

IMMUNOMIGRAZIONE NELLA DIAGNOSI SIEROLOGICA DELLA LEISHMANIOSI CANINA: PROVA COMPARATIVA CON L'IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

G. RIVÒ*, M. POGGI*, W. MIGNONE**, F. MANCIANTI***

*Libero Professionista Imperia - Centro Veterinario Imperiese - Via Armelio, 10 Imperia

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta - Sezione di Imperia - Via Nizza, 5 Imperia

***Università di Pisa, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti - Via delle piaggie - Pisa

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare la possibilità di utilizzo di un test di immunomigrazione per la diagnosi sierologica della Leishmaniosi canina, trecento sieri di cani sono stati testati con questo metodo e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando il metodo dell'immunofluorescenza indiretta (IFAT).

La concordanza osservata tra i due metodi è 0,95 e il valore di $K=0,87$; al confronto con l'immunofluorescenza indiretta il test di immunomigrazione ha una sensibilità del 93% e una specificità del 97%.

Summary

The aim of this work is to verify the possibility of use of a immunomigration test for canine Leishmaniosis serological diagnosis, three hundred serum of dogs were tested with this method, comparing them to those obtained from indirect immunofluorescent antibody test (IFAT).

The results show an agreement of the two methods of 0.95 and value of $K=0.87$; compared with IFAT immunomigration test showed a sensibility of 93% and a specificity of 97%.

INTRODUZIONE

La Leishmaniosi canina è una antropozoonosi, diffusa in tutto il bacino del Mediterraneo; in Italia l'infezione è presente in maniera endemica, con prevalenze più o meno importanti, lungo tutte le coste e nelle isole¹⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻¹⁰, sempre più frequentemente la malattia viene diagnosticata in zone ritenute indenni sia in animali che hanno soggiornato nei periodi estivi con i proprietari in zone a rischio, sia in soggetti che non hanno effettuato migrazioni.

La sintomatologia pleomorfa che caratterizza questa malattia, pone al clinico non poche difficoltà diagnostiche, con rischi di sottovalutarla quando si opera in zone dove la malattia non è presente e di sopravvalutarla quando si opera in aree endemiche. I danni al sistema immunitario che la Leishmaniosi crea, la rendono una malattia polisistemica e la inseriscono tra le diagnosi differenziali di sindromi le più disparate⁷⁻¹¹.

L'indagine sierologica ha un posto di rilievo nell'iter diagnostico della Leishmaniosi canina accanto alle metodiche sierologiche tradizionali (immunofluorescenza indiretta, ELISA, western blotting)¹¹.

Negli ultimi anni sono state introdotte metodiche quali agglutinazione al latex⁹ e per ultima la immunomigrazione⁸, che si prestano per una diagnosi sierologica direttamente in ambulatorio in quanto non necessitano di particolari attrezzature né di personale particolarmente addestrato.

Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare i risultati ottenuti in ambulatorio con un test del commercio SpeedLeish[®]*, con quelli ottenuti con l'immunofluorescenza indiretta (IFAT).

* BVT Bio Veto Test Diagnostic Veterinaire.

MATERIALI E METODI

Questa prova comparativa è stata effettuata nel periodo compreso tra Settembre 1996-1997 su 300 sieri provenienti da soggetti di razze diverse di età compresa da 1 a 10 anni, tutti residenti in zone endemiche della Toscana e della Liguria⁶⁻¹³.

I campioni di siero ottenuti dai soggetti in esame venivano sottoposti ai test SpeedLeish[®] ed IFAT. Il test SpeedLeish[®], ha come principio la tecnica immunocromatografica è stato utilizzato secondo le indicazioni del produttore deponendo 40 microlitri di siero in esame nell'apposito pozzetto e subito dopo venivano deposte 5 gocce di diluente, la lettura veniva eseguita esclusivamente dopo 15'.

In presenza di due bande scure si considerava il campione positivo, in presenza della banda di controllo scura e della banda in esame non molto evidente si considerava il campione dubbio, alla presenza della sola banda di controllo si considerava il campione negativo (Fig. 1).



Risultato positivo



Risultato negativo



Risultato dubbio

FIGURA 1 - SpeedLeish: risultati di tre sieri rispettivamente positivo, negativo, dubbio.

Il test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) è stato allestito secondo Mancianti e Meciani², sono stati usati i seguenti reagenti:

- 1) Phosphate Buffered Saline pH 7,3 ± 1
- 2) Vetrino per immunofluorescenza indiretta adsorbito con antigene *Leishmania infantum*
- 3) Coniugato FITC per immunofluorescenza indiretta anti-canine IgG
- 4) Glicerina
- 5) Siero di sangue canino positivo all'immunofluorescenza indiretta per Leishmaniosi
- 6) Siero di sangue canino negativo all'immunofluorescenza indiretta per Leishmaniosi.

La procedura operativa è stata la seguente: il siero in esame, diluito per raddoppio in base dieci, viene posto a contatto con l'antigene a 37°C in camera umida per 30', dopo il lavaggio si aggiunge un'antiglobulina specifica coniugata con isotiocianato di fluorescina, dopo ulteriore incubazione a 37°C in camera umida per 30' i vetrini vengono lavati e montati con glicerina e osservati con microscopio a fluorescenza; i sieri positivi conferiscono una netta fluorescenza ai promastigoti e al flagello (Fig. 2).

RISULTATI

Nella Tabella 1 vengono rappresentati i risultati ottenuti con l'immunomigrazione e l'IFAT. Sono stati considerati positivi all'immunofluorescenza indiretta titoli maggiori di 1/80¹⁴ con la metodica di immunomigrazione sono stati considerati positivi solo i campioni che presentavano una netta banda e sono stati considerati negativi i campioni dubbi.

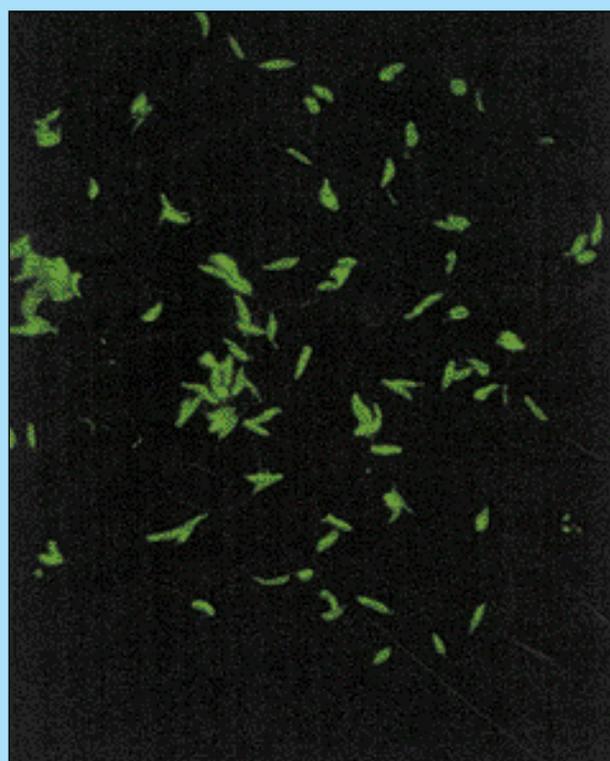


FIGURA 2 - Microscopio a fluorescenza; promastigoti che hanno reagito con siero positivo (fluorescenza di corpo e flagello).

Tabella 1

Tabella 2

		IFAT	
		+	-
Speed-Leish	+	117	6
	-	9	168

$$\text{Accuratezza diagnostica} = \frac{\text{Veri positivi} + \text{Veri negativi}}{\text{N}^\circ \text{ totale casi}}$$

$$\text{Accuratezza diagnostica} = \text{Concordanza osservata}$$

$$\text{Concordanza} = \frac{117 + 168}{300} = 0,95 = 95 \%$$

Calcolo del K rapporto fra concordanza osservata sottratta della concordanza casuale e concordanza massima possibile oltre il livello di casualità.
Proporzione di concordanza casuale per i test positivi
 $(0,42 \times 0,41 = 0,172)$
 IFAT $117+9/300 = 0,42$ SPEEDLEISH® $117+6/300 = 0,41$
Proporzione di concordanza casuale per i test negativi
 $(0,58 \times 0,59 = 0,342)$
 IFAT $168+6/300 = 0,58$ SPEEDLEISH® $168+9/300 = 0,59$
 Concordanza casuale totale $0,172+0,342 = 0,514$
 Concordanza osservata meno concordanza casuale
 $0,95 - 0,514 = 0,436$
 Concordanza massima possibile oltre il livello di casualità $1 - 0,5 = 0,5$
 $K = 0,436 / 0,5 = 0,87$

La concordanza osservata è risultata 0,95 è stato calcolato il valore di K, rapporto fra concordanza osservata sottratta della concordanza casuale e concordanza massima possibile oltre il livello di casualità, risultato di 0,87 (Tab. 2).

È stata inoltre calcolata la sensibilità e la specificità, paragonando i risultati della tecnica di immunomigrazione con quelli ottenuti dall'IFAT, risultate rispettivamente 93% e 97% (Tab. 3).

Tabella 3

		IFAT	
		+	-
Speed-Leish	+	117	6
	-	9	168

$$\text{Sensibilità} = \frac{\text{Veri positivi}}{\text{Veri positivi} + \text{Falsi negativi}} = \frac{117}{117 + 9} = 0,93 = 93\%$$

$$\text{Specificità} = \frac{\text{Veri negativi}}{\text{Veri negativi} + \text{Falsi positivi}} = \frac{168}{168 + 6} = 0,97 = 97\%$$

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti da questa prova comparativa in accordo con altri autori⁸ hanno rilevato una buona affidabilità di tale test che associa alla facilità la rapidità di esecuzione, tali caratteristiche lo portano ad essere un ausilio diagnostico importante per il veterinario pratico, che necessita di risposte rapide, che verranno supportate dalla conferma data dai Laboratori specializzati, dove viene eseguita la metodica di immunofluorescenza indiretta.

A nostro avviso le risposte dubbie del test di immunomigrazione necessitano ulteriori approfondimenti da parte del produttore del test perché possono creare dubbi a operatori poco esperti; nella nostra esperienza si sono verificate prevalentemente su soggetti risultati poi negativi all'immunofluorescenza. Tali risposte potrebbero essere dovute a reazioni crociate per altri agenti eziologici, questo fenomeno il produttore sostiene essere comune su sieri provenienti da zone dove la Leishmaniosi è endemica¹².

Parole chiave

Leishmaniosi, cane, immunomigrazione, immunofluorescenza indiretta.

Key words

Leishmaniosis, dog, immunomigration, immunofluorescent antibody test.

Bibliografia

1. Gradoni L., Pozio E., Bettini S., Gramiccia M. (1980) - Leishmaniasis in Tuscany (Italy). III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. - Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 421-422.

2. Mancianti F., Meciani N. (1988) - Specific serodiagnosis of canine Leishmaniasis by indirect immunofluorescence indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. - *Am. J. Vet. Res.* 49, 8 - 1409-1412
3. Mancianti F., Gradoni L., Gramiccia M., Pieri S., Marconcini A. (1986) - Canine Leishmaniasis in the Isle of Elba Italy. - *Trop. Med. Parasitol.* 37, 110-112.
4. Marty P., Le Fichoux Y. (1988) - Epidemiologie de la Leishmaniosis dans le Sud de la France. - *Rev. Med. Vet. Suppl n. 5 Vol 23*, 9-15.
5. Marty P., Ozon C., Rahal A., Gari-Toussaint M., Lelièvre A., Izri M.A., Haas P., Le Fichoux Y. (1994) - Leishmaniose dans les Alpes Maritimes, caractéristique épidémiologiques actuelles - *Médecine et Armées* 22, 1 - 29-32.
6. Mignone W., Poggi M., Mancianti F. (1991) - Aspetti recenti della Leishmaniosi canina nella riviera ligure di ponente: indagine epidemiologica nei canili della provincia di Imperia. - *Il Prog. Vet.* n° 23, 790-792.
7. Oliva G., Cortese L., Ciaramella P., R. DeLuna. (1996) - Trattamento terapeutico della Leishmaniosi del cane - *Veterinaria* 3, 115-127.
8. Lamothe J. (1997) - Evaluation d'un test immunologique pour le diagnostic de la Leishmaniose canine. - *Proceeding of the 1st World Congress on Leishmaniosis 5-9 May Istanbul - Turkey.*
9. Rivò G., Mignone W., Poggi M. (1994) - Utilizzo di un test di agglutinazione al latex per la diagnosi sierologica di leishmaniosi canina. *Veterinaria* 1, 107-110
10. Scarlata F., Infantino D., Giordano S., Cascio A. (1992) - Monitoraggio della Leishmaniosi viscerale in Sicilia nel biennio 1990-1991. - *Parassitologia* 34 suppl. 1.
11. *La Leishmaniosi Canina: Quaderni di Veterinaria - SCIVAC 1989.*
12. Papierok G. BTV Hyeres Francia - Comunicazione personale.
13. Mancianti F., Marconcini A., Ceccanti G., Bisaro B., - Leishmaniosi canina nella bassa val di Cornia (Livorno). *Ann. Fac. Med. Vet., Pisa.* Vol. XXXVIII, 325 - 329, 1985.
14. Osservatorio epidemiologico regione Liguria; Settore Veterinario. - Piano di monitoraggio Leishmaniosi canina 1994-1995.