

Progetto formativo aziendale

PCR TRADIZIONALE E REAL-TIME PER IL RILEVAMENTO DEL DNA DI *LEISHMANIA* spp.

Roma 13-15-27 Ottobre 2015

Leishmania infantum: **ricerca nelle diverse matrici biologiche**

Roma, 13 ottobre 2015

Dr.ssa Laura Salvato

DO SIEROLOGIA IZSLT - SEDE DI ROMA

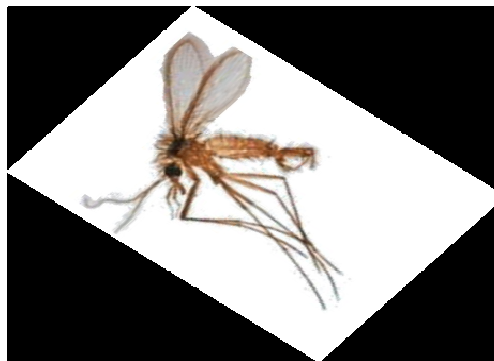
LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT



La leishmaniosi



In Italia e nei paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, la leishmaniosi è una zoonosi sostenuta da *Leishmania infantum*, protozoo parassita trasmesso all'uomo e ad animali domestici e selvatici dalla puntura di insetti vettori infetti (flebotomi).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Leishmania spp. presenti nel Nuovo e Vecchio Mondo e causa di leishmaniosi zoonosiche e antroponotiche

L. aethiopica, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. archibaldi*, *L. aristedesi*,
L. (Viannia) braziliensis, *L. chagasi*, *L. (Viannia) colombiense*, *L. deanei*,
L. donovani, *L. enriettii*, *L. equatorensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*,
L. gerbili, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. herreri*, *L. hertigi*, ***L. infantum***,
L. killicki, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. (Viannia) naiffi*,
L. (Viannia) panamensis, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) pifanoi*,
L. (Viannia) shawi, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, *L. venezuelensis*.



Principali specie di flebotomi coinvolti nella trasmissione di *L. infantum*

Phlebotomus perniciosus

Phlebotomus perfiliewi

Phlebotomus neglectus

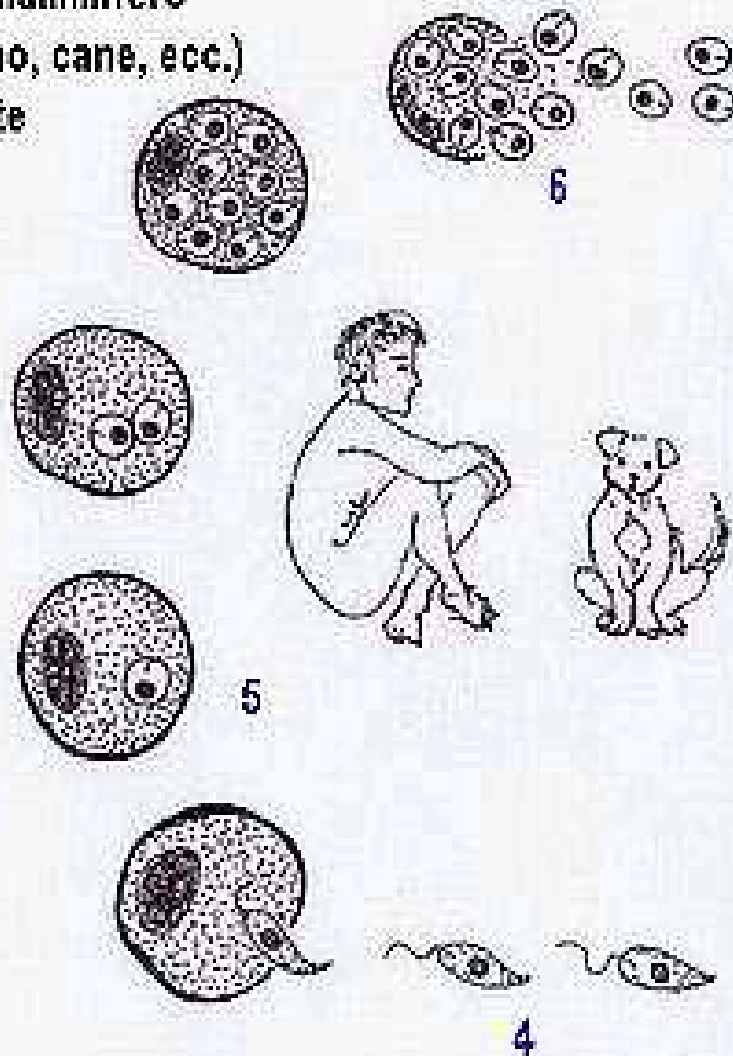
Phlebotomus ariasi

Phlebotomus papatasi

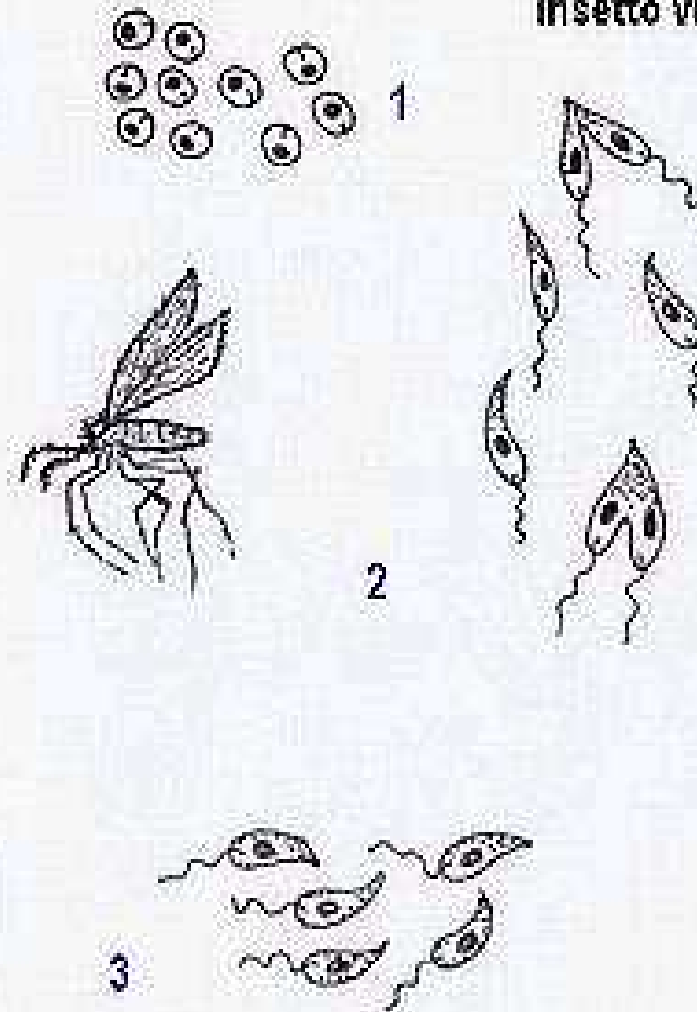


Ciclo biologico di *Leishmania infantum*

Nel mammifero
(uomo, cane, ecc.)
ospite



Nel flebotomo femmina,
insetto vettore



In Italia *Leishmania infantum* e' l'agente responsabile di

Leishmaniosi canina
(LCan)

Leishmaniosi
viscerale e cutanea
nell'uomo (LV e LC)

Il cane rappresenta il principale serbatoio della malattia



Leishmania presenta morfotipi diversi nelle fasi del ciclo biologico

Amastigote:

forma rotondeggiante

privo di flagello

localizzazione endocellulare in mammiferi

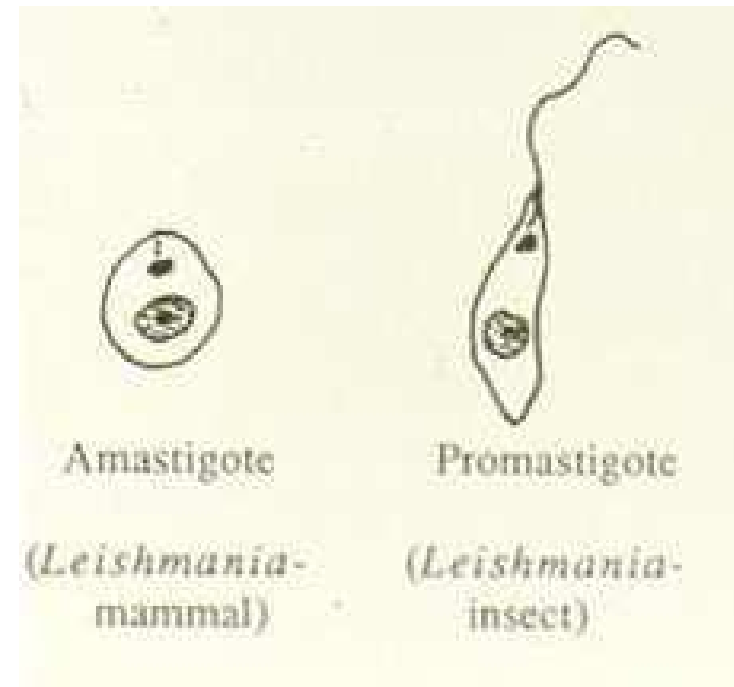
recettivi (es. cane e uomo)

Promastigote:

forma allungata

presenza di un lungo flagello

localizzazione nell'insetto vettore

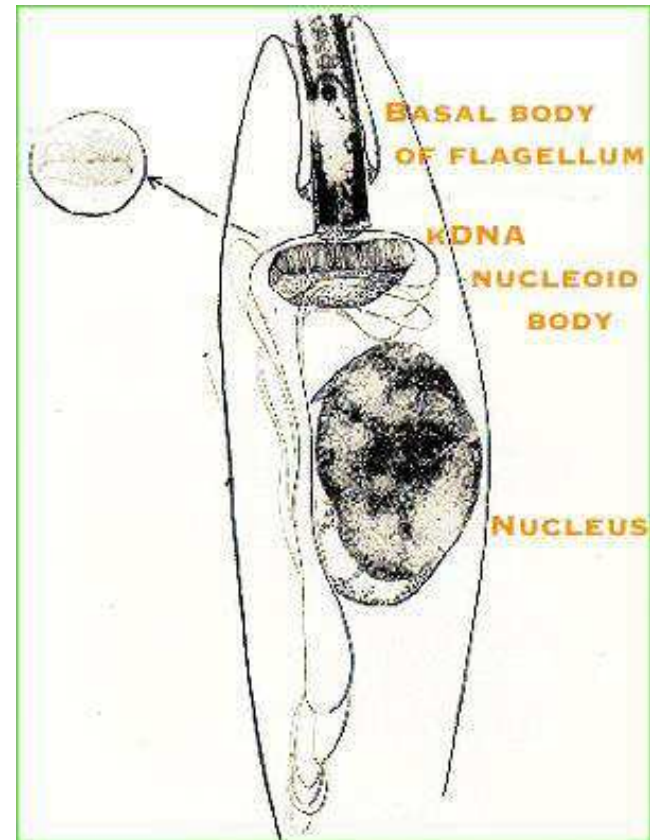


Struttura

Leishmania e altri trypanosomatidi hanno un unico mitocondrio che contiene una grande massa di DNA mitocondriale conosciuto come DNA del cinetoplasto (kDNA).

Il kDNA è costituito da una gigantesca rete di minicircoli e maxicircoli concatenate. Ci sono circa 10.000 minicircoli e 50 maxicircoli per rete.

Il kDNA mostra caratteristiche che lo rendono quasi ideale per la costruzione di sonde molecolari, dal momento che sono presenti in un alto numero di copie e contengono sequenze conservate.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Diagnosi

Gli esami di laboratorio sono di fondamentale importanza per la diagnosi, terapia, prognosi e monitoraggio della leishmaniosi.



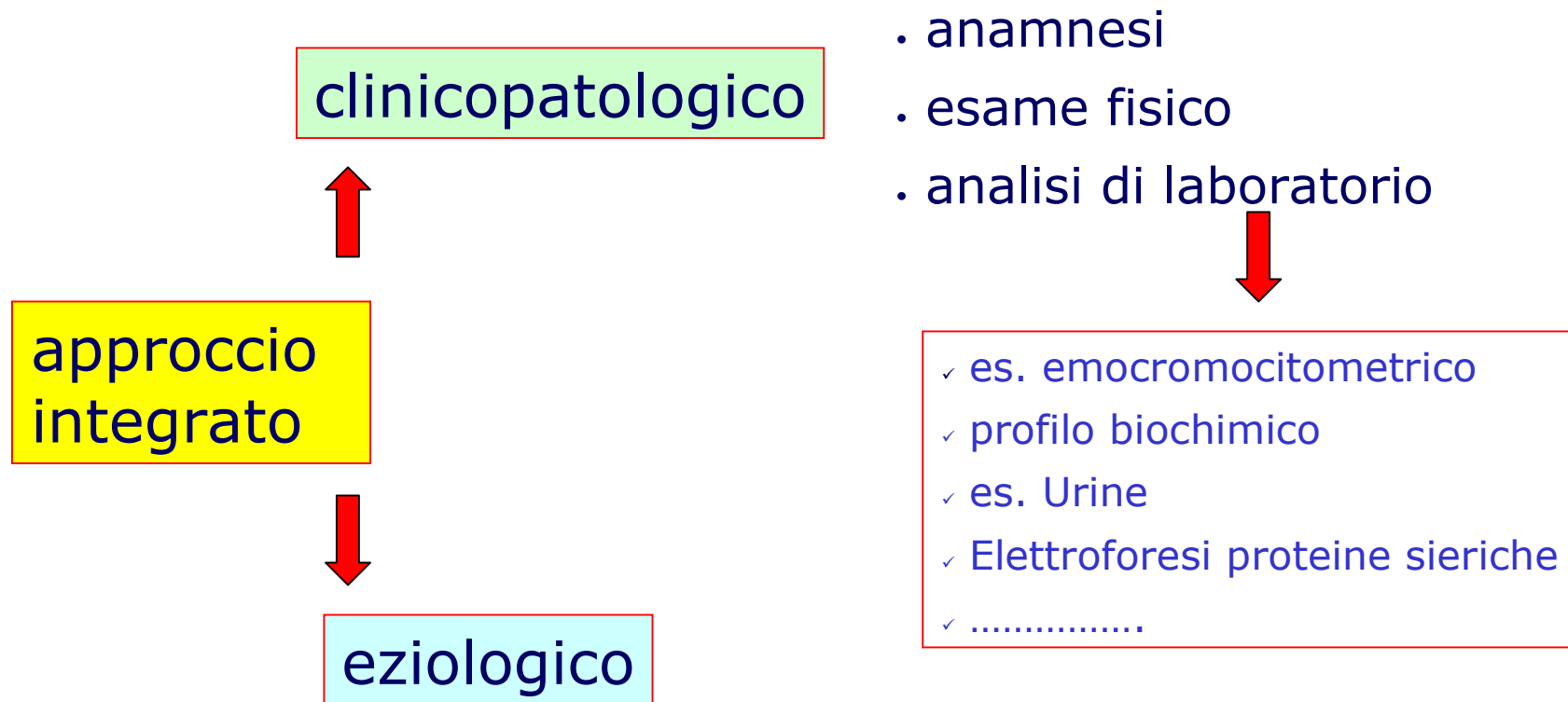
LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Approccio clinicodiagnostico nei cani con sospetto di leishmaniosi clinica



Analisi di laboratorio (non specifiche)

Sono test indicativi dello stato di salute generale dell'organismo, ma non determinanti per la diagnosi.

Emocromo

Profilo biochimico

Protidogramma

Profilo coagulativo

Analisi delle urine





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Diagnosi eziologica di leishmaniosi

DIRETTA

- **metodi cito-istologici**
- **metodi parassitologici**
- **metodi molecolari**

INDIRETTA

- **metodi sierologici**

Messa in evidenza del **parassita** e/o parti di esso
o di una **risposta specifica** da parte dell'ospite



Diagnostica indiretta: metodi sierologici

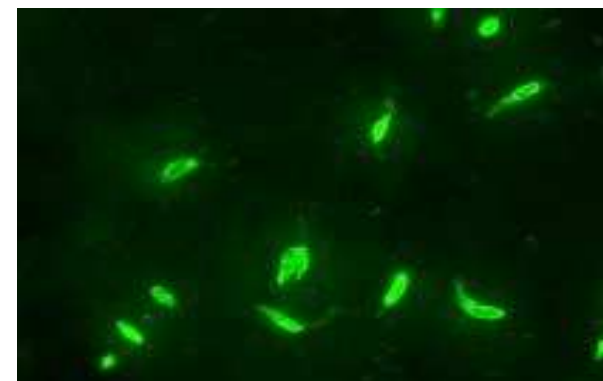
Immunofluorescenza indiretta (IFAT)

La sierologia consente di determinare anticorpi specifici nei confronti del parassita, in particolare nei confronti della **glicoproteina gp63**

Nella D.O. Sierologia dell'IZS LT il cut-off adottato è 1:80

(I cut-off possono variare da 1:40 a 1:160)

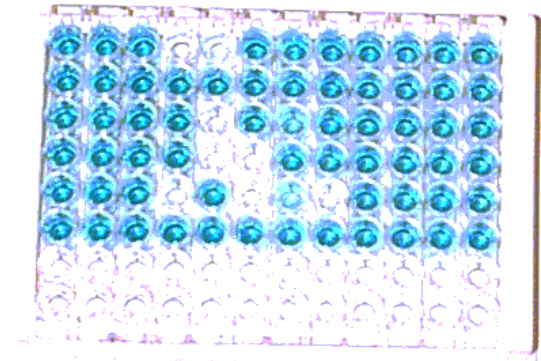
L' IFAT e' considerato dall'OIE e dall'OMS il metodo sierologico di riferimento





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Diagnostica indiretta: metodi sierologici



Test Elisa

Esistono numerosi test in commercio, con antigeni totali o purificati, che presentano sensibilità e soprattutto specificità diverse legate per lo più al tipo di antigene utilizzato.

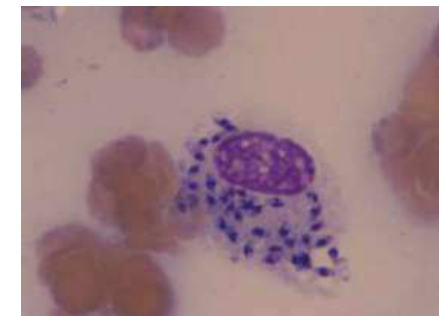
Estratti del parassita intero: > **sensibilità**' per rilevare infezioni subcliniche e cliniche
< **specificità**

Peptidi ricombinanti: > **specificità**
< **sensibilità** nel rilevare cani infetti clinicamente sani



Diagnostica diretta: metodo colorimetrico

Colorazione May-Grünwald Giemsa



Da sangue, agoaspirato linfo-nodale e midollare, raschiato da lesione cutanea, milza

May- Grünwald per 3'
risciacquo
Giemsa (1/10) per 20'
risciacquo

economica, pratica, veloce, specificità molto elevata in particolare all'inizio della evoluzione della patologia quando la carica parassitaria è notevole

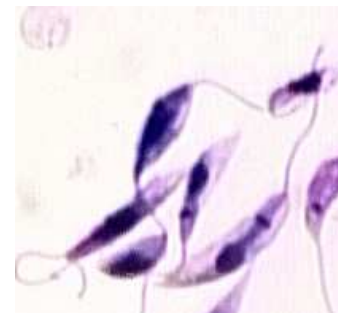


Si osservano amastigoti all'interno di macrofagi intralesionali o in sede extracellulare

LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT



Diagnostica diretta: isolamento



stessi campioni indicati per l'esame microscopico

tempi di esecuzione lunghi

laboratori specializzati

↑ specificità

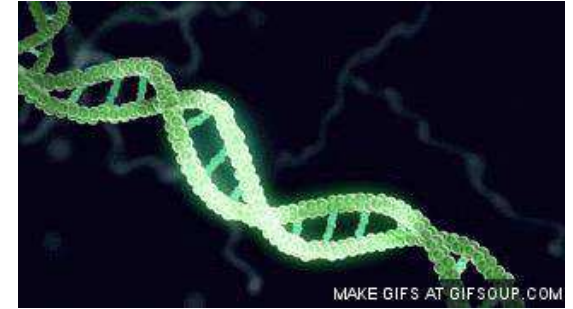
meno sensibile di PCR e sierologia

Terreno utilizzato (DO SIE) **EMTM** (Evans Modified Tobie Medium): costituito da sangue defibrinato di coniglio al quale si aggiungono: sali, antibiotico, siero fetale bovino.

Finalità dell'isolamento (diagnostica, conservazione del ceppo in azoto liquido, DNA, tipizzazione isoenzimatica e/o molecolare)

Sviluppo in coltura di promastigoti vitali





Diagnostica diretta: metodi molecolari

- Gli acidi nucleici possono essere evidenziati indipendentemente dalla capacità infettante.
- Gli acidi nucleici (DNA) sono stabili.
- La disponibilità di sequenze genere o tipo specifiche permette la ricerca per classi o gruppi di microorganismi.



Diagnostica diretta, **metodi molecolari**...perché?

I metodi molecolari una volta ottimizzati presentano:



- Facilità di uso
- Rapidità di risposta
- Elevata sensibilità
- Possibilità di informazioni quantitative
- Possibilità di automazione o semiautomazione dalla preparazione del campione fino alla lettura.

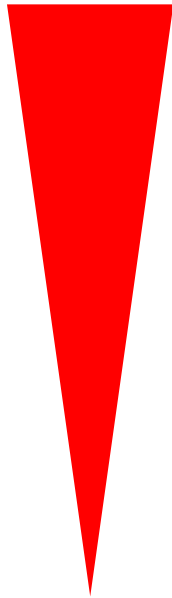




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Materiale biologico di partenza

sensibilità



Midollo osseo

Ago aspirato linfonodo

Milza

Raschiato/biopsia cute

Tampone congiuntivale

Buffy coat

Sangue intero

Matrici che offrono maggiori probabilita'di identificare il Dna di Leishmania in ordine decrescente di sensibilita'.



Matrici su cui effettuare la PCR per Leishmania

Matrice	Sensibilita'	Invasività
midollo osseo	alta	invasivo
ago aspirato linfonodale	alta	poco invasivo
milza	alta	invasivo
biopsia cutanea	alta	invasivo
raschiato cutaneo	alta	poco invasivo
tampone congiuntivale	alta	non invasivo
buffy coat	scarsa	poco invasivo
Sangue intero	scarsa	poco invasivo



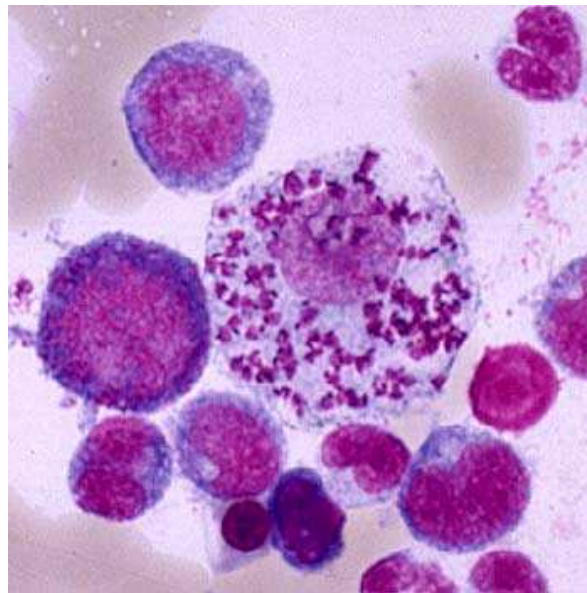


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

***Leishmania infantum*: ricerca nelle diverse matrici biologiche**

Roma, 13 ottobre 2015

Grazie per l'attenzione



LAURA SALVATO - DO Sierologia IZSLT

