

Giornata di aggiornamento  
sulla Leishmaniosi  
Maria Renzi  
IZSLER Bologna

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
PADOVA (VENETO)

LA NOSTRA  
ESPERIENZA,  
LA VOSTRA  
SICUREZZA.

## AGGIORNAMENTO SUI TEST DIAGNOSTICI NEL CANE

17.01.2020  
Bologna

---

---

---

---

---

---

---

---

**Nelle aree endemiche per leishmaniosi canina, i test sierologici devono far parte dello screening di routine, ed ogni cane sottoposto a visita, deve essere considerato potenzialmente infetto fino a prova contraria.**

A. Blavier, S. Keroack, P. Denerolle, I. Goy-Thollot, L. Chabanne, J.L. Cadore, G. Bourdoiseau, 2001  
Atypical forms of canine Leishmaniosis . Vet. J.162.108.120

---

---

---

---

---

---

---

---

**Diagnosi Leishmania**

- La diagnosi di leishmaniosi si basa sulla valutazione di segni clinici e/o alterazioni clinico-patologiche compatibili con la patologia e sui risultati dei test di diagnostici. Questi ultimi comprendono metodi di diagnosi diretta, che permettono l'identificazione del parassita o di sue porzioni genomiche, e indiretta, che permettono di evidenziare gli anticorpi prodotti dall'organismo nei confronti dello stesso.

---

---

---

---

---

---

---

---



## Animale infetto o malato?

- È importante differenziare i cani "infetti ma clinicamente sani" da quelli "malati". In assenza di segni clinici e/o di alterazioni clinico-patologiche, è più preciso parlare di INFEZIONE, differenziandola dalla MALATTIA, condizione nella quale i segni clinici rilevati sono chiaramente attribuibili alla presenza del parassita.
- La differenziazione tra infezione e malattia è fondamentale, specialmente nelle zone endemiche, poiché un cane potrebbe, ad esempio, essere infetto (dimostrazione del parassita o della presenza di anticorpi) e presentare segni di malattia dovuti ad altre cause, infettive o non.

---

---

---

---

---

---

---

---



## Diagnosi : scopi

- confermare la patologia in cani malati,
- effettuare uno screening in soggetti clinicamente sani che vivono o hanno viaggiato in aree endemiche,
- escludere la presenza dell'infezione in cani donatori di sangue, riproduttori o in soggetti che dovranno essere vaccinati.

---

---

---

---

---

---

---

---



Fig. 7 APPROCCIO DIAGNOSTICO

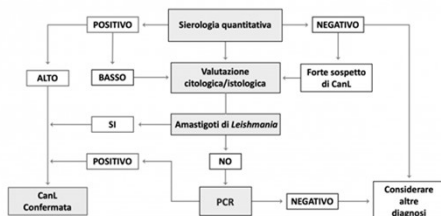


Diagramma per l'approccio diagnostico a cani, non vaccinati contro la CanL, con segni clinici e alterazioni clinico-patologiche suggestive della patologia. Modificato da: Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, et al. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. Parasites & vectors, 4(1), 86.

---

---

---

---

---

---

---

---



## TEST DIAGNOSTICO

- Un buon metodo diagnostico dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:
- - possedere alta sensibilità e specificità di genere e di specie;
- - essere di facile realizzazione;
- - permettere il riconoscimento e la distinzione tra infezioni recenti e di vecchia data;
- - individuare i soggetti portatori;
- - permettere di valutare l' esito della terapia

---

---

---

---

---

---

---



## DIAGNOSI LEISHMANIA

- Immunologica
  - Fissazione del complemento
  - Emoagglutinazione indiretta
  - Agglutinazione con latex
  - Agglutinazione diretta (DAT)
  - Immunofluorescenza indiretta ( IFAT)
- Elisa
- Western blot
- Osservazione citologica o istologica
- Isolamento e Coltura
- Metodi Molecolari
- (amplificazione/rilevazione del DNA di Leishmania)

---

---

---

---

---

---

---



## METODI VANTAGGI SVANTAGGI

- Sierologia (IFAT ed ELISA)
- Metodi molto sensibili . Buoni come test di Screening
- Possibili falsi negativi (infezioni precoci o con basso titolo)
- Poco costosi e semplici per il clinico (raccolta di sangue)
- Possibili falsi positivi (soggetti esposti ma titolo solitamente correlato ,non infetti realmente o infetti ma non malati)
- Non molto utili per il monitoraggio clinico.
- Scarsa ripetibilità e possibilità di confronto tra metodi, kit e laboratori differenti

---

---

---

---

---

---

---



## METODI SVANTAGGI VANTAGGI

- **Biologia molecolare**
- Molto sensibili e specifici se utilizzati su substrati adeguati ( es. midollo osseo, aspirato linfonodale)
- La presenza del parassita non deve essere considerata sinonimo di malattia
- Maggiori costi
- Maggiore difficoltà tecnica per ottenere campioni adeguati
- Quantità di parassita condizionata dalla qualità del campione raccolto

---

---

---

---

---

---

---



## OIE Terrestrial Manual 2018

- Serology is the preferred method for diagnosis of VL and CanL, even during the early stages of the disease. In subclinical forms, seropositive cases are confirmed by parasitological diagnosis or PCR.
- Of the several serological techniques available, the indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay are the most suitable. Crude antigens for serodiagnostic tests can be prepared in the laboratory from cultured parasites. Tests based on recombinant antigens may also be used and have a high specificity although can be less sensitive.

---

---

---

---

---

---

---



## Seroconversion

- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol 2002;18:399–405

Seroconversion may occur months following infection. For natural infection, the interval to seroconversion can range from 1 to 22 months (median, 5 months), and for experimental infection, it ranges from 1 to 6 months (median, 3 months).

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---


---

---

---

---

---



- La risposta viene espressa in titoli anticorpali di diluizione: il valore soglia per il sospetto di uno stato di infezione nel cane è considerato 1:40. Un animale con leishmaniosi può risultare debolmente positivo nelle fasi iniziali dell'infezione in cui può apparire anche del tutto asintomatico, o in forme evolute, in seguito all'instaurarsi di meccanismi di immunosoppressione, trattamento con cortisonici o con farmaci specifici es. antimoniali che comportano una drastica riduzione del titolo anticorpale.
- Titoli  $\geq 1:160$  a  $1:5120$  indicano un animale sicuramente infetto.

---

---

---


---

---

---

---

---



- Non c'è una proporzionalità diretta tra titolo sierologico e gravità della malattia e ancora tra titolo sierologico e tasso di immunoglobuline messe in evidenza dall'esame elettroforetico. **La valutazione del titolo anticorpale, come marker nel monitoraggio della terapia, risulta pertanto di scarso significato.**
- Si può riscontrare modificazioni del titolo sierologico in corso di terapia, negativizzazione al termine dei diversi cicli terapeutici e/o sieroconversione, indice precoce di malattia.

---

---

---

---

---

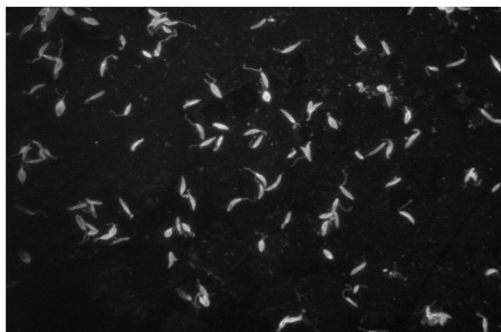
---

---

---



### LEISHMANIA IMMUNOFLUORESCENZA




---

---

---

---

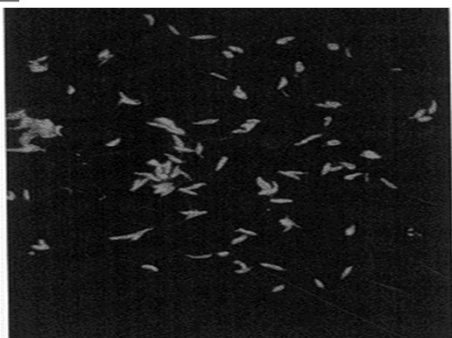
---

---

---



### LEISHMANIA IMMUNOFLUORESCENZA




---

---

---

---

---

---

---



- ULTERIORI STUDI HANNO RILEVATO CHE :
- SOLO NEI CANI DOVE L' INFESTAZIONE E' MASSIVA SI RILEVANO TITOLI ANTICORPALI ELEVATI E CHE TENDONO AD AUMENTARE NEL TEMPO
- IMPORTANZA DELLE REINFESTAZIONI
- IMPORTANZA DELLE CONCOMITANTI INFESTAZIONI MALATTIE TRASMESSE DA ZECCHIE ( es. EHRlichia CANIS )

---

---


---

---

---

---

---



**LEISHMANIA immunofluorescenza**  
campioni eseguiti  
lab. Sierologia Bologna

• anno 2009	8612	
• anno 2010	7074	
• anno 2011	6987	
• anno 2012	7207	
• anno 2013	7547	
• anno 2014	8150	
• anno 2015	8017	
• anno 2016	9256	
• anno 2017	9352	
• anno 2018	9935	
• Anno 2019	5672	ELISA dal 1/6/2019 4011

---

---

---

---

---

---

---

---



**ELISA LEISHMANIA**



---

---

---


---

---


---


---


---





**ELISA TEST**


  
Capture Antibody


  
Detector Antibody


  
Detection Conjugate


  
Target Protein


  
Sample matrix Protein

  
Pre-coated micro-well plate

  
Add sample or standards, incubate

  
Sample and standards are removed, add detector antibody, incubate, wash

  
Add detection conjugate, incubate, wash

  
Add detection substrates, incubate, read at OD 450 nm

---

---

---

---

---

---

---

---



## ELISA TEST

ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.



The yellow color indicates that the target protein is present. The higher degree of the color, the higher concentration of the target protein.

---

---

---

---

---

---

---

---



## LETTURA SPETTROFOTOMETRICA

- 450 nm




---

---

---

---

---

---

---

---



## ELISA LEISHMANIA

- Assorbanza (O.D.) blank, assorbanza C.-, C.+, media C.debole+(cut-off)
- Calcolo Units rapporto tra O.D campionex10/media controllo debole positivo
- Siero positivo Units> 11
- Siero non conclusivo/dubbio units 9-11
- Siero negativo units >9
- Positività espressa come valore di Units compreso in intervalli 12-15, 16-20, 21-25 26-30, 31-35,36-40, >40.

---

---

---

---


---

---

---

---




**OIE TERRESTRIAL MANUAL 2018**

- The ELISA is useful for the diagnosis of Old and New World leishmanioses. There is little or no cross-reaction with other diseases and, according to the *Leishmania* strain used, sensitivity can range from 86% to 99%.

---

---

---

---

---

---

---

**Grazie per l'attenzione**

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA CONSIGLIERIA E DELL'UNIVERSITÀ ROMANA  
"LA SAPIENZA"

LA NOSTRA  
ESPERIENZA,  
LA VOSTRA  
SICUREZZA.



---

---

---

---

---

---

---