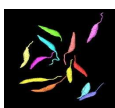


La diagnostica biomolecolare nella D.O. Sierologia

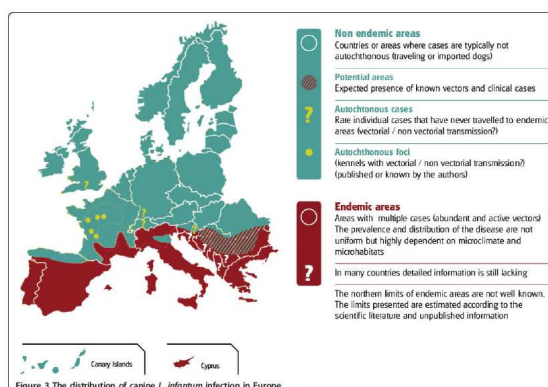
Dr.ssa Manuela Scarpulla

15 Dicembre 2011

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana,
Sezione di Firenze, S. Martino alla Palma, Via Castelpulci 43, Scandicci (FI)



Leishmania infantum



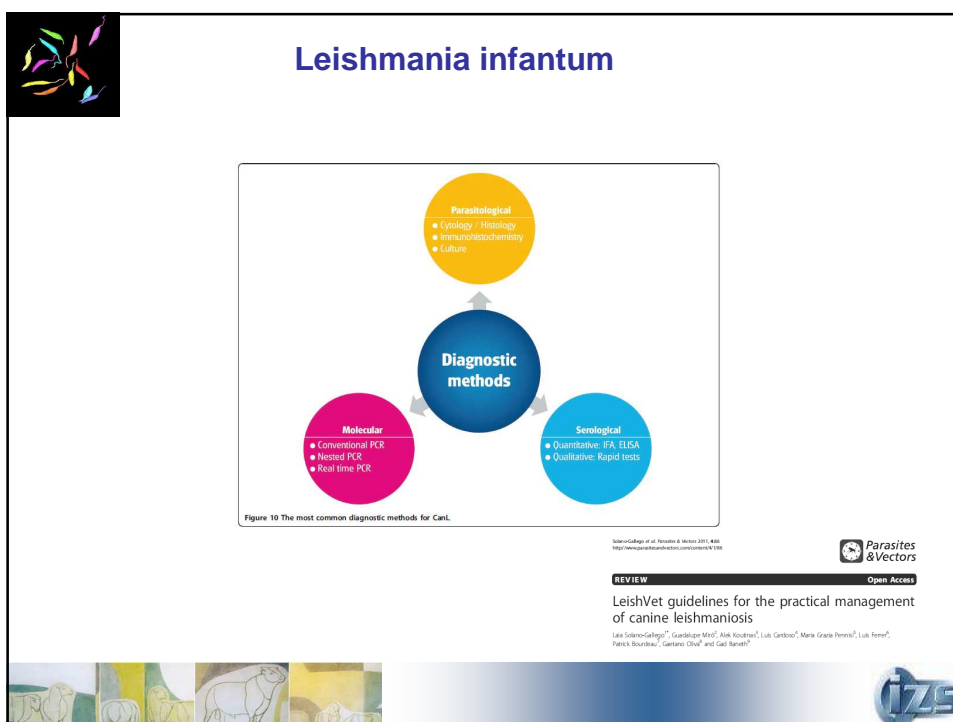
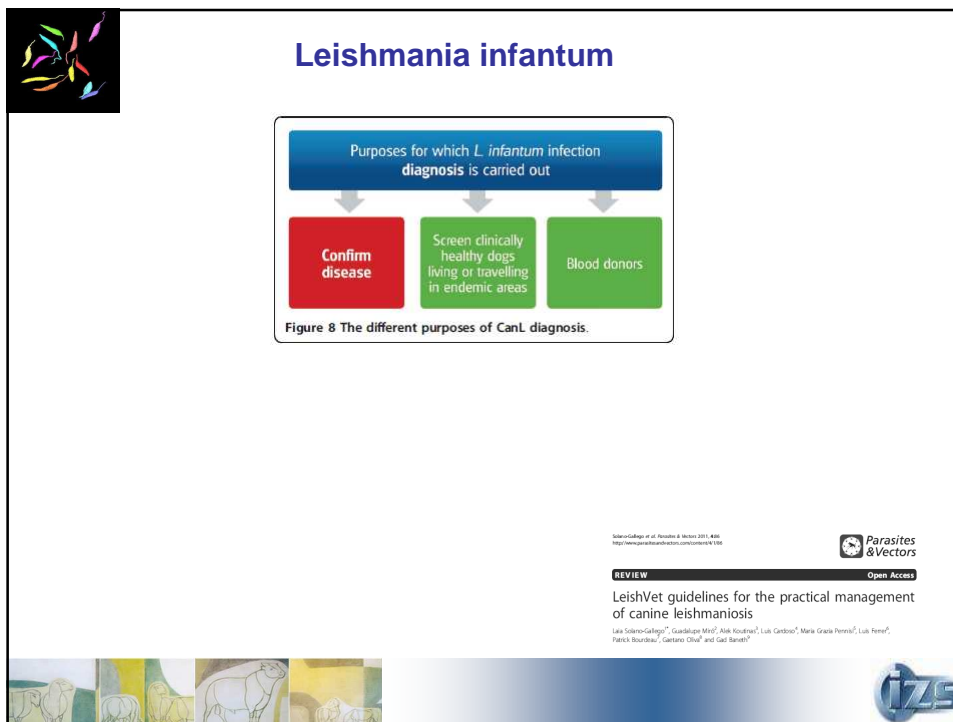
Salvo-Calleja et al. Parasites & Vectors 2011, 4:16
<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/16>

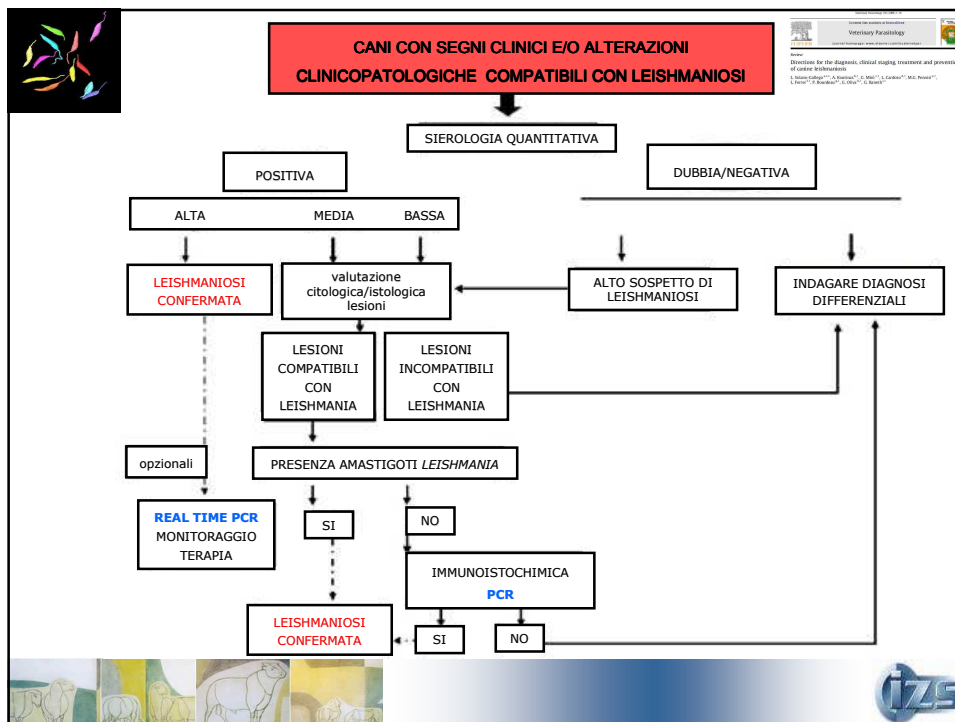



REVIEW Open Access
LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis

Luis Salazar-Calleja^{1,2}, Guadalupe Muñoz-Argüelles¹, Ana Koutourelou¹, Luis Cardenas³, Maria Gracia Peres⁴, Luis Ferreira⁵, Patrick Bourdeau⁶, Catherine Ouellet⁶ and Gad Saravali⁷









Leishmania infantum

Parasites & Vectors

REVIEW

LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis



Luis Solano-Gallego^{1,2}, Guadalupe May³, Aida Koutouy¹, Luis Cardozo⁴, Maria Gracia Penna⁵, Luis Peres⁶, Patrick Bourdeau⁷, Gentaro Chiu⁸ and Gail Baneth⁹


La PCR **non** si utilizza né come **primo** esame né come **unico** esame

PCR		
<ul style="list-style-type: none"> • Allows the detection of leishmanial DNA • High sensitivity (kDNA) and specificity • Parasitic load quantification (if Real time-PCR) 	<ul style="list-style-type: none"> • False positive results possible due to DNA contamination • Different standardization and techniques used by different diagnostic laboratories • Does not reveal immunological status • It cannot be performed as the sole diagnostic technique for the confirmation of the disease because a positive result confirms <i>Leishmania</i> infection but not disease 	

- di **conferma** per quei quadri che risultano dubbi in animali sintomatici

sierologia negativa o con anticorpi a basso titolo	quadro istopatologico suggestivo in assenza di parassiti
---	---
- per determinare la **carica parassitaria** (qPCR) ad es. per valutare l'efficacia del trattamento farmacologico







Leishmania infantum

LEISHMANIOSI CANINA: LINEE GUIDA SU DIAGNOSI, STADIAZIONE, TERAPIA, MONITORAGGIO E PREVENZIONE

Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico





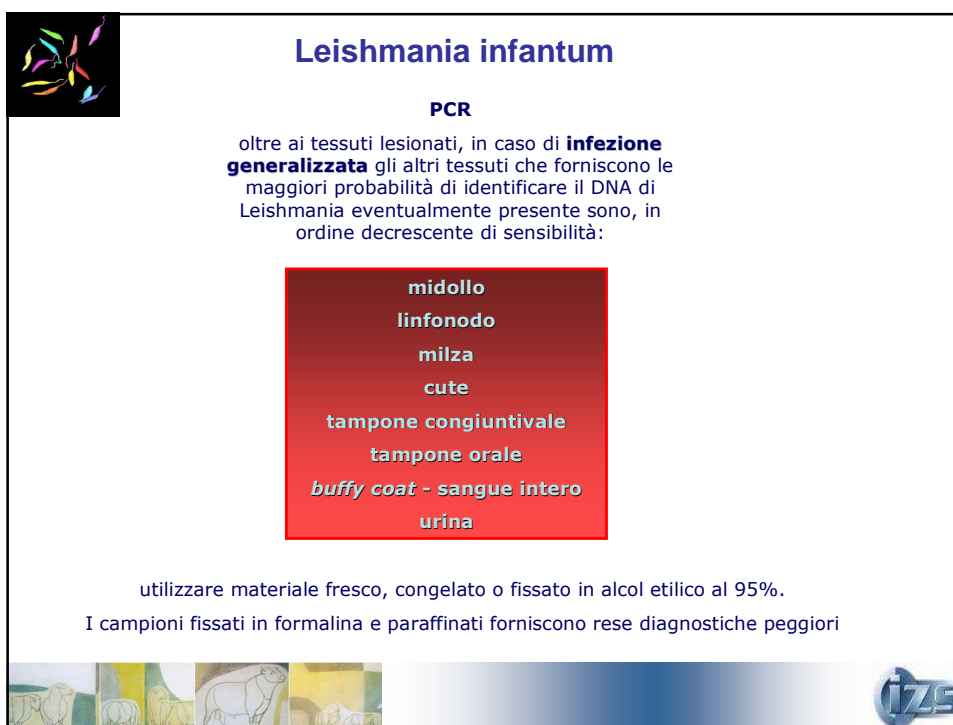
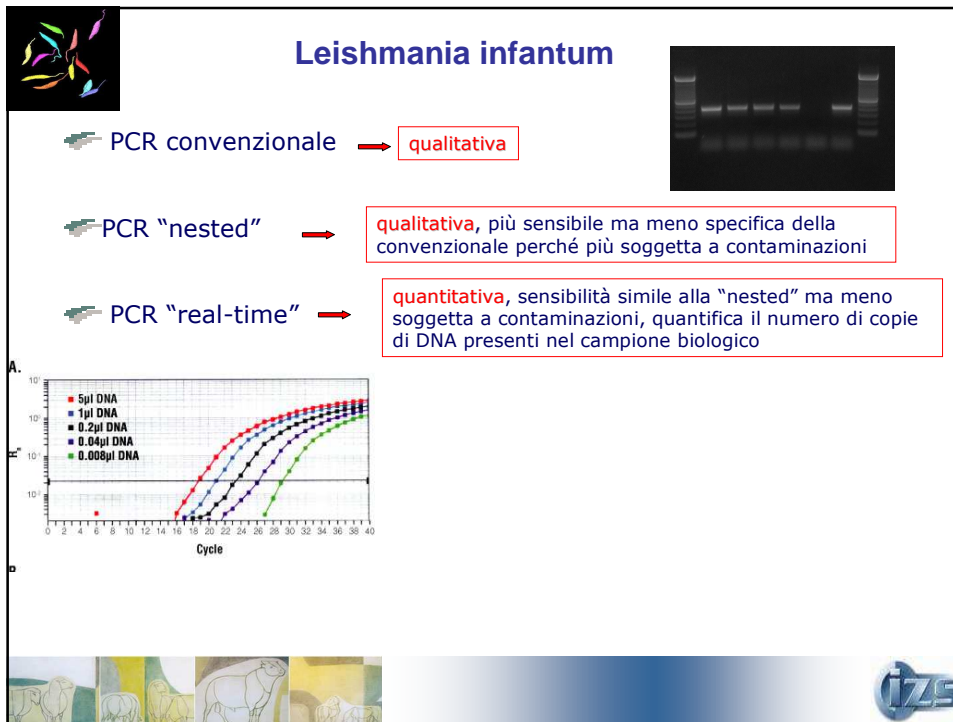
nei cani **resistenti** l'inoculazione di *Leishmania* può non essere seguita da disseminazione del parassita:

- un'eventuale positività cutanea in assenza di lesioni cutanee in area endemica non significa necessariamente che il cane sia infetto e sviluppi infezione
- eventuali positività midollari possono poi essere seguite da negativizzazione

non è in grado di discriminare la **vitalità** del parassita e non deve essere utilizzata da sola:

- spesso soggetti asintomatici sieronegativi viventi in zona endemica sono portatori di DNA di *leishmania* in assenza del parassita integro e vitale.





Leishmania infantum

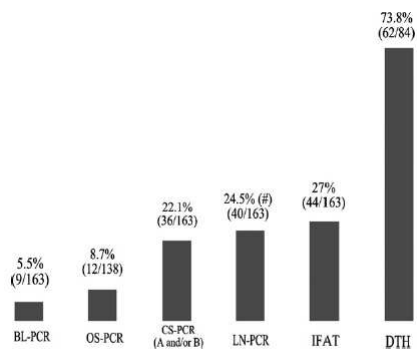
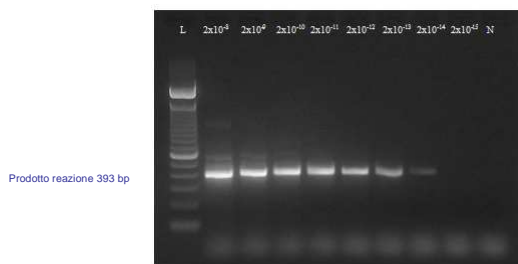


Fig. 1. Percentages of positive results obtained by means of IFAT, DTH and PCR on several tissues. *LN-PCR positive percentage was significantly higher than BL-PCR and OS-PCR results ($p < 0.0001$).

Lombardo, G., et al., Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.010



Leishmania infantum – 16S RNA



11/08/10 NESTED PCR PER LEISHMANIA (16S RNA - 332/221 333/222)
STUDIO DI SENSIBILITA' CON DNA ESTRATTO DA CULTURA PURA
LIMITE DI RILEVABILITA': 2×10^{-14} gg (1 parassita = 0.2 gg)

Mol Biochem Parasitol. 1992 Mar;51(1):133-42.

Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites.

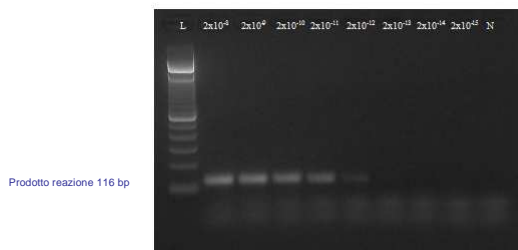
van Erp GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB

Laboratory for Tropical Hygiene, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands.





Leishmania infantum - kinetoplasto



Prodotto reazione 116 bp

12/08/10 PCR PER LEISHMANIA (kinetoplasto - 13a - 13b)
STUDIO DI SENSIBILITA' CON DNA ESTRATTO DA COLTURA PURA
LIMITE DI RILEVABILITA': 2×10^{-12} gg (1 parassita = 0.2 gg)



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

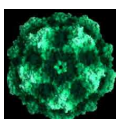
Veterinary Parasitology 125 (2004) 251–262

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/veterinary

Comparison of different tissue sampling for
PCR-based diagnosis and follow-up
of canine visceral leishmaniasis

Laura Manno^a, Fabrizio Vitale^b, Stefano Reale^b, Santo Caracappa^b,
Luigi Michele Pavone^a, Rossella Della Morte^c, Giuseppe Cringoli^d,
Norma Staiano^{a,*}, Angelo Elio Gravino^a

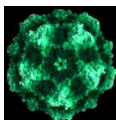


Parvovirus (CPV-2/FPLV)

•CANE

- agente eziologico della gastroenterite emorragica del cane
- febbre, vomito, diarrea, prevalentemente emorragica, leucopenia
- di norma nei cuccioli di 6-12 settimane di età
- virus stabile nell'ambiente per anni e resistente a molti disinfettanti: la malattia è altamente contagiosa e non richiede un contatto diretto cane-cane
- Il virus infetta le cellule delle cripte del piccolo intestino
- viene diffuso attraverso le feci per 13-30 giorni dopo la guarigione
- segni clinici iniziano 4-14 giorni dopo l'infezione
- i sintomi della parvovirosi non sono differenziabili dalle altre forme di enterite e le indagini di laboratorio risultano essenziali per confermare il sospetto clinico
- la ricerca dell'Ag nelle feci con test ELISA può dare esiti falsamente negativi a causa degli anticorpi dell'animale che bloccano l'Ag → PCR

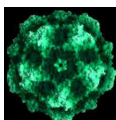




Parvovirus (CPV-2/FPLV)

•GATTO

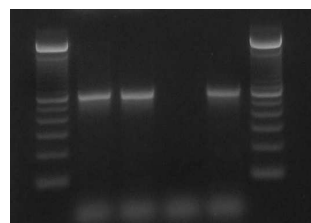
- agente eziologico della panleucopenia felina
- colpisce le cellule in rapida divisione (linfoidi, GI, midollo osseo)
- più frequente nei gattini con meno di 5 mesi, non vaccinati, con mortalità fino al 75%
- gatti adulti sviluppano solitamente una malattia subclinica o più lieve con maggiori probabilità di guarigione
- trasmissione per via orofecale
- ipovolemia improvvisa e morte, febbre, vomito, anoressia, dolore addominale, diarrea, atassia, ipermetria, problemi di visione
- leucopenia, PCR su feci, intestino, polmone, rene, SNC.



Parvovirus - proteina capsidica (CPV-2/FPLV)

nel corso degli anni il virus ha subito modificazioni genetiche che hanno determinato la comparsa di nuove varianti, indicate come CPV-2a, 2b e 2c, le quali hanno completamente sostituito il tipo originale CPV-2, presente attualmente solo in alcune formulazioni vaccinali.

La sequenza target per la reazione di PCR è rappresentata da un frammento di 583 bp del gene che codifica per la proteina VP2, conservato in tutte le varianti antigeniche del virus, delimitato dai primers 555for e 555rev.



583 bp



Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Virological Methods 138 (2005) 179–185



www.elsevier.com/locate/jviro

Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?

Costantina Desario, Nicola Decaro^a, Marco Campolo, Alessandra Cavalli, Francesco Citroni, Gabriella Elia, Vito Martella, Elisavera Lorenso, Michele Camero, Carlo Buonavoglia

^aDepartment of Animal Health and Pathology, Faculty of Veterinary Medicine of Bari, S.p.A. per Conoscenza Inc. 3, 70126 Bari, Italy

Received 24 November 2004; received in revised form 14 February 2005; accepted 17 February 2005
Available online 19 March 2005

Journal of General Virology (2005), 86, 3021–3025. Printed in Great Britain

SHORT COMMUNICATION

Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy

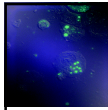
Carlo Buonavoglia,¹ Vito Martella,¹ Annamaria Pratelli,¹ Maria Tempesta,¹ Alessandra Cavalli,¹ Domenico Buonavoglia,² Giancarlo Bozzo,¹ Gabriella Elia,¹ Nicola Decaro^a and Leland Carmichael³

¹Department of Animal Health and Well-being, Faculty of Veterinary Medicine of Bari, S.p.A. per Conoscenza Inc. 3, 70126 Bari, Italy

²Department of Pathology and Infectious Diseases, University of Messina, Messina, Italy

³James Baker Institute, Cornell University, Ithaca, NY, USA



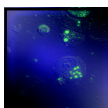


Ehrlichia canis



Rhipicephalus sanguineus

- Canidi domestici e selvatici
- Batteri gram negativi intracellulari
- Trasmissione tramite vettore: zecca
- Ciclo di sviluppo all'interno delle cellule mononucleate (monociti, macrofagi, cellule RE)
- Periodo d'incubazione: 8 - 20 giorni
- Febbre, depressione, anoressia, linfadenopatia, piastrinopenia (sanguinamento), manifestazioni neurologiche, pancitopenia, anemia
- Diagnosi:
 - Anticorpi (IFI) persistono per lunghi periodi anche dopo guarigione
 - DNA (PCR)

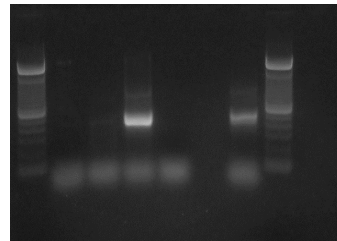


Ehrlichia canis - 16S rRNA

PCR per il genere (first)
Primer **fd1/EHR16SR**

409 bp

PCR per la specie *Ehrlichia canis* (nested)
Primer **CANIS/GA1UR**



- Genus and species level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. Warner CK, Dawson JE, 1996. In: Persing, D.H. (Ed.), PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. ASM Press, Washington, DC, pp.100-105.



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Parasitology 115 (2003) 343–348



www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan

Hisashi Inokuma^{a,*}, Takeshi Beppu^a, Masaru Okuda^a, Yojiro Shimada^b, Yoshimi Sakata^c

^a Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8523, Japan

^b Nippon Zenshoku Kagaku Co. Ltd., Kariyama, Fukuoka 848-0196, Japan

^c Meriel Japan Ltd., Tokyo 100-0014, Japan

J. Vet. Med. Sci. 2001 Jul;62(7):815-7

Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan.

Inokuma H, Okuda M, Beppu T, Shimada Y, Sakata Y

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Japan.





Anaplasma phagocytophilum – 16S rRNA

- anaplasmosi granulocitaria umana (HGE)
- trasmissione mediante puntura di una zecca, prevalentemente Ixodes ricinus.
- febbre più o meno elevata, senza sintomi specifici,
- insorgenza primaverile-estiva
- nel cane: febbre, anoressia, epato- e splenomegalia, sintomatologia nervosa centrale, zoppie, artropatie
- nella pecora è un importante agente abortigeno

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2003, p. 717-722
0095-1137/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.41.2.717-722.2003

Vol. 41, No. 2

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1998, p. 1899-1895
0095-1137/98/\$14.00+0
Copyright © 1998, American Society for Microbiology

Vol. 36, No. 4

Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*

Robert F. Massung* and Kimetha G. Slater

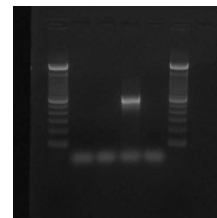


Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic Ehrlichiae

ROBERT F. MASSUNG,¹* KIM SLATER,¹ JESSICA H. OWENS,¹ WILLIAM L. NICHOLSON,¹ THOMAS N. MATHER,² VICTORIA B. SOLBERG,² AND JAMES G. OLSON²

546 bp

Primer pairs: ge3a/ge10r
ge9f/ge2



Rickettsia spp.

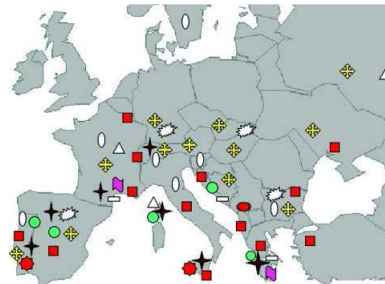
- Batteri responsabili di forme morbose a vario grado di severità.
- *Rickettsia conorii* (Febbre Bottonosa del Mediterraneo):
 - rickettsiosi più diffusa nell'area del Mediterraneo
 - unica rickettsiosi endemica in Italia
- lesioni maculo-papulose o nodulari (febbre bottonosa) che iniziano in genere dagli arti inferiori coinvolgendo le superfici palmo-plantari
- In molti casi è presente un'escara ("tache noir") corrispondente alla zona della puntura della zecca
- se non diagnosticata e trattata adeguatamente può decorrere in forma grave rendendo spesso necessaria l'ospedalizzazione del paziente

La zecca principalmente coinvolta nella trasmissione di *R. conorii* è *Rhipicephalus sanguineus*, la comune zecca del cane





Rickettsia spp.



Distribuzione delle specie di *Rickettsia* in Europa. I simboli colorati indicano le specie patogene, i simboli bianchi indicano le specie di possibile o non nota patogenicità (da Parola et al., 2005)

- | | |
|--|---|
| ■ <i>R. conorii conorii</i> | ○ <i>R. helvetica</i> |
| ◆ <i>R. conorii israelensis</i> | ✦ <i>R. massillae</i> |
| ⬢ <i>R. conorii caspia</i> | ⊙ « <i>R. monacensis</i> » |
| ⬢ <i>R. sibirica</i> | and related rickettsias |
| ⬢ <i>R. mongolitimonae</i> | □ <i>R. rhipicephali</i> |
| ● <i>R. aeschlimannii</i> | △ <i>Rickettsia</i> sp. RpA4 |
| ◆ <i>R. slovaca</i> | |

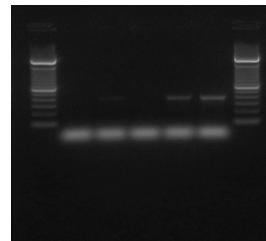


Rickettsia spp. glt A (Citrate synthetase)

Primer pairs:

RpCS.877p/RpCS.1258n

381 bp



JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Mar. 1991, p. 1576-1589
0021-9193/91/051576-14\$02.00/0
Copyright © 1991, American Society for Microbiology

Vol. 173, No. 5

Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes

RUSSELL L. REGNERY,^{1*} CATHERINE L. SPRUILL,¹ AND BRIAN D. PLIKAYTIS²

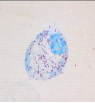
INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Apr. 1997, p. 252-261
0020-7713/97/040252-10
Copyright © 1997, International Union of Microbiological Societies

Vol. 47, No. 2


Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the Rickettsiae†

VERONIQUE ROUX,¹ ELENA RYDKINA,^{1,2} MARINA EREMEEVA,¹ AND DIDIER RAOULT^{1*}





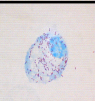


Coxiella burnetii



- **febbre Q**
- malattia infettiva che colpisce sia gli animali che l'uomo
- segnalata in numerose specie, compresi bovini, ovini, caprini, selvatici, volatili e artropodi
- trasmissione per inalazione attraverso contatto con animali infetti (coxielle presenti in liquidi, escreti, placenta, materiali contaminati quali lana, paglia, letame, recinti, indumenti infetti).
- E' possibile che la trasmissione avvenga anche attraverso l'assunzione di latte consumato crudo e per mezzo di trasfusioni ematiche o di midollo osseo
- Nei bovini e negli ovini è un importante agente abortigeno
- Nell'uomo sintomi simili a quelli dell'influenza, in alcuni casi particolarmente gravi può causare polmonite ed epatite
- serbatoio naturale dell'infezione è rappresentato da bovini, pecore, capre, gatti, animali selvatici (tra cui molte specie di roditori selvatici) uccelli e zecche (Ixodidae).
- Le zecche, in cui la trasmissione dell'infezione avviene per via transovarica e transtadiale, mantengono l'infezione tra roditori selvatici, animali più grandi ed uccelli
- Diagnosi sierologica indiretta ELISA
- Diagnosi diretta PCR

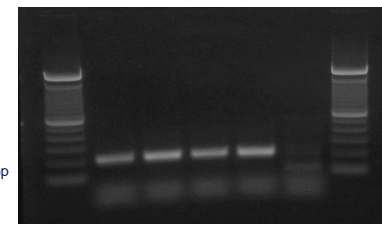






Coxiella burnetii - gene IS1111

REGIONE RIPETITIVA TRANSPOSON - LIKE

STN (Single Tube Nested) primers pairs: TRANS1/TRANS2
261F/463R



203 bp



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect



Veterinary Microbiology 118 (2006) 101–106

**veterinary
microbiology**

www.elsevier.com/locate/vetmic

Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR

Antonio Parisi ^{a,*}, Rosa Fraccalvieri ^a, Mariassunta Cafiero ^a, Angela Miccolupo ^a, Iolanda Padalino ^a, Cosimo Montagna ^a, Federico Capuano ^b, Roldano Sottili ^a



Borrelia burgdorferi s.l.

- spirocheta responsabile nell'uomo della Malattia di Lyme
- attualmente identificate diverse specie all'interno del complesso *Borrelia burgdorferi* sensu lato: *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s. s.), *B. afzelii* e *B. garinii*.
- principali regioni interessate dalla Malattia di Lyme sono il Friuli Venezia Giulia, il Veneto, il Trentino Alto Adige e la Liguria
- trasmissione mediante puntura di zecca, prevalentemente *Ixodes ricinus* in Italia
- ciclo biologico complesso che vede la zecca vettore e i piccoli roditori serbatoi, nei quali la borrelia rimane attiva e contagiante nei confronti del vettore
- soggetti maggiormente a rischio: agricoltori, forestali, cacciatori e chiunque svolga attività anche ludiche all'aperto in zone collinari-boschive
- **Uomo**
 - Malattia di Lyme: malattia infettiva multisistemica che può coinvolgere cute, articolazioni, sistema nervoso e cuore. Può manifestarsi in forma subclinica o con il caratteristico Eritema Migrante che esordisce con una papula che si espande successivamente accompagnata da febbre, linfadenopatia e cefalea.
- **Cane**
 - Solo una bassissima percentuale di cani esposti alla borrelia (sieropositivi) sviluppa segni clinici attribuibili alla malattia
 - febbre, zoppie intermittenti, poliartriti, linfadenopatie, anoressia, letargia, glomerulonefriti



Borrelia burgdorferi s.l.

- **Diagnosi**
- si basa sull'anamnesi (pregressa puntura di zecca), sul quadro clinico e su vari test sierologici (ricerca di anticorpi specifici antispirocheta), tra cui l'immunofluorescenza
- i cani producono anticorpi 2 – 3 settimane dopo l'esposizione e questi livelli anticorpali restano elevati per circa 18 mesi.
- si possono avere reazioni anticorpali crociate con leptospire o spirochete presenti in cavità orale



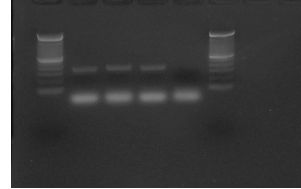


Borrelia burgdorferi s.l. 16S RNA

357 bp

METODO DI PROVA PER LA RICERCA DI *BORRELIA BURGDOFFERI SENSU LATO* in CAMPIONI BIOLOGICI O IN ZECHE mediante PCR

- Rileva la presenza del genoma di *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex (*Borrelia burgdorferi* sl)
- amplificazione di una parte del gene che codifica per il 16S rRNA
- metodo qualitativo che si applica a campioni biologici quali biopsie cutanee, capsula articolare, fluido sinoviale, liquor, siero o zecche.



Primer BBDL5-fw/BBDL5-rev

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 1992, p. 2830-2834
0095-1137/92/112830-05\$02.00/0
Copyright © 1992, American Society for Microbiology

Vol. 30, No. 11

Development of Polymerase Chain Reaction Primer Sets for
Diagnosis of Lyme Disease and for Species-Specific
Identification of Lyme Disease Isolates by
16S rRNA Signature Nucleotide Analysis

RICHARD T. MARCONI* AND CLAUDE F. GARON

