

Confronto tra un test immunocromatografico rapido e il test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) per la determinazione della positività anticorpale nei confronti di *Leishmania infantum* nel cane



Introduzione e scopo - La leishmaniosi canina (LCan) causata da *Leishmania infantum* è una patologia zoonotica potenzialmente mortale. La disponibilità di un kit diagnostico rapido e facilmente utilizzabile nella pratica clinica rappresenta un valido ausilio per la diagnosi. L'obiettivo di questo studio è di confrontare il test rapido immunocromatografico, Theratest Leishmania® kit (Tt) con l'immunofluorescenza indiretta (IFAT) quale metodo quantitativo di riferimento, per individuare anticorpi nei confronti di *L. infantum*, in cani naturalmente infetti.

Materiali e metodi - Sono stati valutati contemporaneamente con entrambi i test, i sieri di 40 cani, 10 sani e 30 con diagnosi di leishmaniosi canina. Sono stati considerati positivi titoli IFAT $\geq 1:80$. Sono state calcolate sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo del Tt. Per valutare la concordanza tra i due test è stato utilizzato il test statistico Kappa (K) con IC del 95%.

Risultati - Il test IFAT ha individuato anticorpi anti-leishmania in 30/40 campioni con titolo anticorpale compreso tra 1:80 e 1:5120. Con il metodo Tt sono risultati positivi 31/40 campioni. Sensibilità e specificità di Theratest sono risultate rispettivamente del 100% e 95%. Il valore Kappa è risultato 0,935 dimostrando ottimo accordo tra metodo IFAT e Tt.

Discussione - Theratest è in grado di identificare con accuratezza gli anticorpi anti-*L. infantum* nel siero di cane. Questo test rapido non richiede alcuna specifica preparazione dei campioni, né attrezzature dedicate e può essere conservato a temperatura ambiente, caratteristiche che lo rendono adatto ad essere utilizzato nella pratica clinica fornendo risultati in tempi rapidi.

Daniela Proverbio*,
MedVet, PhD

Roberta Perego,
MedVet, PhD

Luciana Baggiani,
MedVet

Fabrizio Vitale¹,
MedVet

Eva Spada,
MedVet, PhD

Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET),
Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano

¹ Centro di Referenza Nazionale per le Leishmaniosi
(C.Re.Na.L.), Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia,
90129 Palermo

*Corresponding Author (daniela.proverbio@unimi.it)

Ricevuto: 12/07/2017 - Accettato: 08/11/2017

INTRODUZIONE

La leishmaniosi canina (LCan), causata dal protozoo *Leishmania infantum* è una patologia zoonotica potenzialmente mortale. Nei cani infetti, lo sviluppo della malattia è condizionato da diversi fattori tra cui il tipo di risposta immunitaria attivata, la razza, l'età, le patologie concomitanti e il livello di esposizione al parassita. I sintomi clinici, estremamente polimorfi, possono essere generalizzati (febbre, perdita di peso, linfomegalia, splenomegalia), oppure interessare un solo organo o apparato (forme cutanee, renali, oculari)¹. L'andamento della patologia può essere auto-limitante, grave o fatale². La leishmaniosi canina è endemica in molte aree tropicali e subtropicali del mondo. Nel bacino del Mediterraneo è presente con una prevalenza media del 22%^{3,4,5,6} ed è stata segnalata anche in alcune aree del nord Europa^{7,8,9}. **In Italia la malattia è presente in quasi tutto il territorio con una maggior prevalenza nelle regioni costiere del centro e del sud**^{5,10-13}. La trasmissione di *L. infantum* avviene

In Italia la Leishmaniosi canina è presente in quasi tutto il territorio con una maggior prevalenza nelle regioni costiere del centro e del sud.

prevalentemente attraverso un vettore, la femmina del flebotomo, che trasmette il parassita quando compie il pasto di sangue ed il cane è considerato il principale serbatoio del parassita^{1,13}. Nelle aree endemiche la prevalenza dei cani infetti è molto più alta di quella dei soggetti malati¹⁰ ed il sospetto diagnostico di LCan è reso difficoltoso dalla presentazione clinica che varia in funzione dello stato immunitario del soggetto colpito¹. Benché la diagnosi clinica di LCan possa essere confermata con metodi diretti quali l'esame citologico e la reazione a catena della polimerasi (PCR) su tessuti biologici, la ricerca anticorpale riveste una notevole importanza diagnostica, non solo per la conferma della patologia nei casi clinici sospetti, ma anche per l'individuazione di cani infetti asintomatici che fungono da serbatoio del parassita¹⁴. I test sierologici quantitativi rappresentano una

I test rapidi ad uso ambulatoriale permettono di confermare facilmente e in tempi brevi il sospetto diagnostico di LCan consentendo una veloce gestione dei casi clinici e favorendo la sorveglianza epidemiologica del territorio.

componente importante nell'algoritmo diagnostico della leishmaniosi canina. Quelli maggiormente utilizzati sono il test dell'immunofluorescenza indiretta (IFAT) e i test immunoenzimatici (ELISA) che vengono impiegati sia negli studi epidemiologici, sia nella diagnostica

clinica¹⁵. Generalmente alti titoli anticorpali sono associati ad un'alta carica parassitaria, a una sintomatologia clinica evidente e confermano la diagnosi di malattia¹⁵⁻¹⁸. Un limite all'esecuzione di questi test è rappresentato dalla necessità di laboratori specializzati, personale esperto e attrezzature dedicate. Considerata la rilevanza di questa patologia per la salute del cane e dell'uomo, la possibilità di confermare facilmente e in tempi brevi il sospetto diagnostico di LCan agevola la veloce gestione dei casi clinici permettendo anche di ridurre il rischio di complicanze dovute al ritardo della somministrazione della terapia¹⁹. Per questo motivo negli anni recenti, sono stati sviluppati test rapidi ad uso ambulatoriale che facilitano l'iter diagnostico dei casi clinici sospetti e favoriscono la sorveglianza epidemiologica²⁰⁻²². L'obiettivo di questo studio è di valutare l'accuratezza di un nuovo test immunocromatografico rapido, utilizzando il test IFAT come metodo di riferimento.

Sono stati selezionati campioni con diversi titoli di positività anticorpale al test IFAT in modo da riflettere la casistica di cani affetti da LCan comunemente osservata nella pratica clinica.

MATERIALI E METODI

Per la valutazione del metodo immunocromatografico rapido (Theratest Leishmania[®], Bioforlife, Milano, Italia) sono stati selezionati campioni, valutati con il metodo IFAT, con diversi titoli di positività anticorpale nei confronti di *L. infantum*, in modo da riflettere la casistica di cani affetti da LCan comunemente osservata nella pratica clinica. I campioni di sangue sono stati prelevati da 40 cani, di età compresa tra i 2 e i 14 anni, afferiti agli ambulatori del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Milano. Trenta dei 40 cani erano originari o avevano viaggiato in zone endemiche per leishmaniosi canina ed i prelievi di sangue sono stati effettuati come parte integrante delle visite diagnostiche o di follow up; 25/30 cani al momento del prelievo, presentavano sintomi compatibili con CL, rappresentando gli stadi della malattia precedentemente descritti¹, mentre 5/30 erano asintomatici. In questi 30 cani la presenza di infezione da *L. infantum* è stata confermata mediante esame PCR real-time o citologia su campioni di linfonodo, milza o midollo e positività al test IFAT (titolo $\geq 1:80$) per la ricerca di anticorpi anti *L. infantum*. Il gruppo di controllo era composto da 10 cani clinicamente sani, donatori di sangue residenti in zona indenne per LCan, che non si erano mai trasferiti in aree endemiche. In questi soggetti il prelievo di sangue era stato effettuato durante il periodico scree-

ning di controllo dei cani donatori e tutti erano risultati negativi sia alla PCR sia al test IFAT per la ricerca di antigene e anticorpi nei confronti di *L. infantum*. Per valutare possibili cross reazioni con anticorpi nei confronti di *Ehrlichia canis* è stato inoltre analizzato, con il metodo Theratest Leishmania[®], il siero prelevato da un ulteriore gruppo di 10 cani, risultati negativi a PCR e test IFAT per la ricerca di antigene e anticorpi riferiti a *L. infantum*, ma positivi al test IFAT per la ricerca di anticorpi anti *E. canis* (titolo $\geq 1:80$). In tutti i cani i prelievi di sangue sono stati effettuati, dopo almeno 8 ore di digiuno, dalla vena cefalica dell'avambraccio e il sangue è stato trasferito in provette prive di anticoagulante e in provette contenenti EDTA (Vacuette[®], Preanalitica S.r.l., Caravaggio, Italia). I campioni di siero e di sangue in EDTA sono stati analizzati con Tt entro le 24 ore dal prelievo, mentre le aliquote di siero per l'esame IFAT sono state congelate a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'esecuzione dell'esame.

Ricerca anticorpi verso *L. infantum* con test iFAT

Affinché il test sia considerato valido, dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, deve sempre comparire una linea rossa, indicata con la lettera C (controllo). La presenza di due linee (C e T) indica il risultato positivo del test indipendentemente da quale delle due linee appare per prima e dall'intensità della loro colorazione.

Il test IFAT è stato effettuato come descritto precedentemente¹⁴, utilizzando un kit commerciale (Leishmania-Spot IF[®], BioMerieux Marcy L'Etoile, France) costituito da vetrini con adesi promastigoti di *L. infantum*. Il siero è stato diluito con un buffer salino (PBS) di pH 7,2 ed è stato depositato in diluizioni seriali nei pozzetti presenti sul vetrino e incubato in camera umida per 30 minuti. I vetrini sono stati quindi lavati con PBS e incubati con anticorpi murini anti IgG di cane coniugati con fluoresceina (Sigma Aldrich, Monaco, Germania) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 minuti in camera umida. I vetrini sono stati nuovamente lavati con PBS, asciugati ed esaminati al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiosop[®], Germania) a 280 nm. In ogni vetrino sono stati inclusi come controllo negativo e positivo sieri canini provenienti da un soggetto sicuramente sano e da uno con diagnosi di LCan, precedentemente testati. Il test è stato considerato positivo quando era presente una fluorescenza di membrana e/o citoplasmatica a un titolo anticorpale $\geq 1:80$. Il test IFAT per l'individuazione degli anticorpi anti *E. canis* è stato effettuato con un kit commerciale (Biopronix[®], Agrolabo, Scamagno, Torino, Italia) come precedentemente descritto¹⁵.

Ricerca anticorpi verso *L. infantum* con test Theratest Leishmania

Il test diagnostico Theratest Leishmania è un test qualitativo basato sulla tecnica immunocromatografica per l'individuazione di anticorpi anti *L. infantum* nel siero, plasma e sangue intero di cane. Il test è stato eseguito seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dieci μl del campione (siero o sangue in EDTA) da testare sono stati pipettati nel foro designato per la deposizione del campione e immediatamente sono state aggiunte due gocce di buffer fornito nella confezione. Il campione e il buffer sono migrati nella zona di membrana con adesso l'antigene *L. infantum* denominata "finestra dei risultati". Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente è comparsa in tutti i campioni testati, una linea rossa, indicata con la lettera C (controllo), che deve essere sempre presente affinché il test sia considerato valido. Nei campioni positivi, nella finestra dei risultati, si è osservata la comparsa di un'ulteriore linea rossa indicata con la lettera T (test). La presenza delle due linee (C e T) indica il risultato positivo del test indipendentemente da quale delle due linee appare per prima e dall'intensità della loro colorazione.

Trascorsi 30 minuti dall'esecuzione il test non è più interpretabile.

Per stabilire la ripetibilità del test Tt tre campioni risultati positivi (titoli 1:320; 1:2560; 1:5120) e un campione negativo al test IFAT sono stati ripetuti 5 volte nello stesso giorno. Gli stessi 3 campioni positivi sono stati valutati su siero fresco e congelato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 7

giorni, per valutare gli effetti della conservazione sulla lettura del campione. Gli effetti dell'emolisi sui risultati forniti da Tt sono stati valutati sugli stessi 3 campioni di siero cui sono stati aggiunti 1 g/L di emoglobina. La differenza di lettura del test eseguito su sangue intero è stata valutata effettuando prove in doppio tra siero e sangue EDTA su 5 campioni.

Analisi Statistica

La normalità della distribuzione dei dati ottenuti con il test IFAT è stata valutata con il test di D'Agostino-Parson. Per valutare la performance del metodo immunocromatografico nel suo complesso sono stati calcolati sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) utilizzando la tabella 2x2 in base alla concordanza dei risultati di Tt con quelli ottenuti con il metodo IFAT. Per valutare l'accordo oltre al caso, tra i risultati ottenuti con il test IFAT e il Theratest per la ricerca degli anticorpi nei confronti di *L. infantum* nel siero canino, è stato utilizzato il K statistico non pesato (k) con intervallo di confidenza del 95% riferito a un valore di prevalenza del 22% presente in media nel bacino del Mediterraneo^{19,18}. In base al valore di



Figura 1 - Valutazione della positività per la ricerca di anticorpi verso *Leishmania infantum* con metodo immunocromatografico *Theratest Leishmania*[®]: campione con titolo di positività IFAT 1:80 risultato positivo al test immunocromatografico con una colorazione della linea del risultato molto tenue.

Utilizzando il metodo IFAT come riferimento il test immunocromatografico ha evidenziato una sensibilità del 100% (95%IC 88,43%-100,00%) e una specificità del 95% (95% IC 75,13%-99,87%) e un valore K di 0,935 indicando un ottimo accordo tra i due test.

Il livello di accordo tra i due test è stato valutato secondo la seguente linea guida: 0: accordo non superiore al caso; 0,20: < accordo scarso; 0,21-0,40: accordo debole; 0,41-0,60: accordo moderato; 0,61-0,80: accordo buono; 0,81-1,00: accordo ottimo. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma MedCalc per Windows v. 9.2.1 (Mariakerke, Belgio). Per tutte le analisi è stato considerato statisticamente significativo un valore di $P < 0,05$.

RISULTATI

Utilizzando il test IFAT sono risultati positivi per la ricerca di anticorpi anti *L. infantum* 30/40 campioni con un titolo anticorpale compreso tra 1:80 e 1:5120 (5-1:80; 6-1:160; 3-1:320; 6-1:640; 3-1:1280; 3-1:2560; 4-1:5120), mentre con il metodo immunocromatografico rapido sono risultati positivi 31/40 campioni. Un solo campione, prelevato da un soggetto asintomatico, ha evidenziato un risultato discordante fornendo risultato negativo con il test IFAT e positivo con *Theratest*. Tutti i test effettuati con *Tt* sono risultati leggibili ed interpretabili anche se, in 3 campioni risultati positivi al test IFAT con titoli di 1:80 e 1:160, la linea rossa di positività nella “finestra dei risultati” è apparsa molto tenue e non ben evidente come quelle ottenute con gli altri campioni anche con identici titoli di positività a IFAT (Figura 1). Utilizzando il metodo IFAT come riferimento il test immunocromatografico ha evidenziato una sensibilità del 100% (95%IC 88,43%-100,00%) e

una specificità del 95% (95% IC 75,13%-99,87%) con un valore predittivo positivo (VPP) del 84,94% (95% IC 54,86-98,20) e un valore predittivo negativo (VPN) del 100% (95% IC 90,50-100,00). Il valore del kappa statistico (κ), calcolato per valutare la concordanza oltre al caso dei due metodi nell'individuare anticorpi anti *Leishmania* nei campioni analizzati è risultato di 0,935 indicando un ottimo accordo tra i due test. Nessuno dei



Figura 2 - Prova di ripetibilità con metodo immunocromatografico *Theratest Leishmania*[®] per la ricerca di anticorpi verso *Leishmania infantum*: lo stesso campione ripetuto ha sempre mostrato il medesimo risultato positivo.

campioni risultati positivi per la ricerca di anticorpi anti-*E. canis* e negativi al test IFAT per la ricerca di anticorpi anti-*L. infantum* è risultato positivo al test immunocromatografico. Il test Tt ha mostrato una buona ripetibilità in quanto i campioni ripetuti 5 volte hanno sempre evidenziato il medesimo risultato (Figura 2) anche se il campione a titolo IFAT 1:2560 ha evidenziato una forte variabilità nell'intensità della linea di positività (Figura 3). I risultati ottenuti con il test immunocromatografico sono rimasti invariati anche sui campioni di siero congelati a -20 °C per 7 giorni. L'emolisi indotta nei 3 campioni analizzati, non ha modificato il risultato ottenuto. La lettura dei risultati è apparsa leggibile anche in campioni di sangue intero, anche se la linea rossa del test era meno netta rispetto a quella ottenuta con il siero (Figura 4).

DISCUSSIONE

Il monitoraggio e la sorveglianza epidemiologica della leishmaniosi canina riveste particolare importanza sia in medicina veterinaria, sia in me-

Theratest Leishmania® per la ricerca di anticorpi anti-leishmania, può essere eseguito utilizzando siero o sangue intero, è di facile interpretazione, non richiede alcuna attrezzatura o preparazione del campione e può essere conservato a temperatura ambiente.

dicina umana in quanto questa patologia è una zoonosi con importanti risvolti sulla salute pubblica per la quale il cane è il principale serbatoio. L'approccio diagnostico alla patologia prevede la ricerca degli anticorpi anti leishmania nel siero, associata all'identificazione del parassita o del suo genoma nei tessuti. La sierologia viene utilizzata per la diagnosi dei soggetti malati, lo screening dei cani donatori di sangue, per identificare soggetti infetti clinicamente sani residenti o provenienti da regioni endemiche o per effettuare studi epidemiologici su ampia scala^{23,24,25}. Malgrado per la diagnosi di LCan non vi sia un test "gold standard" dotato di sensibilità e specificità del 100%¹⁸, i test maggiormente attendibili per la ricerca di anticorpi specifici anti leishmania (IgG) sono quelli quantitativi come l'IFAT e l'ELISA¹⁹. Il test IFAT è considerato il metodo di riferimento nella diagnostica di laboratorio¹⁹, mentre il metodo ELI-

SA presenta sensibilità e specificità variabili in base al differente antigene impiegato²³. I metodi quantitativi, oltre a confermare l'infezione, permettono la valuta-



Figura 3 - Prova di ripetibilità con metodo immunocromatografico Theratest Leishmania® per la ricerca di anticorpi verso *Leishmania infantum*: un campione positivo al test IFAT con titolo 1:2560 alla prova di ripetibilità ha evidenziato una forte variabilità nell'intensità della linea di positività.

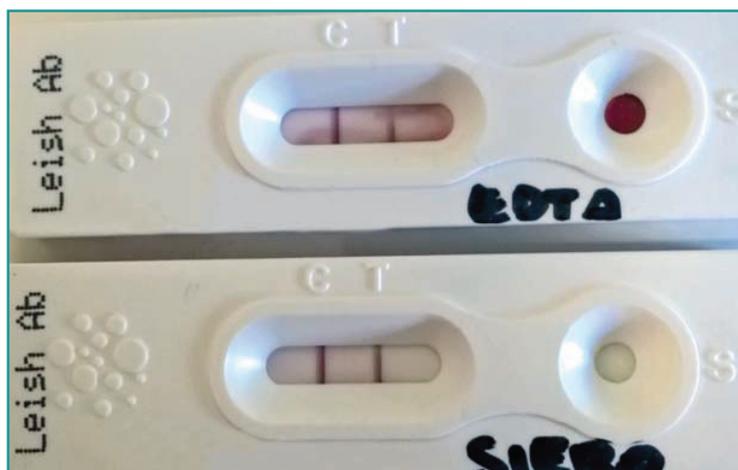


Figura 4 - Valutazione della positività per la ricerca di anticorpi verso *Leishmania infantum* con metodo immunocromatografico Theratest Leishmania®: test effettuato sullo stesso soggetto positivo al test IFAT, con sangue intero e con siero. La lettura dei risultati è leggibile con entrambi i campioni.

zione del titolo anticorpale (titolazione “end point”) il cui andamento può essere monitorato durante il decorso della malattia, e rappresenta uno dei parametri indicativi di miglioramento o aggravamento del quadro clinico^{1,17,21}. La titolazione anticorpale, inoltre, permette di distinguere i soggetti malati, clinicamente sintomatici e con alto titolo anticorpale, da quelli infetti che, generalmente, presentano basso titolo anticorpale¹⁶. Malgrado questi indubbi vantaggi, non sempre questi test sono facilmente attuabili nella pratica clinica in quanto vengono realizzati in laboratori specializzati e ne-

Nell'interpretazione dei risultati occorre considerare positivi anche campioni con linee di positività estremamente tenui.

cessitano di personale esperto per essere eseguiti ed interpretati e di lunghi tempi di esecuzione. Durante lo svolgimento dell'attività clinica, la disponibilità di un test rapido, di facile utilizzo, che non richieda particolari competenze laboratoristiche e possa essere realizzato in ambulatorio, rappresenta una risorsa in grado di facilitare e velocizzare l'approccio diagnostico alla patologia come dimostrano i numerosi test rapidi che sono stati commercializzati negli ultimi anni^{20,21,22,26}. Theratest Leishmania[®] per la ricerca di anticorpi anti-leishmania, può essere eseguito utilizzando siero o sangue intero, è di facile interpretazione, non richiede alcuna attrezzatura o preparazione del campione e può essere conservato a temperatura ambiente. In meno di 30 minuti il sospetto diagnostico può essere confermato rendendo questo test ideale per l'uso ambulatoriale e di campo. Non è stata osservata cross-reazione con sieri positivi ad *E. canis*, patologia che rappresenta una co-infezione non rara in corso di leishmaniosi canina. Il valore del k statistico evidenzia che l'accordo tra i risultati ottenuti con il metodo immunocromatografico e il metodo IFAT è ottimo. In campioni con titolo anticorpale IFAT $\geq 1:80$ il test immunocromatografico è in grado di individuare anticorpi anti-*L. infantum* nel siero di cane con una specificità del 95% e una sensi-

bilità del 100%, non avendo fornito mai risultati falsamente negativi. Occorre sottolineare che la saltuaria e casuale comparsa di una linea di positività molto tenue non correlata al valore del titolo anticorpale IFAT, potrebbe dar luogo ad errate interpretazioni con risultati falsi negativi. Per questo motivo gli autori enfatizzano l'importanza di un'attenta valutazione della “finestra dei risultati” considerando positivi anche campioni con linee di positività estremamente tenui. In corso di LCan, la sensibilità di un metodo è fondamentale quando questo viene utilizzato per il controllo della sieroprevalenza dell'infezione, mentre la specificità è particolarmente importante per l'identificazione dei pazienti malati²². La presenza di possibili risultati falsi positivi (VPP 84,94%) deve indurre a considerare il risultato del test nell'ambito di un contesto epidemiologico e clinico-patologico compatibile con la presenza della patologia. Esiti positivi in soggetti in cui la sintomatologia clinica e le alterazioni di laboratorio non riflettano il quadro tipico della malattia deve indurre a considerare sempre con attenzione i risultati ottenuti.

Il risultato del test deve sempre essere valutato nell'ambito di un contesto epidemiologico e clinico-patologico compatibile con la presenza della patologia.

La principale limitazione di questo studio è di non aver valutato altre possibili cross-reazioni del test immunocromatografico con altre malattie parassitarie quali babesiosi, rickettsiosi o anaplasmosi che possono essere presenti come co-infezioni in corso di LCan.

In conclusione, il metodo immunocromatografico Theratest Leishmania[®] ha evidenziato ottime performance diagnostiche, dimostrandosi un valido ausilio per la pratica clinica. Gli autori sottolineano, però, che per una corretta gestione del paziente leishmaniotico qualsiasi risultato positivo ottenuto con un metodo qualitativo deve essere confermato utilizzando un metodo quantitativo in grado di avvalorare la diagnosi e fornire un titolo anticorpale “end point”.

PUNTI CHIAVE

- La leishmaniosi canina è una patologia parassitaria, zoonotica ad ampia diffusione nel territorio italiano e nel bacino del Mediterraneo.
- La disponibilità di un kit diagnostico ambulatoriale rappresenta un ausilio per la rapida conferma dei casi clinici sospetti e per la valutazione della sierconversione in soggetti asintomatici.
- Il test immunocromatografico Theratest Leishmania® ha mostrato ottima concordanza di risultati con il test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) (K= 0,935).
- Il test rapido immunocromatografico ha mostrato una sensibilità del 100% e una specificità del 95% nell'individuare anticorpi anti leishmania in sieri di cani affetti da leishmaniosi canina.
- Nel caso di sospetto di leishmaniosi canina, il risultato di un test qualitativo deve essere sempre confermato dalla determinazione del titolo anticorpale mediante un metodo quantitativo.

Comparison of a immunocromatographic test kit with the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for assaying *Leishmania infantum* antibodies in dogs

Summary

Introduction and aim of the study - Canine leishmaniosis (CanL) due to *Leishmania infantum* infection is a life-threatening zoonotic disease. The availability of reliable and rapid in-clinic serologic tests, would assist immediate diagnosis in clinically suspected cases. The aim of this study is to compare the rapid immunocromatographic Theratest Leishmania® kit (Tt) with a quantitative reference method, immunofluorescence antibody test (IFAT) for detection of *L. infantum* antibodies in naturally infected dogs.

Material and methods - Serum samples were obtained from 40 dogs, including 10 healthy control dogs and 30 dogs with confirmed CanL and were evaluated with both tests. IgG-IFAT titers $\geq 1:80$ were considered positive. Sensitivity, specificity, and positive and negative likelihood ratio were calculated and Kappa statistic (K) with a 95% CI was calculated to evaluate agreement between the 2 testing methods.

Results - Using IFAT test anti *L. infantum*, IgG antibodies were found in 30/40 samples with titers ranging from 1:80 to 1:5120. Thirty-one out of 40 samples tested positive with the qualitative Tt. The sensitivity and specificity of the *Leishmania* Theratest were 100% and 95% respectively, compared with those of the IFAT. The Kappa value of 0.935 demonstrated very good agreement between the 2 tests.

Discussion - The immunocromatographic test reliably identified canine sera with anti-*L. infantum* IgG antibody titers $\geq 1:80$. Tt requires neither special preparation of the serum nor specialized equipment and is applicable as a field test being easy to use and providing rapid results.

BIBLIOGRAFIA

1. Solano-Gallego L, Coutinas A, Miro' G, *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165:1-18, 2009.
2. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends parasitology* 24:324-330, 2008.
3. Dujardin JC, Campino L, Canavate C, *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Disease Journal* 14:1013-1018, 2008.
4. Miró G, Checa R, Montoya A, *et al.* Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors* 5, 2012.
5. Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, *et al.* The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *European Communicable Disease Bulletin*. 18: 205-235, 2013.
6. Zoghalmi Z, Chouih E, Barhoumi W, *et al.* Interaction between canine and human visceral leishmaniases in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta Tropica* 139: 32-38, 2014.
7. Shaw SE, D. Langton DA, and Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? *Veterinary Parasitology* 163: 281-285, 2009.

8. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences, *Trends in Parasitology* 28: 531-538, 2012.
9. Pennisi MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology* 208: 35-47, 2015.
10. Baldelli R, Piva S, Salvatore D *et al.* Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Veterinary Parasitology* 179: 57-61, 2011.
11. Mollicone E, Battelli G, Gramiccia M, *et al.* A stable focus of canine leishmaniosis in the Bologna Province, Italy. *Parassitologia* 45: 85-88, 2003.
12. Otranto D, Capelli G, and Genchi C. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites and Vectors* 2: Suppl 1, 2009.
13. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, *et al.* Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *Journal Clinical Microbiology* 48: 131-136, 2010.
14. Solano-Gallego L, Riera C, Roura X *et al.* *Leishmania infantum* - specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology* 4: 275-276, 2001.
15. Reis AB, Teixeira Carvalho A, Vale AM, *et al.* Isotype patterns of immunoglobulins. Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 112: 102-116, 2006.
16. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati a *et al.* Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 236: 1184-1191, 2010.
17. Proverbio D, Spada E, Bagnagatti de Giorgi G, *et al.* Relationship between *Leishmania* IFAT Titer and Clinicopathological Manifestations (Clinical Score) in Dogs. *Biomed Research. International* 2014: 412808, 2014.
18. Solano-Gallego L, Di Filippo L, Ordeix L, *et al.* Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate and severe disease. *Parasites and Vectors* 9:235, 2016.
19. Adel A, Berkvens D, Abatih E, *et al.* Evaluation of Immunofluorescence Antibody Test Used for the Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the Mediterranean Basin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11: 0161051, 2016.
20. Proverbio D, Spada E, Baggiani L, *et al.* Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence antibody test for assaying *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Biomed Research. International* 2013: 249010, 2013.
21. Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, *et al.* Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (*Leiscan*, *ID Screen* and *Leishmania 96*), a rapid test (*Speed Leish K*) and an in-house IFAT. *Parasites and Vectors* 7: 111, 2014.
22. Proverbio D, Spada E, Perego R, *et al.* Comparison of a rapid immunocromatographic assay with and immunofluorescent antibody test for detection of *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 45: 623-626, 2016.
23. Mancianti F, Pedonese F, and Poli A, Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Veterinary Parasitology* 65: 1-9, 1996.
24. Franco AO, Davies CR, Mylne A, *et al.* Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* 138: 1878-1891, 2011.
25. Noli C and Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Journal*. 202: 425-35, 2014.
26. Ferroglio E, Zanet S, Mignone W, *et al.* Evaluation of a rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as an alternative to immunofluorescence assay and Western blotting. *Clinical and Vaccine Immunology* 20: 657-9, 2013.

COMPRAVENDITA DI ATTREZZATURE PROFESSIONALI VETERINARIE

VET-EXCHANGE è il servizio telematico, libero e gratuito riservato ai soli medici veterinari. Questo servizio ha l'unico scopo di consentire un più facile contatto tra soggetti interessati alla compravendita di attrezzature professionali veterinarie. **Non è consentito l'accesso alle aziende del settore.**

Il portale registra più di 20.000 visite mensili, con una media di 200 annunci al mese.

Per inserire la propria offerta o richiesta è necessaria la registrazione al servizio tramite un modulo on-line. Al ter-

mine della registrazione il sistema fornirà all'utente un codice che, insieme alla password, consentirà di accedere all'area riservata per modificare/integrare/cancellare la propria scheda prodotti e la scheda dati personale. Le inserzioni permangono in rete per 90 giorni; alla scadenza di questo periodo vengono rimosse automaticamente.

Registrazione e condizioni d'uso dettagliate al sito: <http://www.vetexchange.it/>



VET-EXCHANGE
IL MERCATO ITALIANO DELLE ATTREZZATURE PROFESSIONALI VETERINARIE
Servizio on-line dell'A.N.M.V.I.