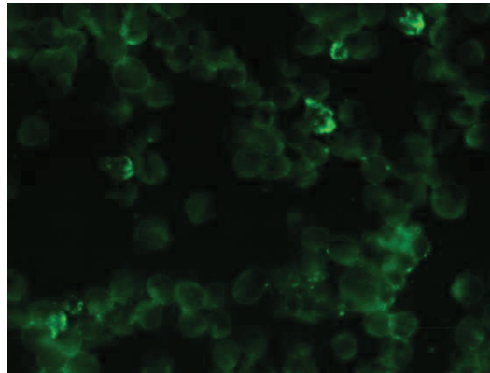


MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI: RICKETTSIE ED ALTRI BATTERI INTRACELLULARI NEGLI ANIMALI E NELL'UOMO.

Rickettsia spp. e *Ehrlichia* spp.



Rickettsia spp.: diagnostica di laboratorio

Manuela Scarpulla

Roma, 17 ottobre 2017



Esami sierologici

- sono gli esami più utilizzati per la diagnosi di rickettsiosi
- metodiche semplici e kit ampiamente disponibili in commercio
- apparecchiature di base solitamente presenti nei laboratori
- utilizzate per diagnosi e per studi epidemiologici di sieroprevalenza
- l'immunofluorescenza indiretta (IFA/MIF) per la ricerca di IgG e IgM è il metodo sierologico di riferimento
- la conferma dei risultati dell'IFA/MIF viene eseguita tramite test immunologico del Western Blot (WB)



Immunofluorescenza indiretta (IFA/MIF)

- Nella MSF solitamente gli anticorpi nel sangue si rilevano tra i 7 e i 15 gg dopo l'insorgenza della malattia
- in pazienti con altre infezioni da rickettsia SFG, la risposta immunologica può essere ritardata anche fino a 28 gg
- un sospetto clinico di rickettsiosi dovrebbe essere confermato testando due campioni di siero sequenziali prelevati a distanza di 2-6 settimane (siero acuto e convalescente)
- la conferma di un'infezione recente o in corso si ottiene con una sier conversione (passaggio dallo stato di sieronegatività a quello di sieropositività) o con un aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale tra il siero acuto e quello convalescente
- se non si osserva un incremento del titolo, effettuare un terzo prelievo a distanza di 4-6 settimane
- gli studi sierologici sono utili per determinare la prevalenza di anticorpi nei confronti di *Rickettsia* spp. in una determinata area
- il valore di sieroprevalenza dovrebbe essere tenuto in considerazione nella scelta del *cutoff*



Immunofluorescenza indiretta (IFA/MIF)

- la risposta anticorpale nei confronti delle rickettsie è diretta principalmente contro **antigeni di superficie appartenenti** al lipopolisaccaride di membrana rLPS e alle proteine esterne di membrana (rOmpA e/o rOmpB)
- l'immunofluorescenza (IFA/MIF) rileva gli **anticorpi diretti contro tutti gli antigeni di superficie** ma **prevalentemente contro quelli del lipopolisaccaride di membrana rLPS**
- all'interno di uno stesso gruppo (SFG, TG) tutte le specie presentano un **rLPS comune** e **rOmpB e rOmpA variabili**
- per questo motivo il rilevamento degli anticorpi nei confronti di *Rickettsia* spp. con IFA/MIF è considerato gruppo-specifico
- a causa della presenza dell'antigene comune rLPS, gli effetti della differente reattività ai diversi antigeni (ad es. rOmpB) risulta diminuita
- i titoli anticorpali rilevati nei confronti della specie di rickettsia responsabile dell'infezione sono solitamente **da 2 a 4 volte più alti** di quelli rilevati nei confronti di specie appartenenti allo stesso gruppo (SFG, TG)



Cut off IFA/MIF

titoli indicativi di infezione da *Rickettsia conorii* nell'uomo

Regioni endemiche per MSF

titolo IgG ≥ 128 e titolo IgM ≥ 32

regioni non endemiche per MSF

titolo IgG ≥ 64 e titolo IgM ≥ 32

ampia **cross-reattività**
all'interno dei gruppi di
Rickettsia (SFG, TG)



IFA positivo
=
esposizione a *Rickettsia* spp.

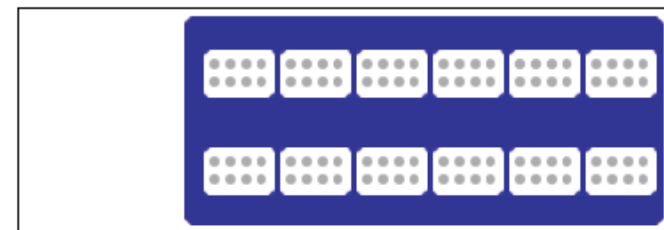
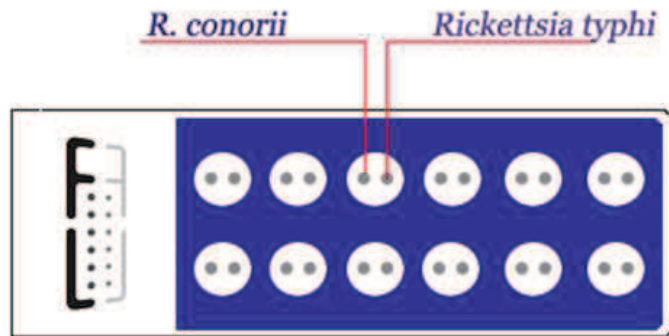
utile per discriminare SFG da TG

testare un singolo antigene non consente di raggiungere conclusioni riguardanti
l'agente eziologico a livello di specie

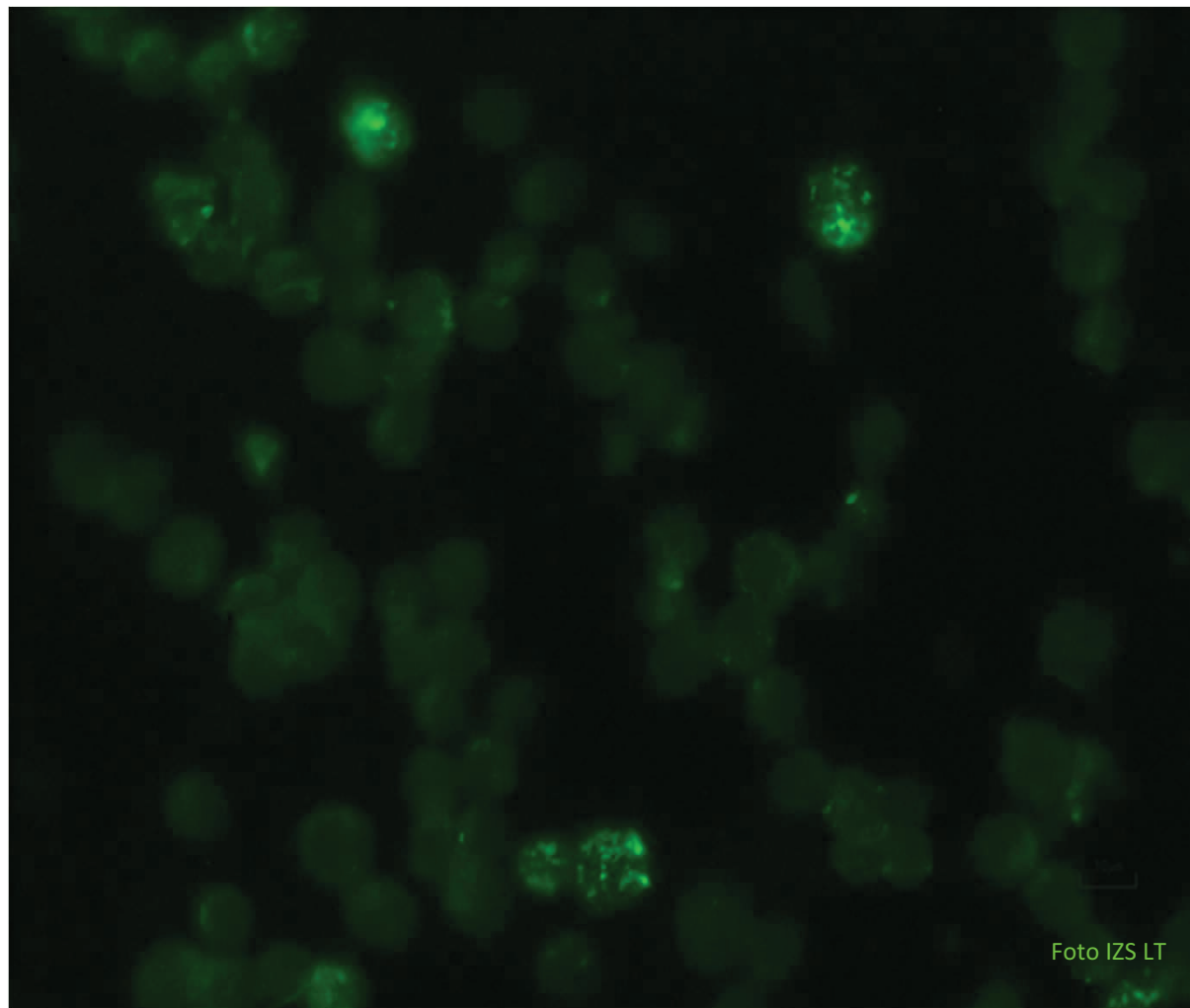


micro-immunofluorescenza (MIF)

- sono presenti **2 o più antigeni in ciascun pozzetto** (fino a 6 antigeni diversi)
- permette la ricerca **separata e simultanea** di anticorpi diretti verso antigeni diversi
- ad esempio: *Rickettsia conorii* e *Rickettsia typhi* => riesco a differenziare SFG e TG
- gli antigeni utilizzati per allestire i vetrini sono rappresentati da tre proteine di superficie ad alto peso molecolare purificate, OmpA, OmpB e PS120, che contengono epitopi specie-specifici che permettono di sierotipizzare le rickettsie a livello di specie

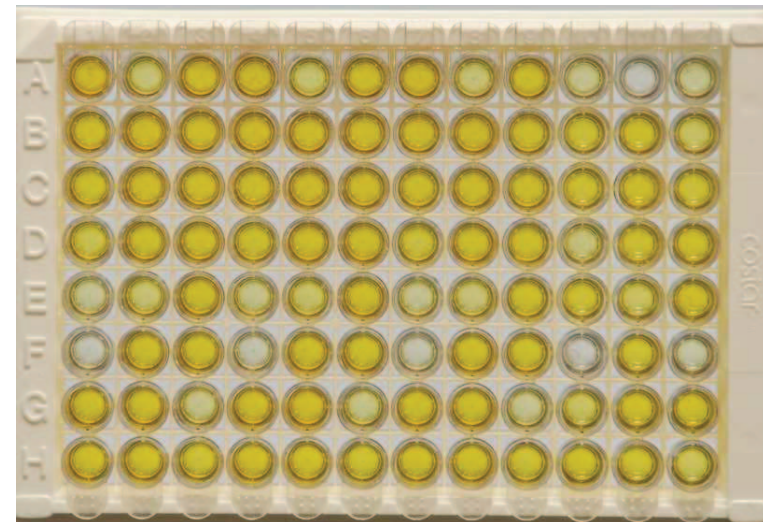


Immunofluorescenza indiretta (IFA/MIF)



Test immunoenzimatici (ELISA)

- utilizzano sia lisati cellulari che antigeni purificati (rLPS, rOmpB)
- rLPS => rileva la risposta anticorpale più precoce, utilizzato per ricercare IgG (le IgM hanno problemi di cross-reattività/bassa specificità), test di screening
- rOmpB => eccellente sensibilità sia di gruppo che di specie, utilizzato per ricercare sia IgG che IgM



Western Blot (WB)

- anticorpi diretti verso il lipopolisaccaride (rLPS) => precoci
- anticorpi diretti verso specifici antigeni proteici (SPAs) di membrana, come rOmpA e rOmpB => tardivi
- utile nella diagnosi delle rickettsiosi perchè **si positivizza precocemente** nel corso della malattia
- utile come **test di conferma** in quanto rileva gli anticorpi più tardivi nei confronti di specifici antigeni proteici localizzati sulla superficie della membrana
- Se con il WB non si riesce a identificare la specie di *Rickettsia* responsabile dell'infezione, si può eseguire un test di cross-adsorbimento seguito da un secondo WB sul risultante surnatante



Cross-adsorbimento

- incubare il siero di un paziente con il batterio noto per cross-reagire con quello ricercato
- quando viene eseguito l'adsorbimento con il batterio causa della malattia, scompaiono sia gli anticorpi diretti verso di esso sia quelli diretti (anche) verso un batterio di specie diversa
- quando viene eseguito l'adsorbimento con un batterio che non ha provocato la malattia (ma responsabile di cross-reattività), gli anticorpi diretti (anche) verso questo batterio scompaiono mentre quelli diretti verso il batterio che causa la malattia rimangono rilevabili
- la presenza di cross-reattività viene evidenziata con l'esecuzione di un secondo WB dopo l'avvenuta reazione di adsorbimento del siero con gli antigeni cross-reagenti



western blot (WB)

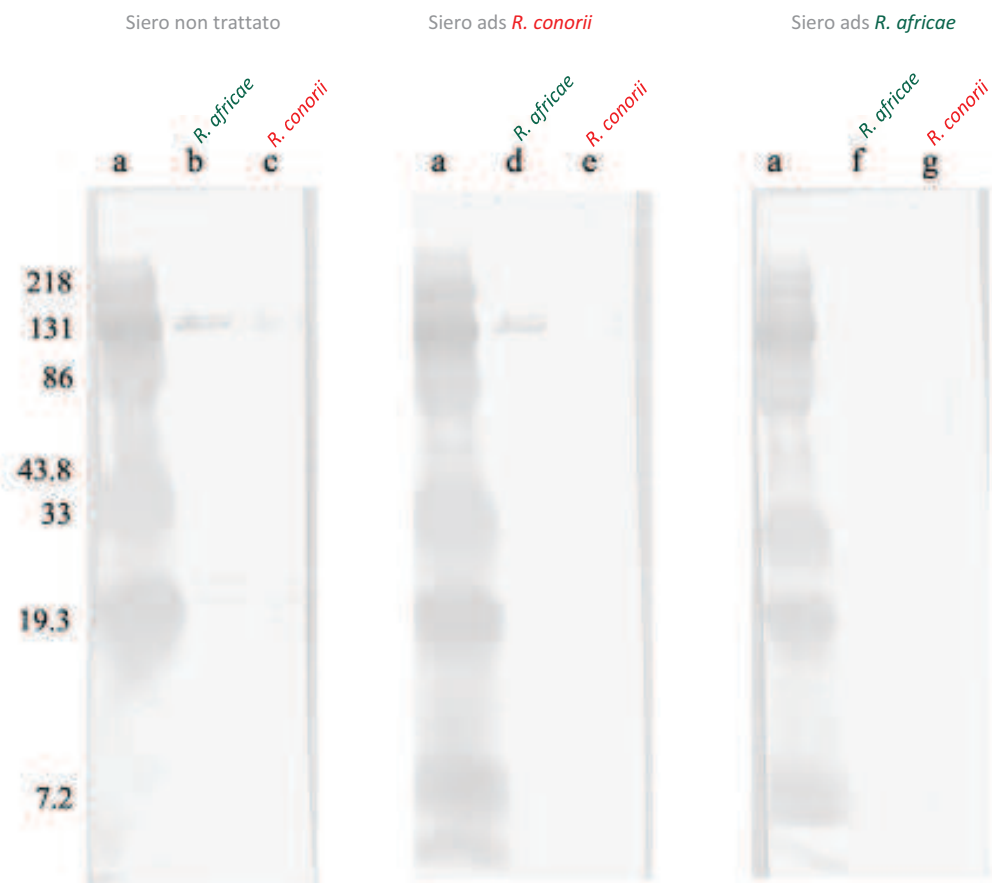
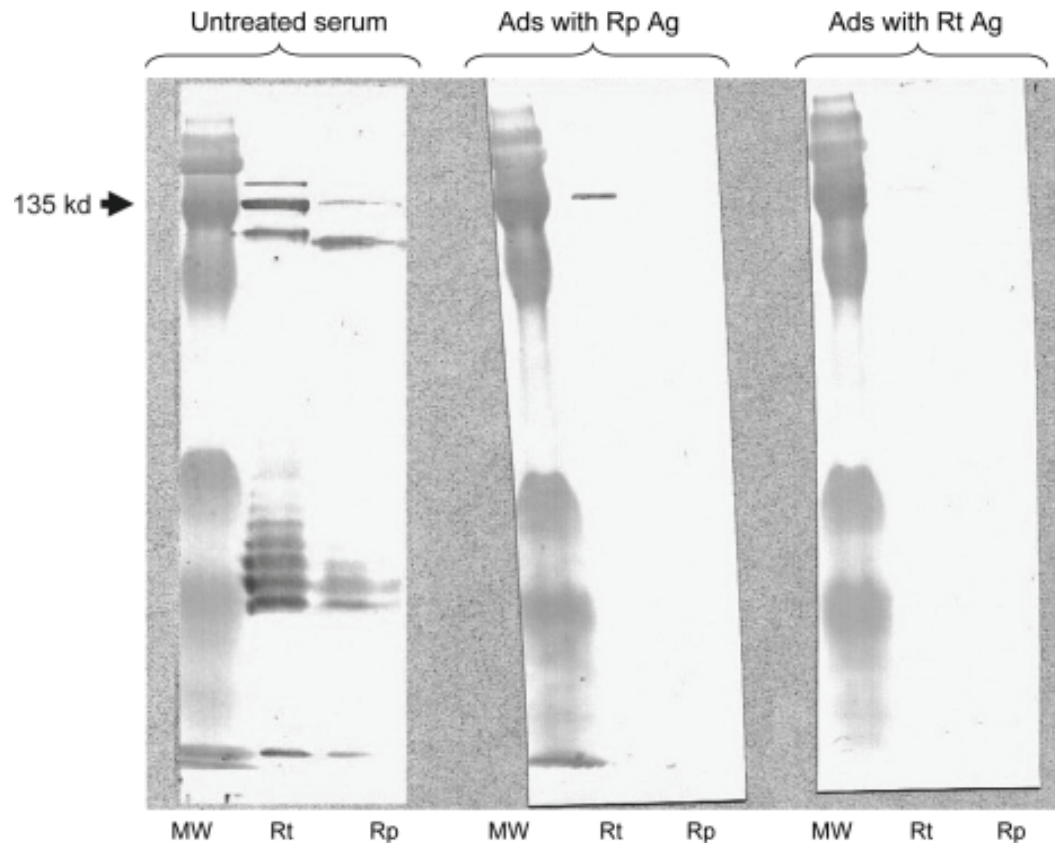


FIG. 2: Western immunoblotting of serum samples from a patient with ATBF before and after cross-adsorption assay with *R. conorii* or *R. africae*. Lanes: a, molecular mass markers; b, d, and f, *R. africae* antigen; c, e, and g, *R. conorii* antigen. Serum samples were either untreated (lanes b and c) or absorbed with *R. conorii* (lanes d and e) or *R. africae* (lanes f and g). The positions of molecular mass markers (in kilodaltons) are shown to the left of the gel.

From Mogens Jensenius M, Fournier PF, Vene S, Ringertz SH, Myrvang B, Raoult D. Comparison of Immunofluorescence, Western Blotting, and Cross-Adsorption Assays for Diagnosis of African Tick Bite Fever. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July 2004, p. 786–788



western blot (WB)



Western blot assay and cross-adsorption studies of an immunofluorescence assay–positive serum sample from a patient with rickettsiosis in Algeria.

Antibodies were detected at the highest titer (immunoglobulin [Ig] G 256, IgM 256) for both *Rickettsia typhi* and *R. prowazekii* antigens.

Columns Rp and Rt, Western blots using *R. prowazekii* and *R. typhi* antigens, respectively. MW, molecular weight, indicated on the left.

When adsorption is performed with *R. typhi* antigens (column Ads with Rt Ag), it results in the disappearance of the signal from homologous and heterologous antibodies, but when it is performed with *R. prowazekii* antigens (column Ads with Rp Ag), only homologous antibody signals disappear, indicating that the antibodies are specific for *R. typhi*.

From Mouffok N, Parola P, Raoult D . 2008. Murine typhus, Algeria. *Emerging Infect. Dis.* 14(4):676-8



western blot (WB)

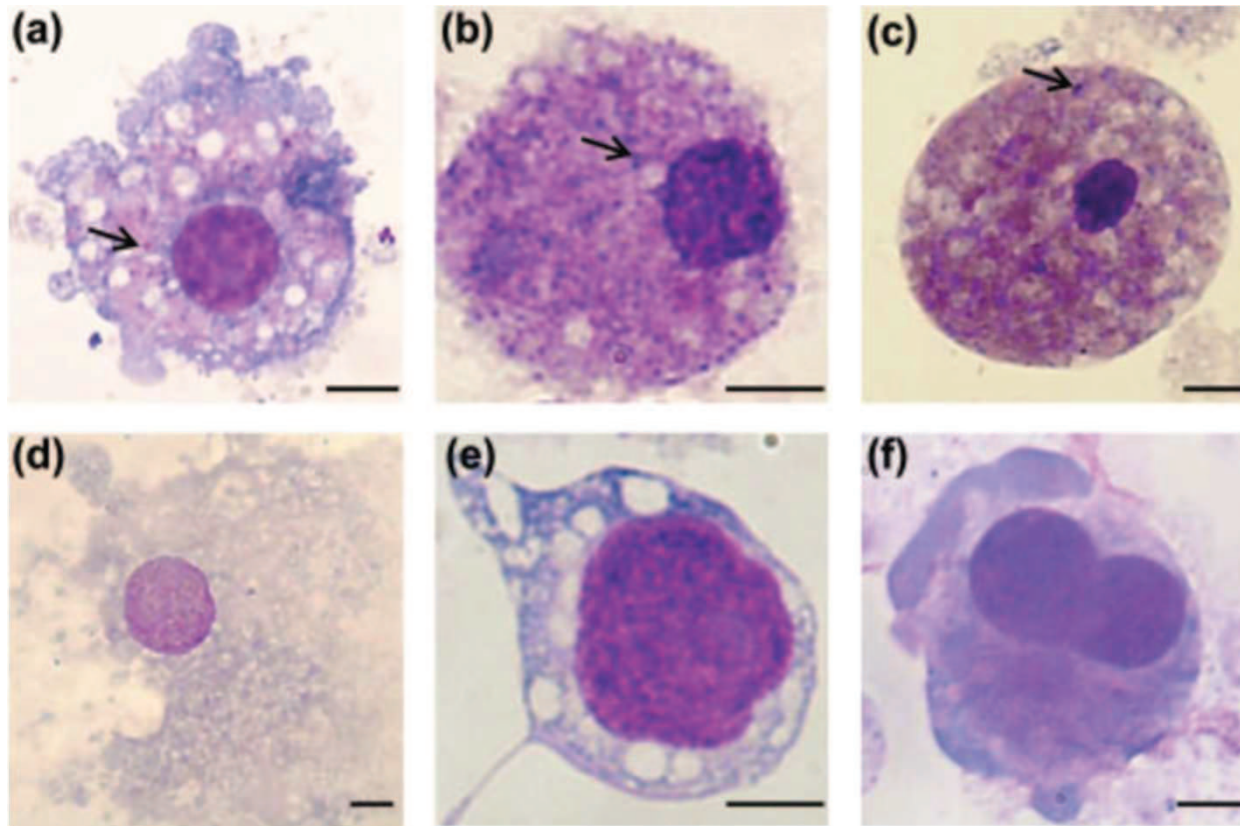
Limiti:

- sono necessarie elevate quantità di antigene
- costi elevati
- solitamente il test è conclusivo solo in campioni con una marcata risposta anticorpale (titoli IgG > 1:64)

=> effettuato solo in laboratori specializzati



Esame microscopico



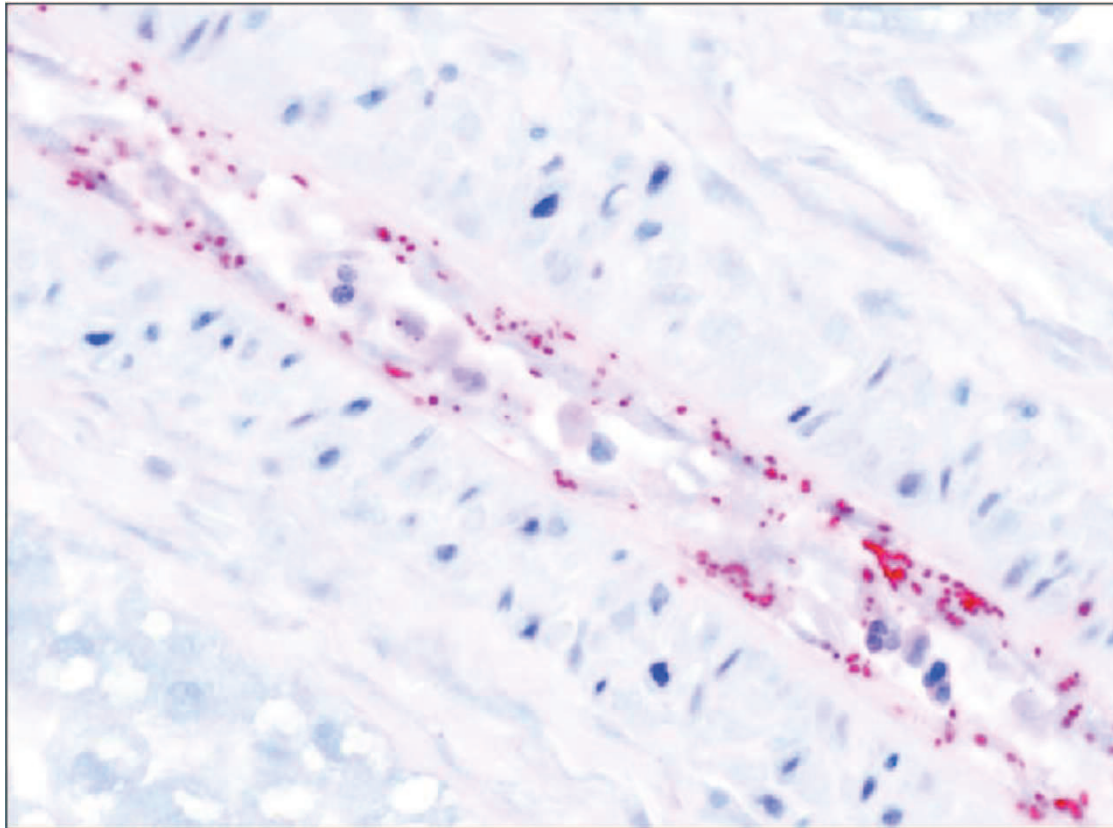
- le rickettsie si colorano scarsamente con la colorazione di Gram, possono essere colorate con le colorazioni di Giménez e Giemsa
- si evidenziano come batteri di colore rosso nel citoplasma delle cellule infette

Cell culture cytopsin preparations stained with Diff-Quik. Top row shows rickettsiae (tip of arrows) from “*Ca. R. andeanae*” infected (a) *A. maculatum* embryonic cells, (b) ISE6 cells, and (c) Vero cells at days 47 (*A. maculatum* cells), 196 (ISE6), and 83 (Vero). **Bottom row represents uninfected** (d) *A. maculatum* embryonic cells, (e) ISE6 cells, and (f) Vero cells at day 196. Magnification 1,000× under oil immersion. Scale bar is equivalent to 5 μm. Images were captured by using an Olympus BX41 compound microscope and Nikon DS-Fi1 5-Megapixel CCD Color Camera.

From: Isolation of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Embryonic Cells of Naturally Infected *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae) J Med Entomol. 2013;50(5):1118-1125. doi:10.1603/ME13010



Esame microscopico IHC



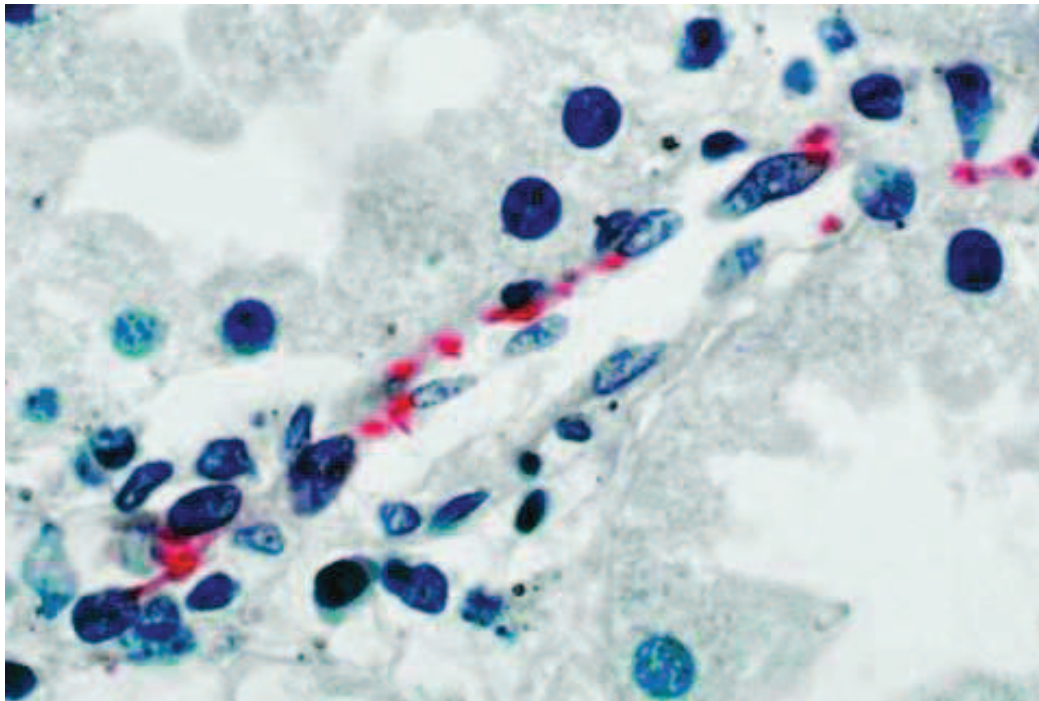
- **nei pazienti infetti**, le rickettsie si cercano nelle sezioni di tessuti utilizzando colorazioni immunoistochimiche (IHC)
- possono essere usati anticorpi specifici, marcati con fluorescina o con enzimi, per colorare i batteri intracellulari nei campioni bioptici (ad es. lesioni cutanee)
- solitamente nel sangue in quantità insufficiente per essere rilevate in uno striscio

Immunohistochemical stain demonstrating *Rickettsia rickettsii* (red) in blood vessel endothelial cells.

Published in: M. Biggs Holly et al., 2016. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States: A Practical Guide for Health Care and Public Health Professionals. MMWR. Recommendations and Reports. 65. 1-44. 10.15585/mmwr.rr6502a1.



Esame microscopico IHC



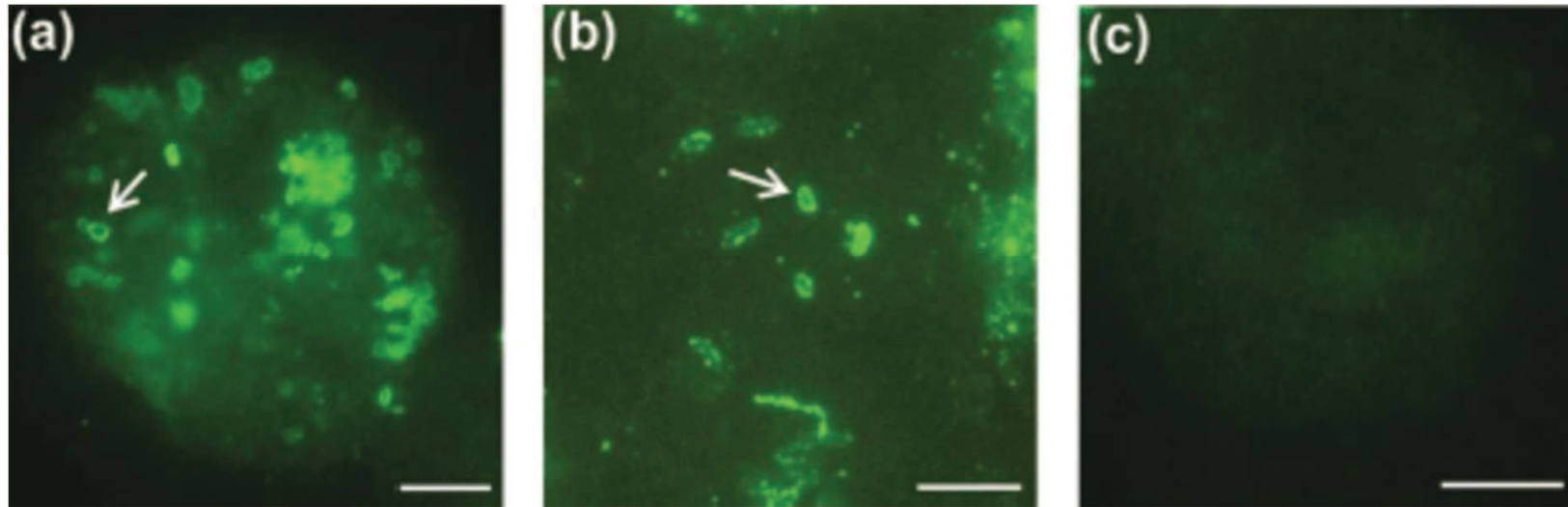
Immunohistochemical stain demonstrates *Rickettsia rickettsii* in endothelial cells of a blood vessel in kidney from patient I. (Hematoxylin counterstain; original magnification X 1200)

Published in: Márcio Antonio Moreira Galvão *et al.*, 2003. Fatal Spotted Fever Rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 9(11):1402-1405.

- **vantaggi:**
 - > Se 70%, Sp 100%
 - > in 24h si conferma un'infezione da rickettsia
- **limiti:**
 - > ab monoclonali difficilmente reperibili
 - > reagenti immunologici solitamente gruppo specifici piuttosto che specie specifici
 - > campioni di tessuto più difficili da ottenere rispetto al sangue



IHC

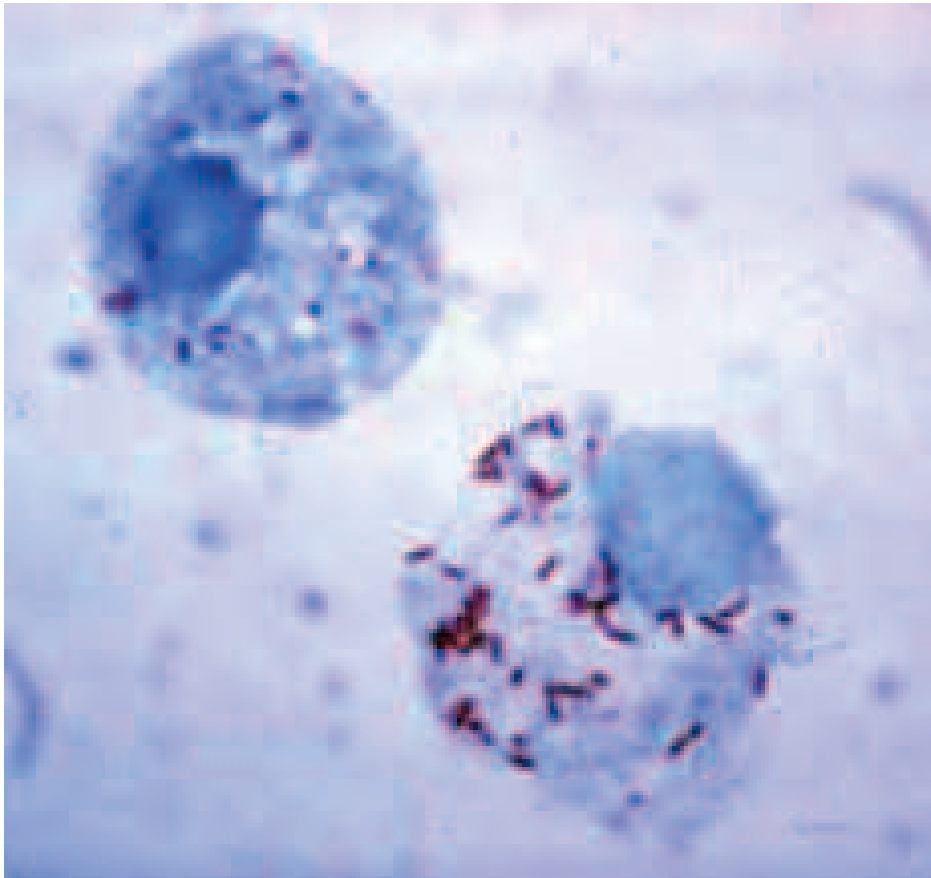


Immunofluorescence antibody assay by using *R. rickettsii* antibodies and fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibodies. (a) Extracellular rickettsiae (tip of arrow) in *A. maculatum* embryonic cells; (b) *R. parkeri* grown in ISE6 cells as a positive control (successful culture in ISE6 cells described by Burkhardt et al. 2011); (c) uninfected *A. maculatum* embryonic cell at day 56. Magnification 1,000×, oil immersion. Scale bar is equivalent to 5 µm. Images were captured by using an Olympus BX41 compound microscope and Nikon DS-Fi1 5-Megapixel CCD Color Camera.

From: Isolation of “Candidatus Rickettsia andeanae” (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Embryonic Cells of Naturally Infected Amblyomma maculatum (Ixodida: Ixodidae) J Med Entomol. 2013;50(5):1118-1125. doi:10.1603/ME13010



Esame microscopico

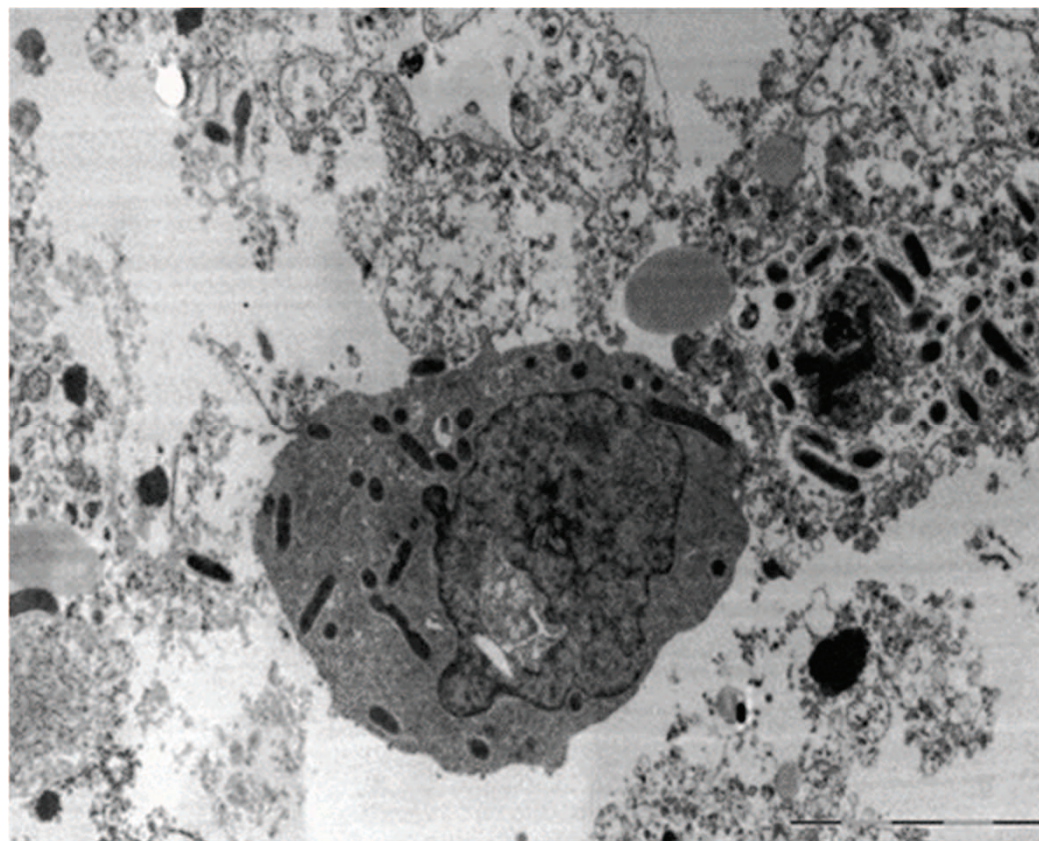


Giménez stain of hemolymph cells infected with *Rickettsia rickettsii*. Photo credit: Rocky Mountain Spotted Fever info page from the CDC.

- le matrici migliori per la ricerca delle rickettsie **nelle zecche** sono:
 - emolinfa in zecche vive
 - estratto di ghiandole salivari in zecche congelate
- le rickettsie si evidenziano, dopo colorazione Giménez o Giemsa, come batteri di colore rosso nel citoplasma delle cellule infette
- L'emolinfa viene strisciata su un vetrino, colorata ed esaminata al microscopio (*hemocyte test*)
- per ridurre i costi, si consiglia di effettuare la PCR solo sulle zecche che mostrano un *hemocyte test* positivo



Esame microscopico



Rickettsia conorii conorii localized in cytoplasm of host cells as seen by electron microscopy
(from Rovey C, Brouqui P, Raoult D. Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis 14(9), Sept 2008)



Metodi biomolecolari

- la reazione a catena della polimerasi (**PCR endpoint e real time**) e il **sequenziamento** genico sono metodi **rapidi** utilizzati per l'identificazione di *Rickettsia* spp. in campioni umani e animali, comprese zecche e altri artropodi
- **sensibili e specifici**
- permettono di arrivare all'identificazione di specie
- sangue intero, buffy coat, **biopsie cutanee** e di **escare**, tamponi cutanei (escare), **biopsie d'organo**, liquido cerebrospinale, liquido pleurico
- in assenza di malattia avanzata o infezioni fulminanti, **nel sangue circolano un basso numero di rickettsie**
- in mancanza di altre matrici, la PCR si può effettuare anche su siero, plasma, tessuti inclusi in paraffina o materiale fissato su vetrino



Metodi biomolecolari - PCR

TABLE 3. DNA EXTRACTION METHODS

<i>Specimen</i>	<i>Method</i>	<i>Comments</i>
Blood (whole blood, buffy coat, plasma, and serum)	Commercial kits: DNeasy [®] Blood kit (Qiagen) or similar (manual or automated) ^a	High quality DNA Fast and reproducible Very expensive
Other body fluids (CSF, pleural fluid)	Commercial kits: QIAamp DNA kit (Qiagen) or similar (manual or automated) ^a	High quality DNA Fast and reproducible Very expensive
Skin or eschar biopsies, eschar swabs, and internal organs	Commercial kits: DNeasy Tissue kit (Qiagen) or similar (manual or automated) ^a	High quality DNA Fast and reproducible Very expensive
Ticks ^b /Hemolymph/Portion of a tick leg ^c	Commercial kits: DNeasy Tissue kit or similar (manual or automated) ^a	High quality DNA Fast and reproducible Very expensive
	Ammonium hydroxide	Fast and simple Low-cost method Many variations exist
	Phenol and chloroform	High-quality DNA Time-consuming Expensive Potentially health hazardous chemical Modified version with isothiocyanate

^aAutomated systems can be also used: MagCore nucleic acid extraction (MagCore), NucliSens Easymag (Biomerieux), or similar.

^bAdult ticks are individually processed (half specimen cut lengthwise), and nymphs and larvae are processed in pools (for prevalence studies).

^cOnly for tick identification studies (not for *Rickettsia* infection studies in ticks).

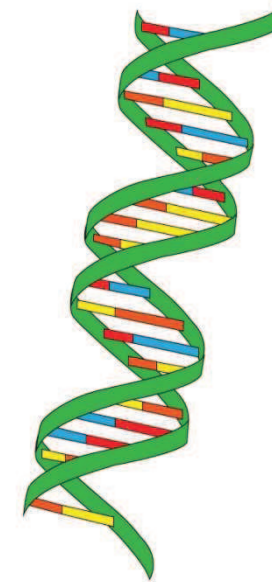
Da: Portillo *et al.*, 2017. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp.. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 17(1):23-32.



Metodi biomolecolari

Target utilizzati:

- gene 16S rRNA (*rrs*)
- 17-kDa protein (*htr*)
- citrate synthase (*gltA*)
- Surface cell antigen (*sca*) autotransporter family:
 - outer membrane proteins *ompA* e *ompB*
 - surface cell antigens *sca4* e *sca1*



l'argomento verrà trattato in un successivo modulo del corso



Coltivazione in vitro

- tecniche eseguibili solo in laboratori specializzati con livello 3 di biosicurezza (BSL-3)



campioni:

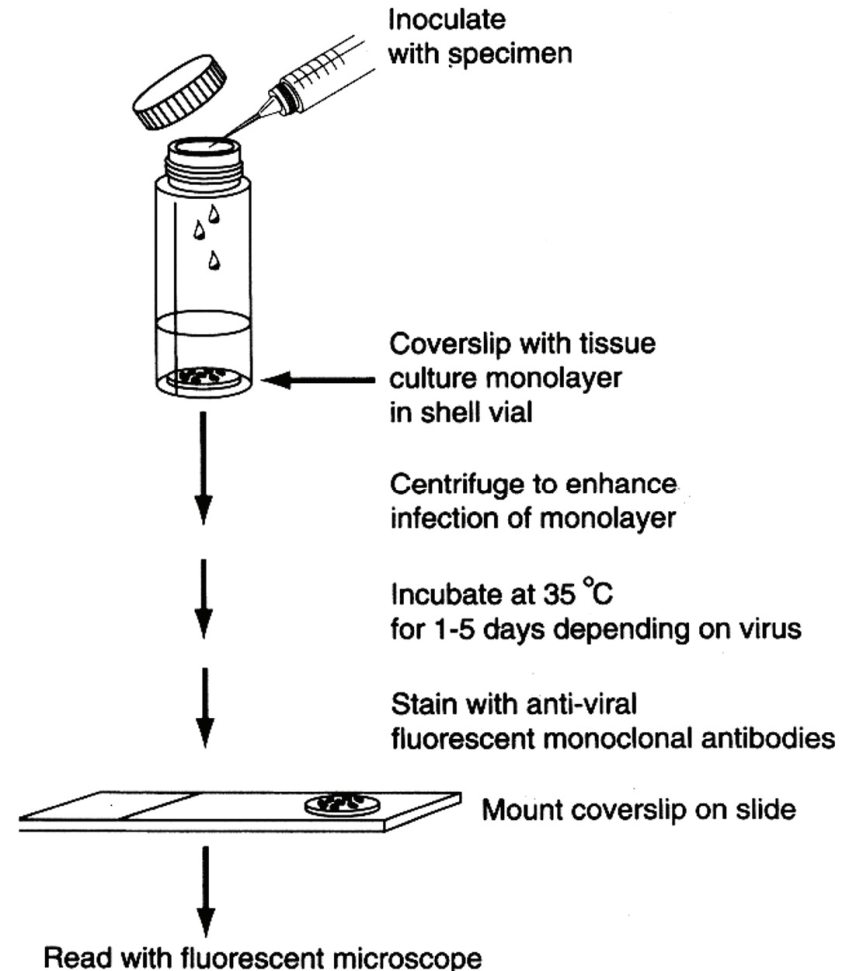
- campioni umani o animali compresi gli artropodi
- sangue, tamponi da escara, biopsie cutanee e fluidi sterili (es.CFS)
- i campioni vanno prelevati il più precocemente possibile e prima di iniziare la terapia antibiotica
- inoculare i campioni subito dopo il prelievo o congelare a -80°C per preservare la vitalità del microrganismo
- per il prelievo di sangue utilizzare sistemi chiusi tipo Vacutainer
- i campioni di cute/escara vanno preventivamente disinfettati per 10 min in etanolo 70% e poi sciacquati in acqua distillata sterile



Coltivazione in vitro

shell vial cell culture technique

- Utilizzata per le colture di virus, è stata adattata alle rickettsie
- Centrifugare a 700g x 45min-1h a 4°C
- Minimal essential medium+SFB
scomplementato 4%+glutamina 2 mM,
NO antibiotici
- Dopo centrifugazione sostituire il
surnatante con 1 ml di terreno fresco
- Incubare a 28-34°C (varia con la linea
cellulare utilizzata) \pm 5% CO₂
- Tempi di crescita da 3gg a settimane



Coltivazione in vitro

Coltura positiva:

- effetto citopatico
- colorazione di Giménez
- Immunofluorescenza

Se coltura shell vial è positiva:



- Inoculare in flask da 25 cm² per stabilizzare l'isolato

Identificazione *Rickettsia* sp.:

(Caratteristiche fenotipiche insufficienti)

- PCR + sequenziamento

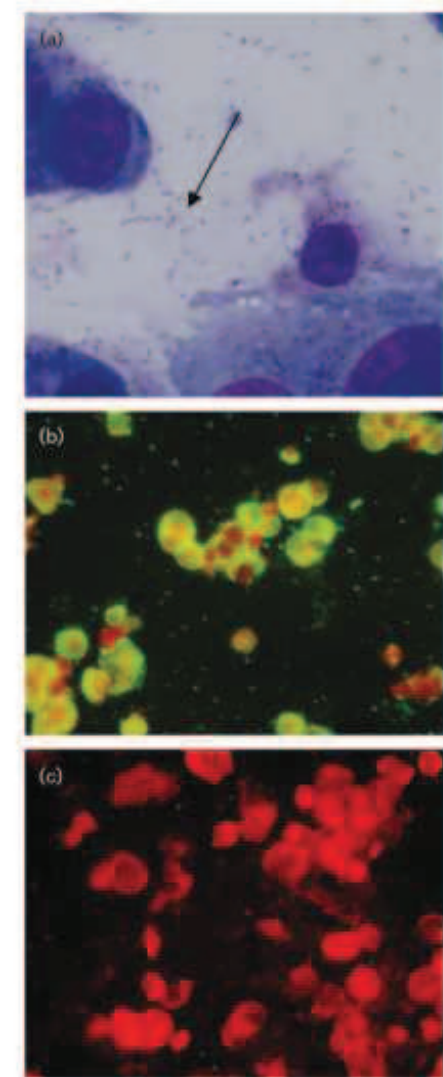


Fig. 1. Cultivation of *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov. in C6/38 and Vero E6 cells. (a) Small coccobacillary shape of the novel strain cultivated in Vero E6 cells viewed with light microscopy; (b) immunofluorescence of *R. hoogstraalii* sp. nov. antigen with *R. conorii* antibody-containing human sera, titre 1 : 80; (c) immunofluorescence negative control.

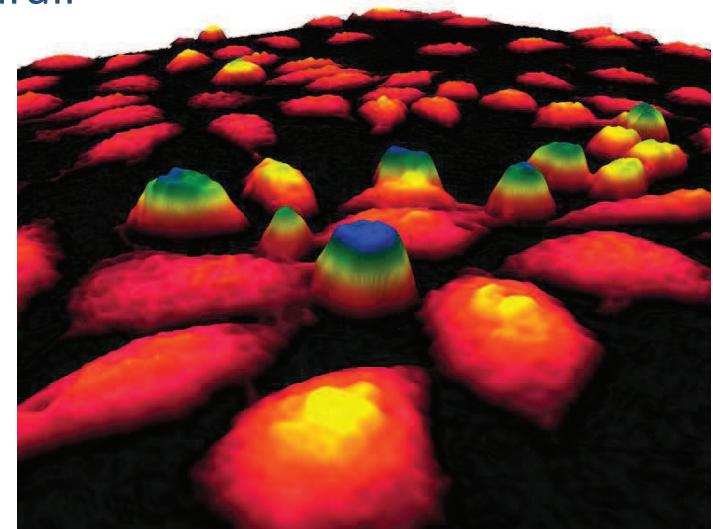
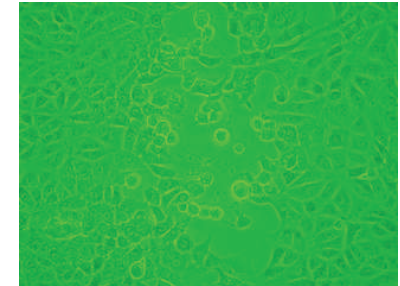
From Duh D. et al., 2010. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard and soft-bodied ticks. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 977–984



Coltivazione in vitro

Linee cellulari:

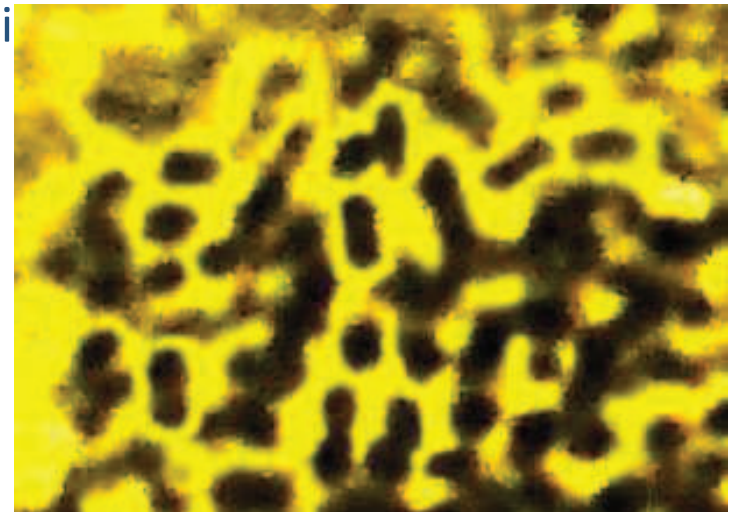
- cellule Vero
- L929
- linee cellulari da zecche (*Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus sanguineus*)
 - riproducono in parte le condizioni naturali
 - tempi lunghi
 - delicate
- Linee cellulari da zanzare (C6/36)



Coltivazione in vitro

l'isolamento in coltura pura:

- è un passaggio fondamentale per poter classificare una *Rickettsia* come nuova specie
- è importante per studiare sul patogeno la fisiologia, la descrizione genetica e la suscettibilità agli antibiotici
- è utile per migliorare gli strumenti diagnostici



Fossil rickettsia cells. These rickettsia-like cells are the first ever of their type found in fossil form, in 100-million-year old amber.
(Photo by George Poinar, Jr., courtesy of Oregon State University)



TABLE 5. COMMONLY USED AND POTENTIALLY USEFUL CELL LINES FOR *RICKETTSIA* spp.
ISOLATION AND CULTIVATION

Cell-line	Medium and supplementation	Culture conditions
VERO E6 (ATCC 1008) Type: Epithelial Origin: <i>Cercopithecus aethiops</i>	MEM 5–10% heat-inactivated FBS 2 mM L-glutamine, nonessential aminoacids	Cells grow as adherent monolayer Incubation at 37°C with or without 5% CO ₂ atmosphere
L929 (ATCC CCL-1) Type: Fibroblast Origin: <i>Mus musculus</i>	DMEM or MEM 5% or 2% ^a FBS 2 mM L-glutamine, nonessential aminoacids	Cells grow as adherent monolayer Incubation at 37°C with or without 5% CO ₂ atmosphere
HUVEC (ATCC CRL-1730 TM) Type: Endothelial Origin: Umbilical vein from human	Endothelial cell basal medium 10% or 5% ^a FBS 2 mM L-glutamine	Cells grow as adherent monolayer Incubation at 37°C with 5% CO ₂ atmosphere
XTC Type: Epithelial Origin: <i>Xenopus laevis</i>	Leibovitz medium L-15 5% or 2% ^a FBS 2% tryptose phosphate broth	Cells grow as adherent monolayer Incubation at 28°C without CO ₂ atmosphere
C6/36 (ATCC CRL-1660 TM) Type: Mosquito cell line Origin: <i>Aedes albopictus</i>	L-15 medium 5% FBS	Cells grow as adherent monolayer Incubation at 28°C with or without 5% CO ₂ atmosphere
ISE6 (ATCC CRL-11974) Type: Tick cell line Origin: <i>Ixodes scapularis</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 10% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow in loosely adhered layers Incubation at 32°C (at 34°C ^a) in sealed container, under normal atmospheric conditions
RML/RSE ^b Type: Tick cell line Origin: <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mixture of L-15 (Leibovitz) medium and MEM (Bell-Sakyi 2004) 15% FBS 20% Tryptose phosphate broth 2 mM L-glutamine	Cells grow in loosely adhered layers Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions
ANE 58 ^b Type: Tick cell line Origin: <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 5% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow predominantly in suspension Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions
DAE 100T ^b Type: Tick cell line Origin: <i>Dermacentor andersoni</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 5% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow predominantly in suspension Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions

(continued)

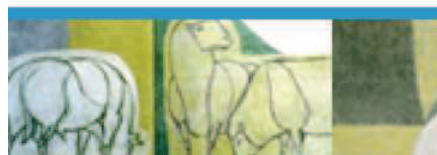


TABLE 5. (CONTINUED)

Cell-line	Medium and supplementation	Culture conditions
DAE 15^b Type: Tick cell line Origin: <i>D. andersoni</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 5% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow in loosely adhered layers Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions
DALBE 3^b Type: Tick cell line Origin: <i>Dermacentor</i> <i>albipictus</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 5% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow predominantly in suspension Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions
DVE 1^b Type: Tick cell line Origin: <i>Dermacentor</i> <i>variabilis</i> embryo derived	L-15B300 medium (Munderloh et al. 1999) 5% FBS 5% Tryptose phosphate broth 0.1% Bovine lipoprotein concentrate 2 mM L-glutamine Additional supplementation ^a : 0.1% NaHCO ₃ 10 mM HEPES Adjust to pH 7.5	Cells grow in loosely adhered layers Incubation at 28–32°C, in sealed container, under normal atmospheric conditions

^aFor isolation attempts and infected cell propagation.

^bAvailable from the Tick Cell Biobank, <http://tickcells.pirbright.ac.uk>

Uninfected cultures can be maintained with antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin).
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; MEM, minimum essential media.



gestione dei campioni per la ricerca di rickettsie

TABLE 2. PRESERVATION AND STORAGE OF SAMPLES FOR DETECTION OF *RICKETTSIA* SPP.
(AND FOR TICK IDENTIFICATION WHEN APPLICABLE)

<i>Specimen</i>	<i>Collection method</i>	<i>Time and transport temperature</i>	<i>Preservation</i>	<i>Microbiological assay</i>
Whole blood/buffy coat	EDTA or citrate tube (3–5 mL)	<24 h, 2–8°C	>24 h, at least –20°C	PCR
Whole blood/buffy coat	Heparin tube (3–5 mL)	>24 h, at least –20°C	To process immediately or freeze –80°C	Culture
Serum/plasma	Serum separator tube/ anticoagulant tube	>24 h, dry ice		
		<24 h, 2–8°C	>24 h, at least –20°C	IFA/PCR
Other body fluids (CSF, pleural fluid) (not preferred specimens)	Sterile tube	<24 h, 2–8°C	>24 h, at least –20°C	PCR
		>24 h, at least –20°C	To process immediately or freeze –80°C	Culture
Skin or eschar biopsy and autopsy organ tissue	Sterile tube	>24 h, at least –20°C	>24 h, at least –20°C	PCR
	Tissue should be sent dry	>24 h, dry ice	To process immediately or freeze –80°C	Culture
Eschar swab	Sterile tube. Swab should be sent dry	24–72 h, 2–8°C	2–8°C	PCR/culture
Tick	Tube	24–48 h, 2–8°C ^a	>48 h, at least –20°C	PCR/culture
		>48 h, at least –20°C	>48 h, at least –20°C	PCR/culture
		>48 h, 70%/absolute ethanol	>48 h, 70%/absolute ethanol	PCR
		>48 h, dry ice	To process immediately or freeze –80°C	PCR/culture
Formalin-fixed tissue paraffin-embedded tissue	Tube/cassette	Room temperature	Room temperature	PCR/IHC
Hemolymph	Slide	Immediately, Room temperature	Room temperature	PCR/stain

^aIf prevented from drying out, live ticks can be kept at 2–8°C for several days.

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PCR, polymerase chain reaction; CSF, cerebrospinal fluid; IFA, indirect immunofluorescence assay; IHC, immunohistochemical assay.

*scienze per
l'attenzione!*



Bibliografia consultata:

- Jensenius M, Fournier PF, Vene S, Ringertz SH, Myrvang B, Raoult D. Comparison of Immunofluorescence, Western Blotting, and Cross-Adsorption Assays for Diagnosis of African Tick Bite Fever. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July 2004, p. 786–788
- Portillo A. *et al.* Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Volume 17, Number 1, 2017
- Mancini F., Rezza G., Ciervo A. 2015. Le rickettsiosi in Italia: diagnosi e sorveglianza. *Not Ist Super Sanità*, 28(1):3-8
- La Scola, B., L. Rydkina, J. B. Ndiokubwayo, S. Vene, and D. Raoult. 2000. Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using crossadsorption and Western blotting. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:612–616.
- Mouffok N, Parola P, Raoult D . 2008. Murine typhus, Algeria. *Emerging Infect. Dis.* 14(4):676-8

