

IDENTIFICAZIONE DIRETTA DI *EHRlichia canis* MEDIANTE UNA METODICA PCR-RFLP

BARBARA DI MARTINO, ILARIA MERIDIANI, FULVIO MARSILIO

Dipartimento di Scienze Biomediche Comparete - Università degli Studi di Teramo - Piazza A. Moro, 45 - 64100 Teramo

PAOLO BIANCIARDI

Medico Veterinario, Libero Professionista - Via dell'Usignolo - 20147 Milano

Riassunto

Centododici campioni di sangue provenienti da cani che presentavano sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi monocitica canina sono stati esaminati tramite una tecnica di PCR-RFLP basata sul gene della citrato sintetasi (*glta*) e un test di immunofluorescenza indiretta (IFI), entrambi specifici per *Ehrlichia canis*. Per verificare la presenza di altre specie ehrlichiali, tutti i campioni sono stati analizzati mediante una metodica di PCR in grado di amplificare il gene 16S rRNA delle specie appartenenti alla fam. *Anaplasmataceae*.

Dei n° 112 campioni in esame, il DNA di *E. canis* è stato evidenziato soltanto nel sangue di tre cani. Tutti i prodotti di PCR ottenuti sono stati sequenziati e identificati come specifici dei geni *glta* e 16S rRNA di *E. canis*. L'indagine sierologica ha evidenziato la presenza di anticorpi rivolti nei confronti di *E. canis* in 16 sieri (14,00%).

Summary

One hundred and twelve blood samples from dogs with symptoms related to canine monocytic ehrlichiosis were examined by citrate synthase gene (*glta*) PCR-RFLP and indirect immunofluorescent assay (IFA), both specific for *Ehrlichia canis*. All samples were also screened by PCR able to amplify the 16S rRNA of the species belonging to the family *Anaplasmataceae*.

E. canis DNA was detected in the blood of 3 dogs. The amplicons were sequenced and identified as specific for *glta* and 16S rRNA genes of *E. canis*. Sixteen sera (14.00%) were positive to IFA test.

INTRODUZIONE

L'ehrlichiosi è una malattia infettiva trasmessa da zecche che colpisce i mammiferi domestici e selvatici, uomo compreso (Tab. 1) causata da batteri intracellulari obbligati Gram-negativi appartenenti alla famiglia *Anaplasmataceae*¹.

Per molti anni *Ehrlichia canis*, agente eziologico dell'ehrlichiosi monocitica canina (CME), è stata considerata la principale specie nota come causa di malattia nel cane^{2,3}. Tuttavia, l'utilizzo sempre più frequente delle tecniche molecolari ha permesso di ottenere informazioni più precise sulla recettività naturale del cane anche ad infezioni sostenute da altre specie quali *Anaplasma platys*, *A. phagocytophila* comb. nov., *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, giustificando la preoccupazione circa il potenziale ruolo del cane quale *reservoir* di zoonosi⁴.

La CME viene di solito diagnosticata sulla base dei riscontri emato-clinici e dei risultati di test specifici per *E. canis*³.

L'approccio diagnostico comunemente impiegato in laboratorio per il riconoscimento delle infezioni ehrlichiali si avvale dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzata per la diagnosi sierologica e della reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'identificazione di frammenti genomici specifici del patogeno, nella maggior parte dei casi inclusi nel gene 16S rRNA^{5,6,7}. Entrambe le metodiche pur essendo dotate di elevata sensibilità, presentano dei limiti attribuibili alla stretta correlazione genotipica e fenotipica esistente tra le diverse specie ehrlichiali che rendono difficoltoso il raggiungimento di una diagnosi eziologica di certezza⁸.

In un recente studio⁷ l'analisi sequenziale del gene della citrato sintetasi (*glta*) di tredici diverse specie ehrlichiali ha mostrato variazioni nucleotidiche e differenze aminoacidiche maggiori rispetto a quelle riscontrate sul gene 16S rRNA tali da permettere una migliore differenziazione tra le specie ehrlichiali.

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 19/3/2004 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 2/9/2004”.

Tabella 1
Infezioni sostenute dalle specie incluse nel genere *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*

Agente eziologico	Malattia	Principale specie recettiva
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehrlichiosi monocitica canina	Canidi
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiosi monocitica umana	Uomo
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Ehrlichiosi granulocitaria	Cane, uomo
<i>Cowdria ruminantium</i>	Heart-water disease	Ruminanti selvatici
<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopenia ciclica infettiva	Cane
<i>Anaplasma phagocytophila</i> comb. nov.	Ehrlichiosi granulocitaria	Uomo, cane, cavallo
<i>Anaplasma bovis</i>	Ehrlichiosi monocitica bovina	Bovino
<i>Anaplasma centrale</i> , <i>marginalis</i> e <i>ovis</i>	Anaplasmosi	Ruminanti domestici e selvatici
<i>Neorickettsia risticii</i>	Potomac horse fever	Cavallo
<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Sennetsu fever	Uomo
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Salmon poisoning disease	Cane

In Italia le indagini biomolecolari condotte finora, hanno rivelato il ruolo di *A. platys* quale patogeno responsabile di infezione ehrlichiale nel cane⁹ e la presenza di *A. phagocytophila* comb. nov. nelle zecche del genere *Ixodes* spp.¹⁰. Per quanto riguarda l'infezione sostenuta da *E. canis*, gli studi sieroepidemiologici eseguiti in proposito^{11,12} suggeriscono la presenza di quest'ultima sul territorio, anche se non vi sono segnalazioni basate su evidenze microbiologiche (colture) o molecolari (PCR).

Nella presente nota viene descritto l'allestimento di una tecnica di PCR-RFLP specifica per il gene *gltA*, in grado di differenziare l'infezione da *E. canis* da quelle sostenute da *E. chaffeensis*, *A. phagocytophila* comb. nov., *A. platys* e *N. risticii*; ed inoltre, vengono riportati i risultati di un'indagine condotta su campioni di sangue provenienti da n° 112 cani con sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi.

MATERIALI E METODI

a) Linea cellulare e ceppo di *E. canis*

È stato utilizzato il ceppo Oklahoma di *E. canis* fatto crescere sulla linea cellulare macrofagica di origine canina DH82, entrambi gentilmente forniti dal Dott. W.L. Nicholson (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta).

b) Campioni

Nel periodo compreso tra aprile e dicembre 2003 sono stati esaminati complessivamente n° 112 campioni di sangue provenienti da cani che presentavano sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi. Il sospetto clinico veniva avanzato ogni qualvolta il veterinario visitava un animale che presentava fenomeni emorragici quali epistassi e petecchie sulle mucose apparenti, linfadenomegalia, splenomegalia e sintomi neurologici come atassia e paraparesi.

La raccolta dei campioni è stata eseguita presso alcuni canili e ambulatori privati delle provincie di Isernia, Caserta, Frosinone e Teramo.

Al momento del prelievo, per ogni soggetto in esame è stata compilata una scheda di rilevamento anamnestica

con informazioni relative all'ambiente in cui viveva l'animale, alla sintomatologia in atto e ad eventuali trattamenti antibiotici specifici per ehrlichiosi.

I campioni di sangue sono stati collezionati in apposite provette trattate con EDTA, mantenuti durante il trasporto al laboratorio a temperatura di +4°C ed ivi giunti, sono stati sottoposti a centrifugazione a 1500 rpm per 15'. Il plasma è stato conservato in provette e l'anello del *buffy coat* è stato raccolto e lavato due volte in soluzione fisiologica sterile. Al termine dei lavaggi il pellet è stato risospeso in 1 ml di PBS sterile e quindi immediatamente utilizzato per i tentativi d'isolamento oppure conservato a -80°C fino al momento dell'esecuzione dei test biomolecolari.

c) Estrazione degli acidi nucleici

Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato impiegato il kit *DNeasy tissue* (Qiagen). La metodica utilizzata è quella consigliata dalla Ditta Produttrice.

In breve, il *buffy coat* ottenuto da ciascun campione di sangue è stato raccolto in provette *nucleasi-free* e quindi dapprima sottoposto a trattamento con proteinasi K addizionata del Buffer AR e successivamente trasferito all'interno di un'apposita colonnina provvista di una membrana al silicio in grado di legare selettivamente gli acidi nucleici. I contaminanti e gli inibitori enzimatici eventualmente presenti, sono stati allontanati lavando la membrana con i tamponi AW1 e AW2 e infine il DNA estratto è stato eluito in 100 µl di tampone AE.

d) PCR-RFLP specifica per *Ehrlichia canis*

La sequenza *target* scelta per l'amplificazione è un segmento di 510 bp incluso nel gene *gltA*⁷. La regione genomica bersaglio è stata selezionata sulla base dei risultati ottenuti dall'allineamento delle sequenze nucleotidiche del gene *gltA* delle diverse specie di *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp. pubblicate sul database Genbank attraverso l'utilizzo del programma CLUSTALW¹³. I primers specifici per *E. canis* sono stati disegnati usando il software Primer3 (www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

La reazione di amplificazione è stata allestita in 50 µl di volume totale contenente DNA batterico nella quantità di 3 µl, Buffer 10X, 200 µM di ogni base azotata, 1,25 U di enzima HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf) e 10 pmol di ciascun primer *ECF* 5'- CAG GAG TAT ATG CCT CCT GA - 3' (nucleotidi 522-541) ed *ECR* 5'- GTT ACT TGG TTT TTC AAT TGC C - 3' (nucleotidi 1010-1031). Il prodotto di amplificazione è stato ottenuto con 35 cicli di denaturazione a 94°C per 45 secondi, annealing a 56°C per 45 secondi ed estensione a 72°C per 45 secondi. La fase finale di estensione è stata realizzata a 72°C per 5 minuti. La visualizzazione dell'amplificato è avvenuta mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2%, colorazione in etidio bromuro e illuminazione con luce UV.

L'ulteriore identificazione di specie dei campioni positivi per *E. canis* è stata eseguita attraverso l'analisi di restrizione dei prodotti di amplificazione con l'enzima *HindIII* (Biolabs, New England), il quale riconoscendo selettivamente la sequenza A↓AGCTT in posizione nucleotidica 841-846, è in grado di tagliare l'amplificato positivo per *E. canis* in due frammenti rispettivamente di 310 bp e 200 bp, differenziando quest'ultima da tutte le altre specie. La specificità di taglio di *HindIII* è stata determinata analizzando le sequenze del gene *gltA* delle diverse specie ehrlichiali disponibili in Genbank attraverso il programma Webcutter 2.0 (www.firstmarket.com/cutter/cut2.html). La digestione enzimatica è avvenuta attraverso incubazione per 2 h a 37 °C in un volume totale di 20 µl contenente Buffer 10X, 2000 ng del prodotto di PCR e 1 U di enzima *HindIII*.

I prodotti digeriti sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 3% (Applied Biosystem), colorazione in etidio bromuro e visualizzazione al transilluminatore UV.

La sensibilità della metodica di PCR è stata valutata eseguendo delle diluizioni scalari in base 10 di un estratto di DNA proveniente dal ceppo Oklahoma di *E. canis* (concentrazione iniziale di 36 ng/µl). Ogni diluizione è stata quantificata allo spettrofotometro e sottoposta dapprima a PCR e successivamente a RFLP con l'enzima *HindIII*. La sensibilità è stata determinata come la più alta diluizione in grado di fornire un amplificato visibile al transilluminatore.

La tecnica di PCR-RFLP è stata quindi applicata su n° 112 campioni, includendo in ciascuna prova un controllo negativo costituito da un estratto di DNA ottenuto da cellule DH82 non infette ed un controllo positivo rappresentato da un estratto di DNA del ceppo Oklahoma di *E. canis*.

Al fine di confermare la validità della metodica i prodotti di amplificazione sono stati purificati e sequenziati (*Genome Express; Labo Grenoble*). Le sequenze sono state confrontate con analoghe sequenze presenti in Genbank (*E. canis* ceppo Oklahoma Af304143, *E. chaffeensis* ceppo Arkansas Af304142, *A. phagocytophila* ceppo 1602 Af304138, *E. equi* ceppo MRK Af304137, HGE agent Af304136, *A. platys* ceppo Okinawa AY077620, *N. risticii* Af304147) attraverso il programma BLAST 2.1 [National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>] e analizzate con i softwares DAMBE¹⁴ e MEGA¹⁵.

e) PCR famiglia-specifica

Per l'identificazione delle specie appartenenti alla fam. *Anaplasmataceae* è stata impegnata la coppia di primers generici *EHR16SD* (5' – GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC – 3') e *EHR16SR* (5' – TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC – 3') in grado di amplificare un frammento di 345 bp incluso nel gene 16S rRNA delle seguenti specie: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *Cowdria ruminantum*, *Anaplasma phagocytophila* comb. nov., *A. platys*, *A. marginale*, *A. centrale*, *Wolbachia pipientis*, *E. sennetsu*, *Neorickettsia risticii* e *Neorickettsia helminthoeca*¹⁶. La metodica è stata applicata su n° 112 campioni in esame, includendo in ciascuna prova un controllo negativo costituito da un estratto di DNA ottenuto da cellule DH82 non infette ed un controllo positivo costituito da un estratto di DNA del ceppo Oklahoma di *E. canis*. I prodotti di amplificazione ottenuti, sono stati purificati, sequenziati (*Genome Express; Labo Grenoble*) e analizzati con i programmi BLAST 2.1, DAMBE e MEGA.

f) Indagine sierologica

Tutti i campioni in esame sono stati sottoposti ad indagine sierologica attraverso l'applicazione di un test di immunofluorescenza indiretta (IFI) allestito presso il nostro laboratorio. Per l'esecuzione della prova sono stati impiegati vetrini multispot a 10 pozzetti (Slide for Immunofluorescence Test, *Biomerieux*) contenenti cellule DH82 infettate con il ceppo Oklahoma di *E. canis*. Per la preparazione dell'antigene, le cellule sono state infettate in fiasche da 25 cm² e dopo 72 ore di incubazione il surnatante, contenente le cellule infette è stato raccolto e centrifugato a 900 rpm per 5'. Il pellet cellulare così ottenuto è stato risospeso in PBS e quindi distribuito nei pozzetti. I vetrini sono stati asciugati in termostato, fissati in acetone freddo e conservati a -20°C fino al momento dell'uso. I sieri sono stati diluiti per raddoppio partendo da una diluizione iniziale di 1:80 e quindi messi a contatto con l'antigene a 37°C per 30'; successivamente, il vetrino è stato sottoposto a quattro lavaggi in PBS ed infine sono state aggiunte le anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina (*Sigma-Aldrich Co*). L'osservazione al microscopio a luce ultravioletta di una fluorescenza verde granulare nel citoplasma è stata considerata come reazione positiva. In ciascuna prova sono stati inseriti un siero di controllo negativo ed un siero di controllo positivo entrambi precedentemente testati con vetrini del commercio (*Ehrlichia canis* Antigen Substrate Slide, *Medical Service*).

I campioni risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-*E. canis* sono stati sottoposti ad indagine sierologica anche nei confronti di *A. phagocytophila* comb. nov e *Rickettsia rickettsii* mediante IFI utilizzando vetrini del commercio (*Ehrlichia equi* Antigen Substrate Slide, *Rickettsia rickettsii* Antigen Substrate Slide, *Medical Service*). La metodica è stata eseguita applicando lo stesso protocollo adottato per l'evidenziazione di anticorpi anti-*E. canis*. Il limite minimo di positività è stato considerato il valore di 1:80.

g) Isolamento su cellule DH82

Le prove di isolamento di *E. canis* sono state effettuate a partire da n° 3 campioni risultati positivi ad entrambe le metodiche di PCR impiegate nell'indagine molecolare.

Sono stati utilizzati monostrati di cellule DH82 fatti sviluppare in D-MEM con il 10% di siero fetale bovino. Il *buffy coat* di ciascun campione è stato inoculato su cellule di 72 h sviluppate su piastre a sei pozzetti e quindi incubate a 37°C in presenza del 5% di CO₂.

L'infettività è stata monitorata ad intervalli di tre giorni e per un tempo complessivo di cinque settimane attraverso sia il test IFI utilizzando un siero di cane monospecifico per *E. canis*, sia la colorazione di Dif-Quik per l'evidenziazione delle morule.

RISULTATI

Nella tabella 2 sono riportati i risultati riassuntivi delle metodiche di laboratorio applicate su n° 112 campioni di sangue provenienti da cani con sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi. La tecnica di PCR-RFLP da noi allestita, ha prodotto secondo quanto atteso, un amplificato di 510 bp successivamente digerito con l'endonucleasi di restrizione *HindIII* in due segmenti di 310 e 200 bp. L'applicazione della metodica ha permesso di evidenziare il DNA di *E. canis* in n° 3 campioni di sangue (29/03; 52/03; 104/03); gli amplificati PCR dopo analisi di restrizione hanno generato lo stesso *pattern* di digestione del ceppo Oklahoma di *E. canis* (Fig. 1). Inoltre, l'analisi delle sequenze ha mostrato nel gene *gltA* una similarità del 100% tra i ceppi di *E. canis* identificati e il ceppo Oklahoma (AF304143). La PCR realizzata con la coppia di primers generici EH16S/EH16R e finalizzata all'identificazione di un frammento genomico comune a tutte le specie appartenenti alla fam. *Anaplasmataceae* ha fornito esito positivo su n° 3 campioni di sangue (29/03; 52/03; 104/03) con risultati analoghi a quelli ottenuti mediante PCR-RFLP. L'amplificato PCR, secondo quanto atteso, è risultato pari a 345 bp (Fig. 2). Il successivo sequenziamento ha mostrato che tra i prodotti amplificati esiste un'omologia del 100% sia a livello nucleotidico che aminoacidico; inoltre, attraverso il confronto con le sequenze 16S rRNA delle diverse specie ehrlichiali disponibili sul database, è stata verificata l'appartenenza delle tre sequenze amplificate alla specie *E. canis*. Non sono state rilevate positività attribuibili ad infezioni sostenute da altre specie ehrlichiali.

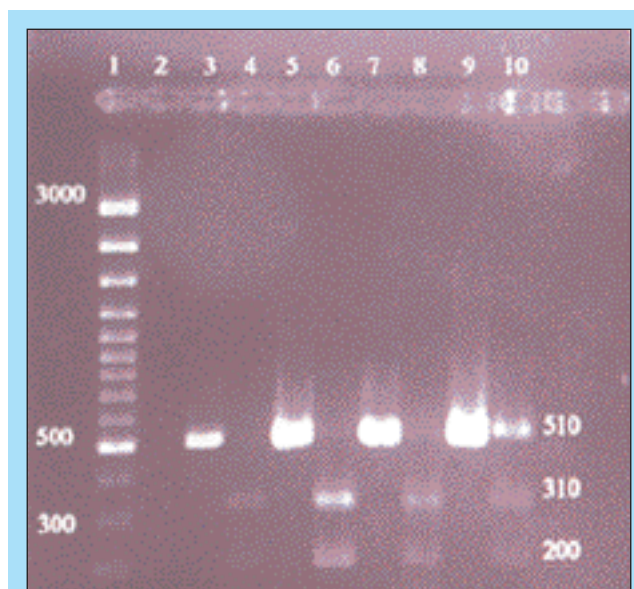


FIGURA 1 - PCR-RFLP specifica per *E. canis*.

Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas GmbH, Germania).

Corsia 2: controllo negativo (DH82 non infette).

Corsia 3: PCR campione n° 29/03 (510 bp).

Corsia 4: Pattern di restrizione di *E. canis* del n° 29/03 (310 bp e 200 bp).

Corsia 5: PCR campione n° 52/03 (510 bp).

Corsia 6: Pattern di restrizione di *E. canis* del n° 52/03 (310 bp e 200 bp).

Corsia 7: PCR campione n° 104/03 (510 bp).

Corsia 8: Pattern di restrizione di *E. canis* del n° 104/03 (310 bp e 200 bp).

Corsia 9: PCR controllo positivo (DH82 infettate con *E. canis* ceppo Oklahoma) (510 bp).

Corsia 10: Pattern di restrizione di *E. canis* ceppo (310 bp e 200 bp).

Relativamente all'indagine sierologica, dei n° 112 sieri esaminati, n° 14 sono risultati positivi al test IFI (Fig. 3) con titoli anticorpali compresi tra 1:5000 e 1:80000; in n° 2 casi si sono riscontrati valori pari a 1:1280 (20/03 e 26/03) (Tab. 2).

Nei tre animali in cui le metodiche di PCR hanno fornito esito positivo, sono stati rilevati titoli di 1:10000.

Per verificare la specificità della risposta anticorpale nei confronti di *E. canis*, i n° 16 campioni sono stati sottoposti anche ad indagini sierologiche per *A. phagocytophila* comb. nov. e *R. rickettsii*. Nella tabella 3 è riportata la distribuzione dei risultati di positività in base al titolo di IgG riscontrate mediante le tre prove di IFI. In particolare, i risultati ottenuti hanno dimostrato l'assenza di anticorpi anti-*A. phagocytophila* comb. nov. in tutti i campioni in esame (0/16), mentre sono stati evidenziati anticorpi anti-*R.*

Tabella 2
Risultati delle metodiche di laboratorio applicate su campioni di sangue provenienti da cani con sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi

N° campioni	PCR-RFLP <i>E. canis</i>		IFI <i>E. canis</i>		PCR famiglia-specifica	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
112	3 (2,67%)	109 (97,32%)	16 (14,28%)	96 (85,71%)	3 (2,67%)	109 (97,32%)

Legenda: N°: numero campioni in esame; PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism; IFI: Immunofluorescenza Indiretta; PCR: Polymerase Chain Reaction; Pos: campioni positivi; Neg: campioni negativi.

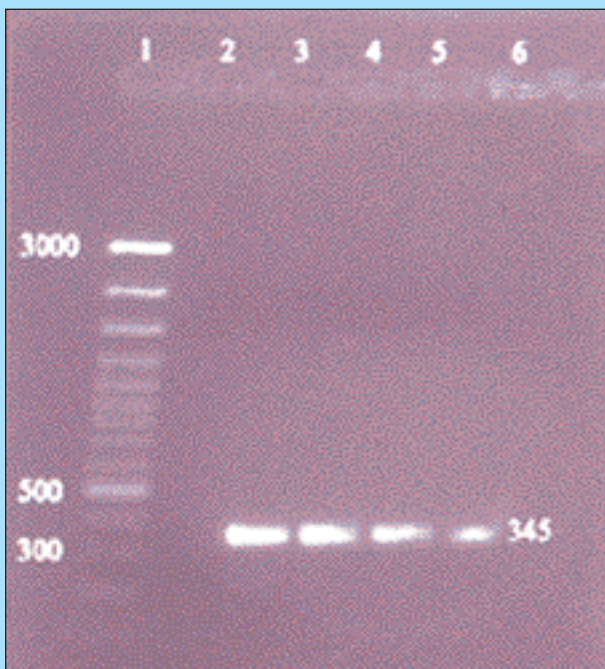


FIGURA 2 - PCR famiglia-specifica.

Corsia 1: marker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas GmbH, Germania).

Corsia 2: controllo negativo (DH82 non infette).

Corsia 3: PCR campione n° 29/03 (345 bp).

Corsia 4: PCR campione n° 52/03 (345 bp).

Corsia 5: PCR campione n° 104/03 (345 bp).

Corsia 6: PCR controllo positivo (DH82 infettate con *E. canis* ceppo Oklahoma) (345 bp).

rickettsii in sette sieri (7/16) con titoli anticorpali compresi tra 1:80 e 1:1280.

La prevalenza sierologica nei confronti di *E. canis*, riferita al totale degli animali esaminati, è risultata pari al 14,28%, mentre si attesta nei valori del 28,57% (2/7), 57,14% (4/7) e del 50% (10/20) considerando i soli soggetti provenienti rispettivamente dalle province di Caserta, Isernia e Frosinone. Nel campione esaminato in provincia di Teramo non sono state rilevate positività (0/78) (Tab. 4).

Per quanto riguarda i n° 3 campioni che hanno fornito esito positivo mediante le tecniche molecolari, n° 2 (29/03 e 104/03) provenivano dalla provincia di Frosinone e n° 1 (52/03) dalla provincia di Isernia.

I monostrati di cellule DH82 inoculate con i *buffy coat* risultati positivi in PCR, non hanno evidenziato la presenza di morule e sono risultate negative al test IFI per l'intero periodo di monitoraggio.

Infine, le diluizioni seriali dell'estratto di DNA ottenuto a partire da cellule DH82 infettate con il ceppo Oklahoma di *E. canis* hanno dimostrato che la PCR-RFLP da noi allestita, è in grado di amplificare fino a $2,7 \times 10^3$ (3,6 pg/ μ l) copie del genoma batterico¹⁷.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I riscontri clinici e le manifestazioni patologiche associati all'infezione da *E. canis* possono orientare il medico veterinario verso un sospetto diagnostico di CME; tuttavia allo scopo di pervenire ad una diagnosi di certezza si ren-

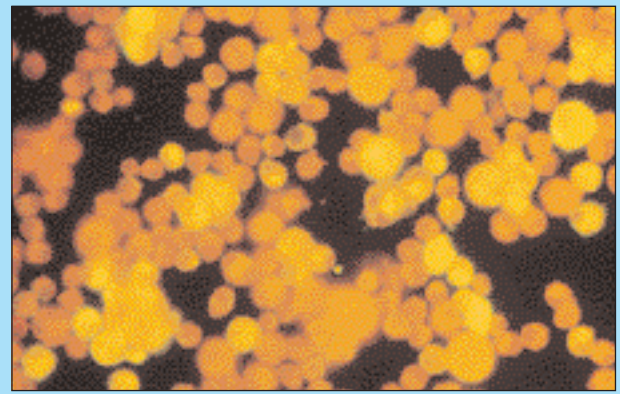


FIGURA 3 - Immunofluorescenza indiretta eseguita su cellule DH82 infettate con *E. canis* ceppo Oklahoma (40x).

Tabella 3
Distribuzione dei risultati di positività
rispetto al titolo di IgG riscontrate

N° campione	IgG anti- <i>E. canis</i>	IgG anti- <i>E. equi</i>	Glg anti- <i>Rickettsia rickettsii</i>
20/03	1:1280	-	-
21/03	1:20000	-	-
22/03	1:40000	-	-
25/03	1:10000	-	-
26/03	1:1280	-	1:320
27/03	1:10000	-	-
29/03	1:10000	-	-
52/03	1:10000	-	-
54/03	1:10000	-	-
68/03	1:20000	-	1:1280
69/03	1:10000	-	1:1280
101/03	1:40000	-	1:320
104/03	1:10000	-	1:320
105/03	1:80000	-	-
106/03	1:5000	-	1:80
108/03	1:10000	-	1:640

Tabella 4
Distribuzione dei risultati di positività sierologica nei confronti
di *E. canis* in base alla provenienza

Provenienza	N° totale	N° positivi	% positività
Teramo	78	0	0
Frosinone	20	10	50
Isernia	7	4	57,14
Caserta	7	2	28,57

de indispensabile nella maggior parte dei casi l'esecuzione di accertamenti di laboratorio volti ad escludere la presenza di altri agenti patogeni trasmessi da zecche.

Il test IFI comunemente impiegato per l'evidenziazione e la titolazione di anticorpi anti-*E. canis*, pur rappresentando la metodica dotata di maggiore sensibilità per rivelare un'infezione ehrlichiale attiva o pregressa, può mostrare dei limiti individuabili nella bassa specificità conseguente alla cross-reattività sierologica esistente tra diversi membri della famiglia *Anaplasmataceae*¹⁸.

La maggior parte delle metodiche di PCR finora allestite si sono basate sull'amplificazione di frammenti bersaglio inclusi nel gene 16S rRNA che presenta una percentuale di identità tra le diverse specie ehrlichiali compresa tra l'83,5% e il 99,9% (Inokuma *et al.*, 2001), tale da rendere necessario il ricorso ad ulteriori indagini biomolecolari per una corretta differenziazione di specie⁸.

In relazione a tali problematiche si è ritenuto utile mettere a punto una tecnica di PCR-RFLP specifica per *E. canis* basata sull'amplificazione di un frammento di DNA, incluso nel gene *gltA* e sulla successiva digestione enzimatica che ha permesso di differenziare il genoma del patogeno da quello di altre specie ad esso strettamente correlate. Il gene *gltA*, mostrando un livello di similarità inferiore (compreso tra 49,7% e 99,8%)⁷ a quello del gene 16S rRNA, potrebbe rappresentare un sito di amplificazione più idoneo per un'accurata differenziazione anche delle altre specie ehrlichiali.

L'applicazione della metodica su campioni di sangue provenienti da cani con sintomatologia riferibile a CME ha permesso di ottenere il primo segnalamento di *E. canis* su base molecolare in Italia.

L'impiego di una PCR finalizzata all'amplificazione di un frammento di DNA incluso nel gene 16S rRNA comune a tutte le specie appartenenti alla famiglia *Anaplasmataceae*, ha escluso l'eventuale presenza di altre ehrlichie. L'analisi sequenziale degli amplificati ha infatti confermato l'appartenenza degli stessi alla specie *E. canis*.

In proposito, occorre sottolineare che i risultati da noi ottenuti si discostano da quanto emerso in un precedente studio condotto in provincia di Teramo⁹, nel corso del quale le metodiche biomolecolari applicate hanno identificato il DNA di *A. platys* nel 23,00% dei soggetti esaminati e non sono state rilevate altre specie ehrlichiali. Tale discordanza potrebbe essere attribuibile alle caratteristiche della popolazione di cani esaminata. Infatti, mentre nell'indagine condotta da Sparagano *et al.* (2003) la positività nei confronti di *A. platys* è stata evidenziata in un campione proveniente dallo stesso canile e per la maggior parte rappresentato da soggetti asintomatici, nel nostro caso è stata analizzata una popolazione abbastanza eterogenea per quanto riguarda la provenienza e costituita soltanto da animali con sintomatologia riferibile ad ehrlichiosi.

Relativamente all'indagine sierologica i risultati ottenuti, se riferiti al totale degli animali esaminati, sono sovrapponibili a quelli rilevati nel corso di altri studi sieroepidemiologici condotti in Italia^{11,12}; tuttavia, se valutati sulla base delle singole aree nelle quali è stata condotta l'indagine, si osserva un'assenza dell'infezione in provincia di Teramo ed una prevalenza con valori compresi tra il 28,57% e il 57,14% nelle province di Caserta, Isernia e Frosinone.

Nel corso di numerosi studi^{18,19,20,21} è emerso che alla correlazione antigenica esistente tra le varie specie ehrlichiali

corrisponde una cross-reattività sierologica di entità variabile con titoli anticorpali più elevati per la specie che ha causato l'infezione.

Nella presente indagine, in nessuno dei campioni sierologicamente positivi nei confronti di *E. canis* è stata rilevata la presenza di anticorpi anti-*A. phagocytophila* comb. nov.; questo dato, che è in accordo con quanto già osservato da Dumler *et al.* (1995)²², permette di escludere fenomeni di cross-reattività tra le due specie.

Un aspetto che meriterebbe un ulteriore approfondimento riguarda la sieropositività riscontrata nei confronti di *R. rickettsii*. Tale situazione, peraltro evidenziata anche in altre indagini²³, potrebbe essere attribuibile alle modeste correlazioni antigeniche esistenti tra *R. rickettsii* e *E. canis*; tuttavia, data la grande varietà dei riscontri clinici associati alle due infezioni, non è possibile neanche escludere l'eventuale concomitanza di entrambi i patogeni.

La discrepanza dei risultati ottenuti, comparando le positività sierologiche con quelle molecolari, conferma quanto già osservato in precedenza^{24,25} in merito alla sensibilità della PCR nella diagnosi dell'infezione da *E. canis* applicata su campioni di sangue intero: ciò potrebbe essere attribuibile al sequestro del microrganismo, soprattutto nelle forme subacute e croniche, in organi quali la milza e il midollo osseo.

Tra le metodiche utilizzate per la diagnosi eziologica, le prove di isolamento su cellule DH82 non sembrerebbero costituire un metodo sensibile; in effetti *E. canis* non è stata isolata da nessuno dei campioni risultati positivi in PCR. Questo dato che comunque richiede ulteriori approfondimenti e conferme a causa del numero esiguo delle positività molecolari ottenute, potrebbe essere attribuibile alla scarsa resistenza del patogeno nell'ambiente esterno all'animale e al numero esiguo di morule presenti nei monociti circolanti¹⁸.

In conclusione la metodica di PCR-RFLP da noi proposta ha dimostrato di possedere caratteri di elevata specificità tale da poter essere utilizzata sia per l'identificazione di *E. canis*, sia per studi di patogenesi i cui numerosi punti oscuri meriterebbero ulteriori approfondimenti. Infine, si ribadisce l'utilità delle indagini sierologiche nella diagnosi di ehrlichiosi monocitica canina, quando accanto ad una sintomatologia correlata si riscontrano elevate positività anticorpali.

Ringraziamenti

Si ringraziano i dottori Claudio D'Antonio, Lorenzo Del Greco, Rina Di Girolamo e Loredana Ricci per la preziosa collaborazione.

Parole chiave

Cane, ehrlichiosi, diagnosi, PCR-RFLP, *Ehrlichia canis*, gene della citrato sintetasi.

Key words

Dog, ehrlichiosis, diagnosis, PCR-RFLP, *Ehrlichia canis*, citrate synthase gene.

Bibliografia

1. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ., et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 51: 2145-2165, 2001.
2. Woody BJ, Hoskins JD: Ehrlichial disease of dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Practice* 21: 75-98, 1991.
3. Preziosi DE, Cohn LA: La storia sempre più complicata di Ehrlichia. *Veterinaria* 3: 33-43, 2003.
4. Breitschwerdt EB: Il ruolo emergente delle malattie trasmesse dalle zecche negli animali domestici. *Atti del 2° Congresso Internazionale Meril: Riccione*, 16-17-18 giugno, 2000.
5. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, et al.: Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dog treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1852-1855, 1997.
6. Massung RF, Slater K, Owens JH, et al.: Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic Ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1090-1095, 1998.
7. Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, et al.: Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3031-3039, 2001.
8. Hancock SJ, Breitschwerdt EB, Pitulle C: Differentiation of Ehrlichia platys and E. equi Infections in Dogs by Using 16S Ribosomal DNA-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4577-4578, 2001.
9. Sparagano OA, de Vos AP, Paoletti B, et al.: Molecular detection of Anaplasma platys in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 527-34, 2003.
10. Cinco M, Maroli M, Frusteri L, et al.: Coexistence of Ehrlichia phagocytophila and Borrelia burgdorferi Ssensu Lato in Ixodes ricinus Ticks from Italy as Determined by 16S rRNA Gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3365-3366, 1997.
11. Fioretti PG, Moretti A, Baldelli R, et al.: Canine ehrlichiosis: epidemiology and serological correlation with leishmania sp. in stray dogs caught in the province of Perugia (Umbria, Central Italy). *Acta Med. Vet.* 42: 71-78, 1996.
12. Cuteri V, Mezzasoma P, Moscati L, Battistacci L, et al.: Ehrlichia canis: Indagine sierologica nel cane. *Veterinaria* 3, 69-74, 2002.
13. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680, 1994.
14. Xia X, Xie Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. heredity* 92: 371-373, 2001.
15. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al.: Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245, 2001.
16. Brown GK, Martin AR, Roberts TK, et al.: Detection of Ehrlichia platys in dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 8: 554-558, 2001.
17. Weigler BJ, Babineau CA, Sherry B, et al.: High sensitivity polymerase chain reaction assay for active and latent Feline Herpesvirus-1 in domestic cats. *Vet. Rec.*, 140: 335-338, 1997.
18. Suksawat J, Hegarty BC, Britschwerdt EB: Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Ehrlichia risticii in sick dog from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 50-55, 2000.
19. Nyindo M, Kakoma I, Hansen R: Antigenic analysis of four species of the genus Ehrlichia by use of protein immunoblot. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1225, 1991.
20. Dawson JE, Ewing SA: Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia chaffeensis, causative agent of human ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1322-1327, 1992.
21. Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC: Western immunoblot analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis or E. ewingii infections in dogs and humans. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2107-2112, 1994.
22. Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS, et al.: Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1098-1103, 1995.
23. Furlanello T, Caldin M, Lubas G, et al.: Concurrent coinfections in dogs detected by serology during a survey for Rickettsia rickettsii: results from 1093 serum samples collected in Italy. *J. Vet. Intern. Med.* 15: 276, 2000.
24. Harrus S, Waner T, Aizenberg I, et al.: Amplification of Ehrlichial DNA from Dog 34 Months after Infection with Ehrlichia canis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 73-76, 1998.
25. Rikihisa Y: Diagnosis of emerging Ehrlichial disease of dogs, horses and human. *J. Vet. Intern. Med.* 14: 250-251, 2000.