva	12/05/06	Antonietta Di Francesco	17/05/06	Responsabile Laboratorio SIE	25/05/06

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.026	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.026	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Estrazione del DNA dalla frazione leucocitaria sanguigna (buffy coat) di cane, da sottoporre alla reazione a catena della polimerasi per ricerca di leishmania, a scopo di ricerca.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Dneasy Tissue Kit Qiagen

2.2 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.3 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.4 SOP FT 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia”.

2.5 SOP MIPAV BIO 09.01.01 “Gestione del Laboratorio di Biotecnologie”.

2.6 Ficoll – Paque Plus, Amersham Biosciences.

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

rpm = rotazioni per minuto

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente e ricercatore e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed essere stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia; per l'accesso al Laboratorio di Prova di Biotecnologie dovrà inoltre aver partecipato al corso di addestramento specifico previsto nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 ed essere stato autorizzato dal Responsabile del suddetto laboratorio.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- Dneasy Tissue Kit Qiagen: Buffer ATL, proteinasi K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE
- etanolo (96-100%)
- Ficoll – Paque Plus
- anhydrous D – glucose 0,1%
- $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ $9,8 \times 10^{-4} \text{ M}$
- KCl $5,4 \times 10^{-3} \text{ M}$
- TRIS 0,145 M
- NaCl 0,14 M

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.026	Rev. 0

- HCl 10 N
- H₂O deionizzata

6.2 Strumentario

- agitatore per provette tipo Vortex
- cappa a flusso laminare
- centrifuga
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- frigorifero ($5^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- minicentrifuga con rotore per provette da 1,5 o 2 ml
- termoblocco ($55-70^{\circ}\text{C}$)
- provette tipo eppendorf da 1,5 ml
- provette monouso da 10 ml
- micropipette a volume variabile da 5-40 μl
- micropipette a volume variabile da 40-200 μl
- micropipette a volume variabile da 200-1000 μl
- puntali monouso da 5-200 μl
- puntali monouso da 200-1000 μl
- pipette monouso da 1, 2, 5, 10 ml
- siringa sterile da 10 ml con ago da 21 G
- colonnine fornite dal Dneasy Tissue Kit
- tubi di raccolta forniti dal Dneasy Tissue Kit

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Operazioni preliminari

- aggiungere 25 ml di etanolo al buffer AW1 concentrato
- aggiungere 30 ml di etanolo al buffer AW2 concentrato
- Preparazione della soluzione A: dissolvere in 950 ml di acqua deionizzata 1 gr di anhydrous D – glucose + 0,0074 gr di $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,1992 gr di $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ + 0,4026 gr di KCl + 17,565 gr di TRIS. Aggiungere HCl 10 N fino a quando il pH diventa 7,6 e portare al volume di 1 litro.
- Preparazione della soluzione B: dissolvere 8,19 gr di NaCl in 1 litro di acqua deionizzata.

Conservare le due soluzioni in frigorifero per un periodo massimo di 7 giorni.

- Isolamento del buffy coat: porre 1 ml di soluzione A + 9 ml di soluzione B in una provetta da 10 ml. Prelevare 2 ml della soluzione così ottenuta e miscelarla con 2 ml di sangue. Prelevare, sotto cappa, con una siringa sterile, 3 ml di ficoll e trasferirlo in una provetta da 10 ml. Distribuire sopra il ficoll 4 ml della miscela soluzione salina (A+B) + sangue precedentemente preparata, facendo attenzione a non mescolare le due fasi; centrifugare per 40 min a 1200 rpm alla temperatura di $18-20^{\circ}\text{C}$. Rimuovere il plasma in superficie senza intaccare il disco linfocitario; trasferire quindi con molta cura i linfociti in una provetta tipo eppendorf cercando di ridurre al minimo l'aspirazione di ficoll sottostante. Risospendere i linfociti in 1 ml di soluzione salina (A+B) e centrifugare a 14000 rpm per 30 min in modo da ottenere un pellet. Eliminare con

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.026	Rev. 0

micropipetta la soluzione salina (A+B) facendo attenzione a non rimuovere l'eventuale pellet.

7.2 Prova principale

- risospendere il pellet in 180 µl di Buffer ATL
- aggiungere 20 µl di proteinasi K
- agitare su vortex
- incubare in termoblocco a 55 °C per 1 ora, agitando su vortex ogni 15 minuti fino a completa dissoluzione del pellet
- aggiungere 200 µl di buffer AL
- agitare su vortex
- incubare in termoblocco a 70 °C per 10 minuti
- aggiungere 200 µl di etanolo
- agitare su vortex
- trasferire il campione in una colonnina
- centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 3 minuti a 14000 rpm
- collocare la colonnina in una provetta tipo eppendorf e aggiungere 200 µl di Buffer AE direttamente sulla membrana della colonnina
- incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- trasferire l'eluato in una provetta tipo eppendorf e stoccare a – 20 °C.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

L'avvenuta estrazione viene riportata su apposito quaderno di laboratorio.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere in tutte le fasi operative.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Per lo smaltimento dei rifiuti biologici e la gestione del materiale contaminato si fa riferimento alla SOP MIPAV 09.01.01. I rifiuti tossici solidi e liquidi vengono raccolti secondo quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 e smaltiti secondo le procedure indicate nella SOP FT 09.01.01

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.24	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

ESTRAZIONE DEL DNA DA PUNTATO MIDOLLARE DI CANE

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
RAQD	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Silvia Piva		
Laureato frequentatore	Daniela Salvatore		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Silvia Piva	10/05/06	Antonietta Di Francesco	15/05/06	Responsabile Laboratorio SIE	25/05/06

 <i>Università degli studi di Bologna</i> <i>Facoltà di Medicina Veterinaria</i> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.24	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.24	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Estrazione del DNA da puntato midollare di cane da sottoporre alla reazione a catena della polimerasi per ricerca di leishmania, a scopo di ricerca.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Dneasy Tissue Kit Qiagen

2.2 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.3 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.4 SOP FT 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia”.

2.5 SOP MIPAV BIO 09.01.01 “Gestione del Laboratorio di Biotecnologie”.

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

rpm = rotazioni per minuto

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente e ricercatore e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed essere stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia; per l'accesso al Laboratorio di Prova di Biotecnologie dovrà inoltre aver partecipato al corso di addestramento specifico previsto nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 ed essere stato autorizzato dal Responsabile del suddetto laboratorio.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- Dneasy Tissue Kit Qiagen: Buffer ATL, proteinasi K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE
- etanolo (96-100%)
- PBS = Phosphate Buffered Saline

6.2 Strumentario

- agitatore per provette tipo Vortex
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- frigorifero ($5^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- minicentrifuga con rotore per provette da 1,5 o 2 ml
- termoblocco (70°C)

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.24	Rev. 0

- provette tipo eppendorf da 1,5 ml
- micropipette a volume variabile da 5-40 µl
- micropipette a volume variabile da 40-200 µl
- micropipette a volume variabile da 200-1000 µl
- puntali monouso da 5-200 µl
- puntali monouso da 200-1000 µl
- colonnine fornite dal Dneasy Tissue Kit
- tubi di raccolta forniti dal Dneasy Tissue Kit

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Operazioni preliminari

- aggiungere 25 ml di etanolo al buffer AW1 concentrato
- aggiungere 30 ml di etanolo al buffer AW2 concentrato
- preparare il PBS: pesare 3,825 g di NaCl + 0,362 g di Na₂HPO₄ + 0,105 g di KH₂PO₄, portare al volume di 500 ml con H₂O deionizzata, sciogliere su agitatore magnetico, pHare controllando che il range di pH sia di 7,2 – 7,4 e sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 min
- trasferire l'aspirato midollare, prelevato con l'aggiunta di 0,5 ml di EDTA, in una provetta tipo eppendorf e conservare in frigorifero per un tempo non superiore a tre giorni

7.2 Prova principale

- trasferire 20 µl di proteinasi K in una provetta tipo eppendorf
- aggiungere 100 µl di aspirato midollare
- portare al volume di 220 µl con PBS
- aggiungere 200 µl di buffer AL
- agitare su vortex
- incubare in termoblocco a 70 °C per 10 minuti
- aggiungere 200 µl di etanolo
- agitare su vortex
- trasferire il campione in una colonnina
- centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 3 minuti a 14000 rpm
- collocare la colonnina in una provetta tipo eppendorf e aggiungere 200 µl di Buffer AE direttamente sulla membrana della colonnina
- incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- trasferire l'eluato in una provetta tipo eppendorf e stoccare a – 20 °C.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

L'avvenuta estrazione viene riportata su apposito quaderno di laboratorio.

 <i>Università degli studi di Bologna</i> <i>Facoltà di Medicina Veterinaria</i> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.24	Rev. 0

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere in tutte le fasi operative.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Per lo smaltimento dei rifiuti biologici e la gestione del materiale contaminato si fa riferimento alla SOP MIPAV 09.01.01. I rifiuti tossici solidi e liquidi vengono raccolti secondo quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 e smaltiti secondo le procedure indicate nella SOP FT 09.01.01

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 1 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.025	Rev. 0

L'utilizzatore si impegna, una volta ricevuta l'informazione di una nuova revisione del documento, a distruggere la eventuale copia della revisione precedente in suo possesso.

ESTRAZIONE DEL DNA DA PUNTATO LINFONODALE DI CANE

Lista di distribuzione

Funzione	Nome e Cognome	Firma	Data
Responsabile Servizio MIPAV	Luigi Morganti		
Vice-responsabile Servizio MIPAV	Fabio Ostanello		
RAQD	Emanuele Scalisi		
Responsabile Lab. Sierologia	Raffaella Baldelli		
Ricercatore	Antonietta Di Francesco		
Dottorando di ricerca	Silvia Piva		
Laureato frequentatore	Daniela Salvatore		

Preparato	Data	Verificato	Data	Approvato	Data
Silvia Piva	11/05/06	Antonietta Di Francesco	16/05/06	Responsabile Laboratorio SIE	25/05/06

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 2 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.025	Rev. 0

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI
3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI
4. QUALIFICA DEL PERSONALE
5. PARAMETRI AMBIENTALI
6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE
7. MODALITA' OPERATIVE
8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA)
9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA
10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 3 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.025	Rev. 0

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE.

Estrazione del DNA da puntato linfonodale di cane da sottoporre alla reazione a catena della polimerasi per ricerca di leishmania, a scopo di ricerca.

2. RIFERIMENTI.

2.1 Dneasy Tissue Kit Qiagen

2.2 SOP MIPAV 18.01.01 “Addestramento e qualifica del personale non strutturato per le attività dei laboratori di prova”.

2.3 SOP MIPAV 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti biologici e gestione del materiale contaminato”.

2.4 SOP FT 09.01.01 “Smaltimento dei rifiuti di tipo chimico classificati come pericolosi prodotti nel Servizio di Prova di Farmacologia e Tossicologia”.

2.5 SOP MIPAV BIO 09.01.01 “Gestione del Laboratorio di Biotecnologie”.

3. DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI.

rpm = rotazioni per minuto

4. QUALIFICA DEL PERSONALE.

Personale docente e ricercatore e personale non strutturato afferenti al Laboratorio di Sierologia. Il personale non strutturato dovrà aver superato la prova di addestramento, come previsto dalla SOP MIPAV 18.01.01, ed essere stato autorizzato dal Responsabile del Laboratorio di Sierologia; per l'accesso al Laboratorio di Prova di Biotecnologie dovrà inoltre aver partecipato al corso di addestramento specifico previsto nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 ed essere stato autorizzato dal Responsabile del suddetto laboratorio.

5. PARAMETRI AMBIENTALI.

NA.

6. MATERIALI ED APPARECCHIATURE DA UTILIZZARE.

6.1 Reagenti

- Dneasy Tissue Kit Qiagen: Buffer ATL, proteinasi K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE
- etanolo (96-100%)
- buffer TE 10 mM Tris-Cl pH 7,5 – 1 mM EDTA

6.2 Strumentario

- agitatore per provette tipo Vortex
- congelatore ($-20^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- frigorifero ($5^{\circ}\text{C} \pm 3$)
- minicentrifuga con rotore per provette da 1,5 o 2 ml
- termoblocco ($55-70^{\circ}\text{C}$)

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 4 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.025	Rev. 0

- provette tipo eppendorf da 1,5 ml
- micropipette a volume variabile da 5-40 µl
- micropipette a volume variabile da 40-200 µl
- micropipette a volume variabile da 200-1000 µl
- puntali monouso da 5-200 µl
- puntali monouso da 200-1000 µl
- colonnine fornite da Qiagen (Dneasy Tissue Kit)
- tubi di raccolta forniti da Qiagen (Dneasy Tissue Kit)

7. MODALITÀ OPERATIVE.

7.1 Operazioni preliminari

- aggiungere 25 ml di etanolo al buffer AW1 concentrato
- aggiungere 30 ml di etanolo al buffer AW2 concentrato
- trasferire l'aspirato linfonodale in una provetta tipo eppendorf contenente 500 µl di TE buffer e conservare in frigorifero per un tempo non superiore a 24 ore
- centrifugare per 30 min a 14000 rpm
- eliminare con micropipetta il TE buffer facendo attenzione a non rimuovere l'eventuale pellet

7.2 Prova principale

- risospendere il pellet in 180 µl di Buffer ATL
- aggiungere 20 µl di proteinasi K
- agitare su vortex
- incubare in termoblocco a 55 °C per 1 ora, agitando su vortex ogni 15 minuti fino a completa dissoluzione del pellet
- aggiungere 200 µl di buffer AL
- agitare su vortex
- incubare in termoblocco a 70 °C per 10 minuti
- aggiungere 200 µl di etanolo
- agitare su vortex
- trasferire il campione in una colonnina
- centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW1 e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- rimuovere il tubo inferiore di raccolta della colonnina, sostituirlo con altro tubo, aggiungere 500 µl di Buffer AW2 e centrifugare per 3 minuti a 14000 rpm
- collocare la colonnina in una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 200 µl di Buffer AE direttamente sulla membrana della colonnina
- incubare per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto a 8000 rpm
- trasferire l'eluito in una provetta tipo eppendorf e stoccare a – 20 °C.

8. INDICAZIONI PER LA PRESENTAZIONE DEI RISULTATI (DI PROVA).

 Università degli studi di Bologna Facoltà di Medicina Veterinaria Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale	Istruzione Operativa	Pag. 5 di 5
	SOP MIPAV SIE 10.01.025	Rev. 0

L'avvenuta estrazione viene riportata su apposito quaderno di laboratorio.

9. PRESCRIZIONI DI SICUREZZA.

Uso di guanti a perdere in tutte le fasi operative.

10. PRESCRIZIONI AMBIENTALI.

Per lo smaltimento dei rifiuti biologici e la gestione del materiale contaminato si fa riferimento alla SOP MIPAV 09.01.01. I rifiuti tossici solidi e liquidi vengono raccolti secondo quanto indicato nella SOP MIPAV BIO 09.01.01 e smaltiti secondo le procedure indicate nella SOP FT 09.01.01.