

DIAGNOSI DI LABORATORIO
DELLE PRINCIPALI MALATTIE PARASSITARIE
DEGLI ANIMALI DOMESTICI



Università degli Studi di Bari
Facoltà di Medicina Veterinaria
“Parassitologia e Malattie Parassitarie”
a cura di Riccardo Paolo Lia

INDICE

Introduzione	5
<i>LA LEISHMANIOSI CANINA</i>	6
ESAMI ASPECIFICI	6
a. Esame emocromocitometrico	6
b. Velocità di eritosedimentazione	7
c. Formolgelificazione	7
d. Proteine totali e Tracciato elettroforetico	8
e. Funzionalità renale	11
1. Azotemia e creatininemia	11
2. Esame delle urine	12
f. Funzionalità epatica	13
ESAMI SPECIFICI	14
a. Esami biotici	14
b. PCR	16
c. Esami sierologici	17
1. Immunofluorescenza indiretta (IFAT)	17
2. Kit immunocromatografici rapidi (Dipstick Test)	17
RICERCA DI EMOPROTOZOI	19
a) Esami diretti	19
b) Metodiche biomolecolari	20
c) Esami indiretti	20
RICERCA DI MICROFILARIE NEL SANGUE	22
a. Esame a fresco a goccia spessa	22
b. Knott modificato: esame per arricchimento	22
c. Esami sierologici	25
ESAME COPROLOGICO	26
a. Prelievo del campione	26
b. Esame macroscopico	27
c. Esame microscopico a fresco	27
d. Esame microscopico a fresco previa colorazione	28
e. Esame microscopico previo arricchimento	29
1. Sedimentazione	29
2. Flottazione	29
f. Esame quali-quantitativo delle feci mediante camera di McMaster	31
g. Esame qualitativo delle feci mediante apparato di Baerman	34
RICERCA DI CRYPTOSPORIDI	36
Colorazione di Ziehl Neelsen modificata	36
RICERCA DI TOXOPLASMA	39
RICERCA DI SARCOSPORIDI	41
RICERCA DEGLI ACARI	42
Gli artropodi di interesse medico-veterinario	42
RICERCA DEGLI ECTOPARASSITI	44
Esame delle croste mediante arricchimento:	45

Allegato A	46
<i>Immunofluorescenza indiretta –IFI</i>	46
Allegato B	49
<i>Tecnica esame coprologico</i>	49
Allegato C	53
Tavola degli pseudoparassiti:	53
Allegato D	54
<i>TECNICA PREPARAZIONE SOLUZIONI</i>	54
SOLUZIONE SOVRASATURA DI CLORURO DI SODIO A BASSO PESO SPECIFICO	54
(p.s. 1,200)	54
SOLUZIONE ZINCO-CLORURO A PESO SPECIFICO MEDIO-ALTO (p.s. 1350)	55
SOLUZIONE ZINCO-MERCURIO (TAMPIERI) A PESO SPECIFICO MEDIO-ALTO (p.s. 1350)	56
SOLUZIONE IODIO-MERCURATO DI POTASSIO AD ALTO PESO SPECIFICO	58
(p.s. 1450)	58
Allegato E	59
<i>Colorazione di Giemsa</i>	59
<i>Colorazione di May-Grunwald Giemsa</i>	60
Allegato F	62
<i>PREPARAZIONI DI SOLUZIONI E REAGENTI</i>	62
PREPARAZIONE DI ALCOOL AL 70% GLICERINATO	62
<i>Liquido di Gram o Lugol semplice</i>	63
<i>Liquido di Lugol e Nicolle</i>	64
<i>Liquido di Lugol doppio</i>	64
PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)	65
SOLUZIONE CLORO-PEPTIDICA	66
SOLUZIONE TAMPONE	67
Allegato G	69
<i>CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DEGLI ACARI RESPONSABILI DI ROGNA</i>	69
Allegato H	71
<i>DIFFERENZE MORFOLOGICHE DEGLI ACARI RESPONSABILI DI ROGNA</i>	71
Allegato I	72
<i>DIFFERENZE MORFOLOGICHE DELLE LARVE DI III STADIO DELLE OESTRIDAE</i>	72
Allegato L	74
<i>MORFOLOGIA DELLE PIÙ COMUNI UOVA RILEVABILI ATTRAVERSO L'ESAME</i>	74
Uova dei parassiti del cane e del gatto	74
Uova dei parassiti dei ruminati	77
Uova dei parassiti del cavallo	81

Uova dei parassiti del suino	83
Allegato M	84
Scheda accertamento copro-diagnostico piccoli animali	84
Allegato N	85
Scheda accertamento copro-diagnostico ruminanti	85
Allegato O	86
Scheda accertamento copro-diagnostico equini	86
DIAGNOSI COPROLOGICA	86
Allegato P	87
Scheda accertamento copro-diagnostico suini	87
Allegato Q	88
<i>Prova pratica dell'esame di parassitologia, malattie parassitarie e tecniche diagnostiche di laboratorio</i>	88
Argomenti:	88
A) Metodologie e campionamento	88
B) Tecniche di ricerca degli endoparassiti	88
C) Tecniche di ricerca degli ectoparassiti	88
Allegato R	89
Esame di malattie parassitarie degli animali domestici (prova pratica di laboratorio)	89
ESAME DI MALATTIE PARASSITARIE DEGLI ANIMALI DOMESTICI PROVA PRATICA DI LABORATORIO	90
Bibliografia	91



Introduzione

Lo studio della Parassitologia non può prescindere da un'attenta conoscenza delle metodiche e degli strumenti utilizzati per la diagnosi delle Malattie Parassitarie.

Occorre non solo conoscere i parassiti, le lesioni e le patologie

da essi provocate, ma anche le metodiche di laboratorio utili per la loro corretta diagnosi. L'obiettivo della presente dispensa è quello di fornire allo studente che entra per la prima volta in un laboratorio di parassitologia, una valida guida per orientarsi e muoversi nel complesso mondo della diagnosi delle malattie ad eziologia parassitaria. La dispensa è frutto dell'esperienza maturata quotidianamente nel laboratorio di parassitologia e le metodiche descritte sono quelle impiegate di routine, dalle più classiche alle più recenti ed innovative.

In appendice sono stati inseriti gli allegati che descrivono in modo analitico gli argomenti principali della diagnostica delle malattie parassitarie e sono riportati immagini e disegni originali a colori, che raffigurano le caratteristiche morfologiche delle più comuni uova dei parassiti. L'obiettivo è quello di fornire allo studente gli strumenti per effettuare una corretta diagnosi e pianificare corrette strategie di trattamento e prevenzione delle malattie parassitarie. Questa breve dispensa non deve sostituire i libri di testo ma è concepita per rendere più snello e fruibile lo studio della parassitologia e delle malattie parassitarie.

Riccardo Paolo Lia

LA LEISHMANIOSI CANINA

La leishmaniosi canina è una malattia protozoaria sistemica, dalle manifestazioni cliniche multiple e complesse, ad andamento acuto, subacuto o cronico. Può presentarsi in forma sintomatica o asintomatica.

I diversi aspetti della presentazione clinica della leishmaniosi, possono rendere difficoltosa la diagnosi clinica. In questo caso, gli esami di laboratorio si rendono indispensabili per confermare i sospetti clinici, fare diagnosi e monitorare l'efficacia terapeutica in corso di trattamento.

Per effettuare la diagnosi di laboratorio della leishmaniosi canina esistono **esami aspecifici** ed **esami specifici**.

ESAMI ASPECIFICI

Sono esami che danno indicazioni generali riguardo allo stato dell'animale in corso di infezione e/o malattia. Queste indagini sono da considerarsi di routine, non solo in caso di sospetta leishmaniosi, ma in corso di qualsiasi altra patologia. Gli esami di laboratorio più comunemente impiegati sono di seguito brevemente descritti:

a. Esame emocromocitometrico

L'esame emocromocitometrico o emocromo viene impiegato per valutare il numero degli elementi corpuscolati presenti in un campione di sangue di volume noto. Dopo aver effettuato il prelievo (dalla vena cefalica, giugulare o safena), il sangue viene immesso in una provetta contenente una sostanza anticoagulante (EDTA, eparina) e conservato refrigerato fino al momento del test. La conta delle cellule può essere effettuata manualmente attraverso l'utilizzo di una camera contaglobuli (camera di Burkner) o automaticamente mediante apparecchiature elettroniche, che permettono di analizzare un campione in poche decine di secondi e forniscono diversi parametri ematologici per stabilire se esistono alterazioni a carico delle cellule del sangue.

I valori ematologici di riferimento nel cane sono i seguenti:

Globuli rossi (RBC): $5.5-8.5 \times 10^6/\mu\text{l}$

Globuli bianchi (WBC): $6-17 \times 10^3/\mu\text{l}$

In corso di leishmaniosi, infatti, in oltre il 50% dei casi, si riscontra anemia normocromica normocitica. Si ritiene che fenomeni autoimmunitari siano alla base di questa anemia, nonché della riduzione della vita media delle emazie e dell'eritrofagocitosi.

In corso di leishmaniosi, inoltre, si può osservare piastrinopenia e piastrinopatia, da cui potrebbero dipendere gli episodi di emorragie spontanee che si osservano nel 12% dei casi.

b. Velocità di eritosedimentazione

La valutazione della velocità di eritosedimentazione (VES) si basa sulla misurazione della rapidità con cui le componenti corpuscolate del sangue (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine) sedimentano nel plasma. Dopo il prelievo il sangue mescolato con un anticoagulante viene posto in una provetta lunga e stretta; dopo circa un'ora si calcola la velocità di sedimentazione o si fa la media dei valori dopo una e due ore dal prelievo. Nel cane la VES normale è di 0.5 mm nella prima ora.

In corso di leishmaniosi, l'aumento della VES è dovuto alla formazione di aggregati di globuli rossi ("rouleaux") che hanno dimensioni e peso specifico superiori alle singole emazie e per tale motivo presentano maggior velocità di sedimentazione..

L'aumento della VES si osserva in presenza di elevati livelli plasmatici di gammaglobuline e di alfa globuline, nonché in corso di anemia; anche la presenza di immunocomplessi di membrana favorirebbe l'aggregabilità degli eritrociti. Da ciò si può comprendere il motivo per cui in corso di leishmaniosi la VES appare particolarmente elevata.

c. Formolgelificazione

La formolgelificazione è una prova di labilità colloidale del siero. Questa prova valuta l'aggregabilità delle proteine presenti nel siero in presenza di formalina. La prova è di facile esecuzione, rapida e poco costosa. Si esegue aggiungendo 2 gocce di formalina al 37% ad 1 ml di siero e agitando. Nel giro di pochi minuti, nei campioni di soggetti con leishmaniosi, si assisterà alla completa gelificazione del siero che assume colore lattescente e aderisce al fondo della provetta. La gelificazione del siero dipende dall'alterata distribuzione e quantità di proteine sieriche, in

particolare dall'aumento delle gammaglobuline (immunoglobuline) e dalla diminuzione delle albumine.

Si considerano negativi, o perlomeno scarsamente indicativi, campioni che gelificano in un tempo che supera i 30 minuti.

d. Proteine totali e Tracciato elettroforetico

L'elettroforesi delle proteine sieriche permette di identificare le proteine del siero nelle sei frazioni principali: albumine, alfa- globuline e alfa2- globuline, beta1- globuline e beta2- globuline, gamma-globuline. Variazioni nelle percentuali assolute e relative di tali frazioni sono caratteristiche di diversi stati patologici.

La metodica usata è l'elettroforesi su gel di agarosio. Le proteine separate mediante corsa elettroforetica vengono successivamente colorate. I tracciati elettroforetici così ottenuti vengono letti con un densitometro che trasforma le bande proteiche in picchi di altezza diversa, con base larga o stretta a seconda della loro intensità di colorazione e della loro larghezza. Tali variazioni riflettono le proporzioni quantitative delle diverse proteine contenute nel siero. Il protidogramma fisiologico di un cane sarà rappresentato da diversi picchi e curve: il primo, più alto e stretto è quello delle albumine, seguito da quelli molto bassi delle α_1 , α_2 , β_1 e β_2 -globuline; per ultime si posizioneranno le gamma-globuline con una curva bassa e larga. Aumenti o diminuzioni in altezza o nel numero di tali "picchi", sono quindi da mettere in relazione all'aumento o alla diminuzione, assoluta o relativa, patologica o fisiologica delle diverse componenti delle proteine del sangue.

Valori fisiologici nel cane

Proteine totali	6-8 g/dl	
Rapporto A/G	1-1,5 g/dl	
Albumine	3-4,8 g/dl	50-60 %
Globuline alfa-1	0,12-0,36 g/dl	2-4,5 %
Globuline alfa-2	0,24-0,80 g/dl	2-4,10 %
Globuline beta	0,6-1,8 g/dl	10-22,5 %
Globuline gamma	0,48-1,2 g/dl	8-15 %

Nel 55% dei casi di leishmaniosi le proteine totali appaiono aumentate oltre gli 8 g/dl. Tale valore può talora raggiungere oltre 13 g/dl ed è dovuto esclusivamente alla frazione globulinica. Il contemporaneo aumento della frazione gammaglobulinica per gli intercorrenti fenomeni immunitari fa sì che il rapporto albumina e globulina (A/G), si riduca notevolmente. Nel caso di gravissima compromissione renale (come nell'amiloidosi), il valore delle proteine totali può essere sotto la norma (<6g/dl). La frazione albuminica risulterà pertanto notevolmente diminuita sia relativamente all'aumento della frazione gammaglobulinica e delle proteine totali, sia in senso assoluto (per ridotto assorbimento enterico, diminuita sintesi epatica e perdita a livello dell'emuntorio renale). Visto il notevole aumento della frazione gammaglobulinica, è più corretto parlare di ipergammaglobulinemia. In particolare si osserva un aumento a carico delle IgM e ancor più delle IgG.

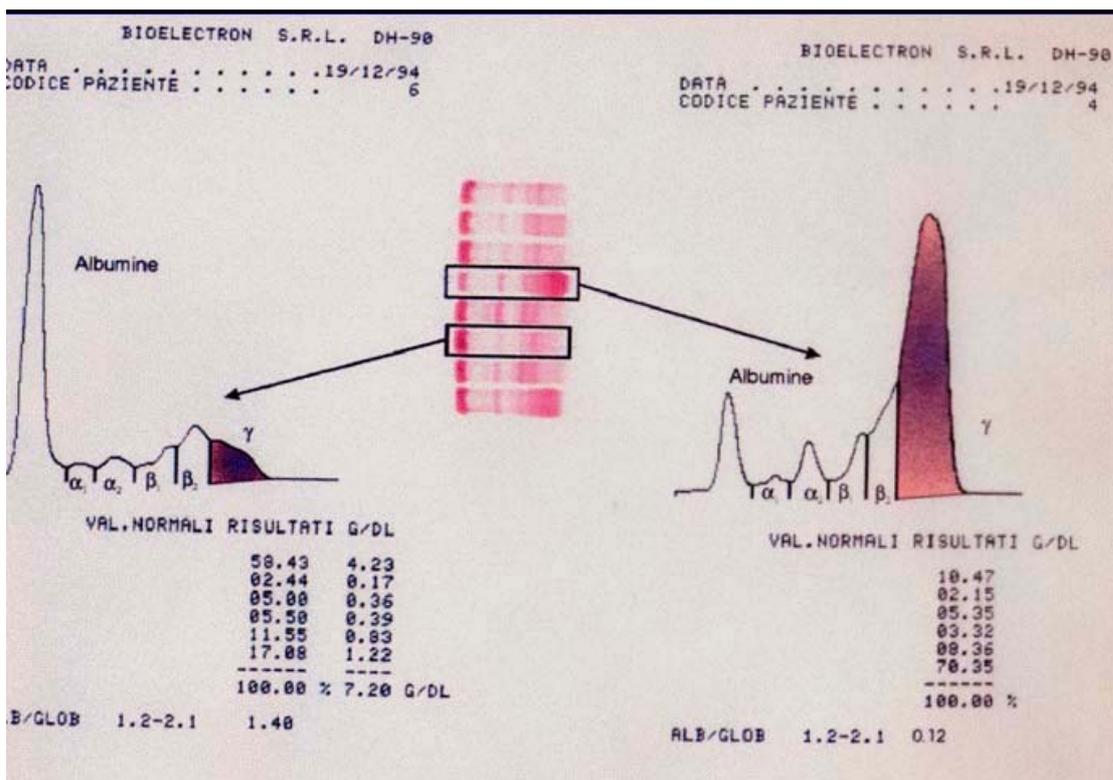
Il tracciato elettroforetico in generale mostrerà una banda di minore intensità corrispondente alle albumine ed una di maggiore intensità corrispondente alle globuline.

Le betaglobuline, soprattutto le beta2, possono risultare aumentate e nel tracciato elettroforetico sono talvolta difficili da separare dalle gammaglobuline. L'alterazione delle betaglobuline viene considerato indice di stadio cronico di malattia. Infatti, con il trattamento, è possibile ridurre marcatamente le gammaglobuline, ma è più difficile che le betaglobuline tornino a valori normali.

In corso di sindromi nefrosiche anche le albumine saranno notevolmente diminuite. L'ipoalbuminemia è infatti uno dei parametri clinici di sospetta leishmaniosi, soprattutto se le proteine totali sono superiori a 7-8 g/dl e si assiste al contemporaneo aumento delle betagammaglobuline.

Il tracciato elettroforetico deve essere continuamente monitorato nei cani leishmaniotici sottoposti a terapia, poiché offre la possibilità di controllare l'effettivo miglioramento o l'eventuale insorgenza di recidive, come anche di valutare l'utilità della ripresa dei cicli di trattamenti o, viceversa, la loro sospensione.

-Confronto di un tracciato elettroforetico di un cane normale e di uno con leishmaniosi.



e. Funzionalità renale

In corso di leishmaniosi canina l'alterazione dei meccanismi di difesa aspecifici e specifici, e la massiccia presenza di immunocomplessi circolanti costituiscono i meccanismi determinanti le variegate manifestazioni cliniche della malattia. Le lesioni organiche più frequenti sono quelle legate alla precipitazione di immunocomplessi, in diversi distretti, tra i quali i reni.

La valutazione del danno renale in corso di leishmaniosi canina si basa sulla determinazione dell'azotemia, della creatininemia, della calcemia, fosforemia, esame completo delle urine, proteine totali ed elettroforesi delle proteine sieriche.

1. Azotemia e creatininemia

Con il termine azotemia si indica la misurazione dell'urea nel sangue, prodotto di scarto del metabolismo delle proteine che viene eliminato quasi esclusivamente dai reni. Per questo motivo l'azotemia viene considerata indice della funzionalità renale.

La creatininemia rileva il tasso ematico di creatinina, che è un prodotto endogeno del metabolismo muscolare. Il suo valore aumenta nei casi d'insufficienza renale in maniera analoga all'urea.

I valori fisiologici di riferimento nel cane sono i seguenti:

azotemia: 15-40 mL/dL

creatinemia: 0.5-1.5 mL/dL

Quando il danno renale interessa o supera il 75% dei nefroni si ha l'aumento dei valori sierici dell'azoto e della creatinina, indipendentemente dal tipo di lesione. Questi valori non sono quindi correlati alla natura e al tipo di lesione ma la loro determinazione ha importanza prognostica. Il loro valore infatti, può suggerire il dosaggio iniziale dei farmaci per il trattamento. Livelli ematici elevati e persistenti di questi parametri, nonostante la terapia, depongono in genere per una evoluzione infausta della malattia. Il dosaggio sierologico dell'azoto e della creatinina offre informazioni sulle condizioni renali del paziente e non va mai disgiunto dall'esame delle urine, dalla determinazione delle proteine totali e dall'elettroforesi del siero.

2. Esame delle urine

La proteinuria indica la presenza di proteine nell'urina. In condizioni fisiologiche le proteine ematiche, globuline ed albumine non superano la barriera renale a causa delle loro dimensioni per cui si ritrovano solo in tracce nelle urine. In condizioni di danno renale la barriera non è più efficiente per cui le proteine possono attraversarlo.

Nei cani leishmaniotici il riscontro di proteinuria (di solito di tipo misto cioè dovuta a danno glomerulare e tubulare) è l'alterazione laboratoristica più frequente (80% dei casi). Proteinuria elevata può essere riscontrata anche quando gli indici azotemici e creatininemici sono normali. Un criterio quantitativo per la valutazione del danno renale consiste nella determinazione del rapporto ($PU_{\text{proteinuria}}/CU_{\text{creatinina urinaria}}$). Valori PU/CU inferiori a 0.5 sono indicativi di proteinuria non significativa, quelli compresi tra 0.5 e 0.7 indicano un valore dubbio, mentre maggiori di 0.7 rappresentano una proteinuria conclamata. Proteinurie elevate si osservano nei rari casi in cui la leishmaniosi si accompagna all'amiloidosi renale.

Nei cani affetti da leishmaniosi, l'esame quantitativo della proteinuria ha notevole valore soprattutto nel follow-up in corso di trattamento, poiché fornisce al clinico un elemento di valutazione dell'efficacia della terapia adottata.

L'esame del sedimento urinario è un esame qualitativo che, seppure non definisce il danno glomerulare, è in grado di evidenziare quello tubulo-interstiziale poiché permette l'identificazione di cilindri granulosi e cerei.

f. Funzionalità epatica

Gli esami per la valutazione della funzionalità epatica includono una varietà di test biochimici che valutano le condizioni del fegato sulla base delle concentrazioni sierologiche degli enzimi epatici.

I valori fisiologici di riferimento nel cane sono i seguenti:

ALT: 10-94 UI/L

ALP: 0-90/ UI/L

In corso di leishmaniosi si assiste all'interessamento patologico del fegato in quanto organo provvisto di cellule appartenenti al SRE. D'altra parte i danni al parenchima epatico sono modesti e mal rilevabili. Solo nel 15% dei casi la SGPT(transaminasi gluttamico-piruvica) e ALT(alanina aminotransferasi) risulta alterata, mentre la AP o ALP (fosfatasi alcalina) aumenta nel 23% dei casi.

ESAMI SPECIFICI

Gli esami specifici si dividono in **diretti**, volti a mettere in evidenza la presenza di uno specifico patogeno ed **indiretti** volti alla ricerca di anticorpi specifici nei confronti di un patogeno.

Gli esami **diretti** per la diagnosi di leishmaniosi includono i metodi parassitologici classici (esami biotici, esami colturali e prove biologiche) e quelli che si avvalgono di metodiche biomolecolari per la ricerca di sequenze target di DNA di *Leishmania* (PCR classica, PCR Nested, PCR quantitativa).

Tra gli esami indiretti, i più importanti sono: l'immunofluorescenza indiretta (IFAT) e l'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

a. Esami biotici

Gli esami biotici sono di facile esecuzione e sono gli unici a fornire diagnosi di certezza.

Si tratta di esami divenuti ormai di routine ed indispensabili.

Gli esami biotici di uso più comune sono:

- Aspirato linfonodale ad ago sottile;
- Impressione diretta del derma da lesioni ulcerative;
- Impressione del derma per raschiamento;
- Impressione del derma cutaneo dopo prelievo con forbice;
- Biopsia midollare (sternomiocentesi);
- Biopsia splenica.

1. Aspirato linfonodale ad ago sottile



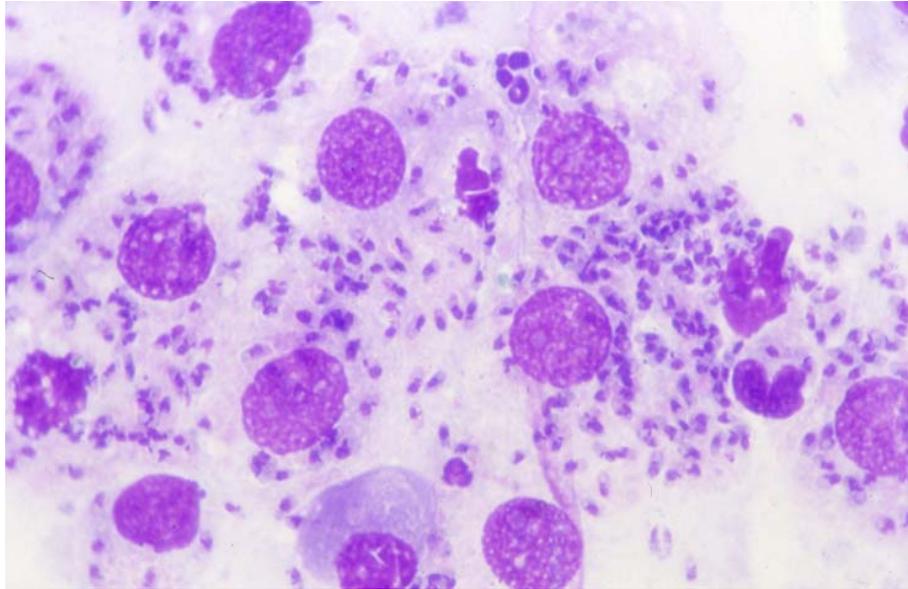
Si preferisce effettuare l'aspirazione ad ago sottile dai linfonodi prescapolari o poplitei.

Si introduce l'ago nel linfonodo e mentre si aspira gradualmente con il corpo della siringa, si muove lateralmente, avanti ed indietro l'ago. Una volta effettuata la massima aspirazione, senza estrarre l'ago dal linfonodo, si lascia che lo stantuffo della siringa torni al punto di partenza. Si estrae quindi la siringa. Piccole quantità di materiale si rendono a questo punto visibili nel cono dell'ago o della siringa. Anche se non visibile, una piccola quantità di aspirato linfonodale è sicuramente presente all'interno dell'ago stesso. Si disconnette allora l'ago dalla siringa e si aspirano 10 cc d'aria, si reinserisce l'ago, e si preme velocemente e decisamente lo stantuffo in modo che il materiale presente nell'ago si depositi su un vetrino portaoggetti nuovo. Una volta sul vetrino, si striscia il materiale con l'ausilio di un altro vetrino portaoggetti. Si ripete l'operazione su di un secondo vetrino.

La stessa tecnica di prelievo può essere agevolmente eseguita introducendo l'ago non raccordato alla siringa.

Di solito con un solo prelievo si riescono a preparare 2-3 vetrini di tessuto aspirato.

Dopo aver effettuato lo striscio linfonodale si procede alla colorazione dei vetrini (Giemsa o May Grunwald-Giemsa) ed alla loro osservazione al microscopio ottico con obiettivo a 40X o 100X. I parassiti (allo stadio di amastigoti) che vengono trovati liberi nello spazio intercellulare nella maggior parte dei casi a seguito della rottura dei macrofagi durante la preparazione dello striscio, sono in numero esiguo ed appaiono colorati in rosso-violetto. Ancor più raro è il reperto di leishmanie all'interno dei macrofagi.



b. PCR

L'impiego di metodiche di biologia molecolare ha consentito di migliorare notevolmente l'attendibilità di test diagnostici per la leishmaniosi canina. In particolare la PCR (**Polymerase chain reaction, PCR Nested, PCR real time**) si è dimostrata estremamente utile e preziosa.

La PCR può essere allestita partendo da campioni di sangue intero, aspirato linfonodale, midollo osseo, cute o altri tessuti biotici come materiale esfoliativo congiuntivale mediante l'uso di un tampone sterile, da uno o, meglio, entrambi gli occhi del paziente.

I primers da impiegare in corso della PCR, possono essere universali per il genere *Leishmania*, oppure specie-specifici. Questi ultimi consentono di identificare la specie di *Leishmania* responsabile dell'infezione.

La PCR è estremamente utile, poiché consente una più semplice lettura dei risultati rispetto all'osservazione diretta di strisci o colture o delle indagini sierologiche. Può fornire inoltre valide indicazioni sull'evoluzione della patologia e sull'efficacia del trattamento. Soprattutto si rivela molto attendibile e precisa negli stadi precoci di infezione.

c. Esami sierologici

Gli esami sierologici di più largo impiego sono i seguenti:

1. Immunofluorescenza indiretta (IFAT)

L' IFAT è un test di rapida e semplice esecuzione, fornito di specificità e sensibilità elevate. Questa metodica utilizza come antigeni promastigoti di *Leishmania* fissati su un apposito vetrino.

I sieri positivi conferiscono una netta fluorescenza ai promastigoti ed al flagello.

Il valore soglia per il sospetto dello stato di infezione da *Leishmania infantum* nel cane è considerato 1:40, mentre una positività alla diluizione di 1:80 è indice infezione in atto. Tuttavia tale valore può variare a seconda dei laboratori e dallo stato di endemicità della malattia. Nonostante le difficoltà di interpretazione che comporta, l'IFAT è un test relativamente economico e tutt'oggi è considerata la metodica gold standard.

Alla lettura del vetrino al microscopio ottico i promastigoti di *Leishmania* appariranno fluorescenti **(vedere allegato A)**.

2. Kit immunocromatografici rapidi (Dipstick Test)

Negli ultimi anni si sono resi disponibili sul mercato kit rapidi basati su tecniche immunocromatografiche che impiegano anticorpi monoclonali (IgG) anti-cane stratificati su oro colloidale e antigeni di *Leishmania* spp.

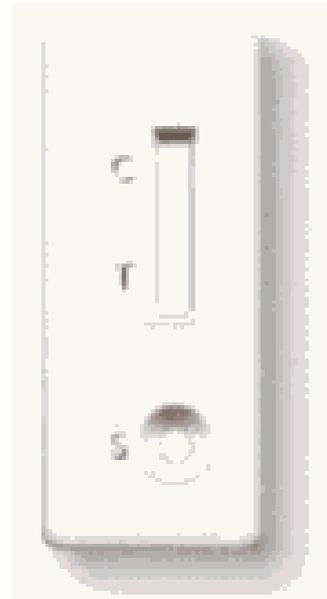
La prova è di semplice esecuzione e si basa sulla migrazione spontanea degli anticorpi che si verifica a partire dalla goccia di siero o sangue diluito con un apposito buffer che si pone sul disco d'oro colloidale.

La migrazione del complesso in una zona di reazione nella quale è stato stratificato l'antigene determina in caso di positività del test, una linea di precipitazione che può essere agevolmente visualizzata e confrontata con la vicina linea di controllo (che deve essere sempre presente, in quanto indica che il test è stato eseguito correttamente). In caso di negatività del test si ha solo la precipitazione della linea di controllo, mentre nei casi dubbi si possono osservare delle anomalie delle bande di reazione. Il "successo" di questi test si basa sul fatto che sono confezionati singolarmente e sono molto rapidi nel fornire il risultato (circa 10 minuti).

Di recente, è stato messo a punto un test immunocromatografico basato sull'antigene ricombinante rK39 per la diagnosi della leishmaniosi viscerale umana da *L. infantum*, da *L. donovani* e da *L. chagasi*, che ha mostrato una sensibilità variabile dal 67 al 100% e una specificità dal 97 al 100%.

Per approfondimenti consultare la pagina web:

<http://www.leishmania.org>



RICERCA DI EMOPROTOZOI

a) Esami diretti

La ricerca diretta del parassita è indispensabile ai fini diagnostici e si effettua a partire da uno striscio di sangue periferico prelevato nel periodo acuto febbrile. Il test può essere eseguito allestendo strisci sottili o strisci spessi e colorandoli con Giemsa o May-Grunwald Giemsa.

La colorazione di Giemsa si avvale dell'uso di un solo colorante, mentre per la colorazione di May-Grunwald Giemsa ne vengono impiegati due. Quest'ultima consente anche di valutare la formula leucocitaria. L'allestimento di strisci può essere effettuato anche a partire dal buffy-coat, poiché gli eritrociti parassitati hanno un peso specifico più vicino a quello dei leucociti.

Mediante queste due colorazioni si ricercano alcuni dei più comuni emoprotozoi:

1. *Trypanosoma spp.* che appare colorato in rosso-fucsia, ha dimensioni di 10-30 x 2-4 μm , con estremità caudale generalmente acuta, membrana ondulante e flagello libero.
2. *Babesia spp.* che appare colorato in blu e con granuli di cromatina rossi, ha dimensioni di 2-3 μm , ed aspetto piriforme o ad anello a seconda della specie.
3. *Anaplasma spp.* che appare colorato uniformemente di colore rosso, ha forma di un piccolo corpo rotondo dalle dimensioni di 0.3-0,5 μm all'interno di globuli rossi. La posizione all'interno dell'emazia (centrale o marginale) permette di distinguerne la specie.
4. *Hepatozoon canis* - La diagnosi si basa sul rinvenimento dei gametociti dalla caratteristica forma a capsula nel citoplasma dei granulociti neutrofili. Si presenta di colore azzurro con addensamenti violacei.
5. *Theileria spp.* – per una corretta diagnosi è più conveniente partire da un puntato linfonodale (al fine di mettere in evidenza i corpi di Koch).
6. *Leishmania infantum* - Le leishmanie si presentano colorate in rosso nello spazio intercellulare o all'interno dei macrofagi integri.

b) Metodiche biomolecolari

Attualmente per la ricerca degli emoprotozoi le applicazioni di indagini biomolecolari come la PCR (Polymerase chain reaction, PCR Nested, PCR real time) sono diventate di uso comune per l'estrema sensibilità e rapidità di esecuzione.

c) Esami indiretti

Gli esami indiretti prevedono l'uso di tecniche sierologiche che consentono di evidenziare anticorpi specifici (i.e. anti-*Babesia* o anti-*Anaplasma*). I test immuno-diagnostici maggiormente usati sono l'IFAT e l'ELISA, che risultano particolarmente utili nel corso di indagini epidemiologiche su popolazioni in aree endemiche e non endemiche. I diversi test sierologici presentano differenze in relazione alla specificità, alla semplicità di esecuzione e al costo. Queste caratteristiche fanno oscillare le preferenze verso l'uno o l'altro metodo, anche in relazione al campo di applicazione. L'ELISA è un test molto sensibile e, rispetto all'IFAT, ha il vantaggio di consentire una lettura oggettiva (mediante spettrofotometro) dei risultati. Inoltre non dà cross-reazioni con altri emoparassiti.

I protozoi del genere *Babesia*, (Sporozoasida, Piroplasmida), sono organismi intracellulari che provocano malattia in tutti gli animali domestici e talvolta anche nell'uomo. Sono responsabili di patologie dalla sintomatologia complessa più delle volte caratterizzata da anemia ed emoglobinuria. L'esame degli strisci di sangue consente di osservare i parassiti all'interno delle emazie. In genere essi si presentano singoli od accoppiati, con caratteristica forma a pera, apici congiunti a formare un angolo acuto con lunghezza superiore al diametro dei globuli rossi (*B. bigemina*) o di forma piriforme, ad anello, ellissoidali o rotondeggianti ma di lunghezza inferiore al raggio delle emazie nelle altre specie.

Nel gatto *Babesia felis* assume forma ellittica o ad anello e, moltiplicandosi per divisione quaternaria determina la disposizione di nuovi elementi "a croce di Malta".

Altrettanto caratteristica è la disposizione che *Babesia canis* assume all'interno delle emazie di cani infetti. Essa si presenta in forma ad anello od ameboide ed in numerosi elementi, fino a 16 per emazia.

Le Theilerie sono protozoi che si riproducono per schizogonia nei linfociti T e, si pensa, anche negli istiociti e nelle cellule endoteliali di animali infetti.

Negli strisci colorati con Giemsa si osservano, talvolta numerose theilerie, all'interno degli eritrociti, con forma a bastoncino di 2 μ di lunghezza e 1 μ di larghezza, ma possono presentarsi anche con forme a virgola, tondeggianti o ad anello. Il citoplasma dei protozoi appare basofilo con un puntino di cromatina colorato di rosso ad un'estremità. Nel citoplasma dei linfociti si possono osservare i macro e microschizonti. I primi, basofili, presentano fino ad otto nuclei e un diametro di circa 8 μ , i secondi di analoghe dimensioni ma contenenti numerosi nuclei, fino a 36, di piccole dimensioni. Dai microschizonti, in seguito alla rottura della cellula infetta si liberano i micromerozoiti che andranno ad invadere i globuli rossi.

Theileria equi ha forma ellittica o ad anello e moltiplicandosi per divisione quaternaria determina la disposizione di nuovi elementi "a croce di Malta".

RICERCA DI MICROFILARIE NEL SANGUE

La diagnosi si basa su esami diretti, che mirano alla ricerca e all'identificazione microscopica delle microfilarie nel sangue o mediante tecniche di biologia molecolare e su esami indiretti per la ricerca di anticorpi specifici contro gli antigeni rilasciati dagli adulti di *Dirofilaria immitis* nel torrente circolatorio.

Tra gli esami parassitologici diretti i più usati sono: esame a fresco a goccia spessa e concentrazione mediante metodica di Knott.

a. Esame a fresco a goccia spessa

Questo test ci consente di rilevare le microfilarie di *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* nel sangue. Esso consiste nel porre 1 o 2 gocce di sangue (20-40 μ l) al centro di un vetrino portaoggetti (preventivamente sgrassato con alcool) in un'area di circa 1,5 cm di diametro.

Successivamente si appoggia un vetrino coprioggetto (24 x 24 mm) sulla goccia di sangue e il preparato viene immediatamente osservato al microscopio ottico a piccolo ingrandimento (4X o 10X). All'osservazione, le microfilarie vive e vitali potranno essere facilmente.

b. Knott modificato: esame per arricchimento

Il campione di partenza per questo test è costituito da sangue intero.

Ad un volume di sangue pari a 2.0 -3.0 mL di sangue vengono aggiunti 6.0- 7.0 mL di acqua distillata (o formalina tamponata al 2%) per determinare l'emolisi delle emazie. La provetta (del volume di 10 mL) viene agitata al fine di accelerare la lisi degli eritrociti, quindi viene sottoposta a centrifugazione (3.000 rpm per 5 minuti).

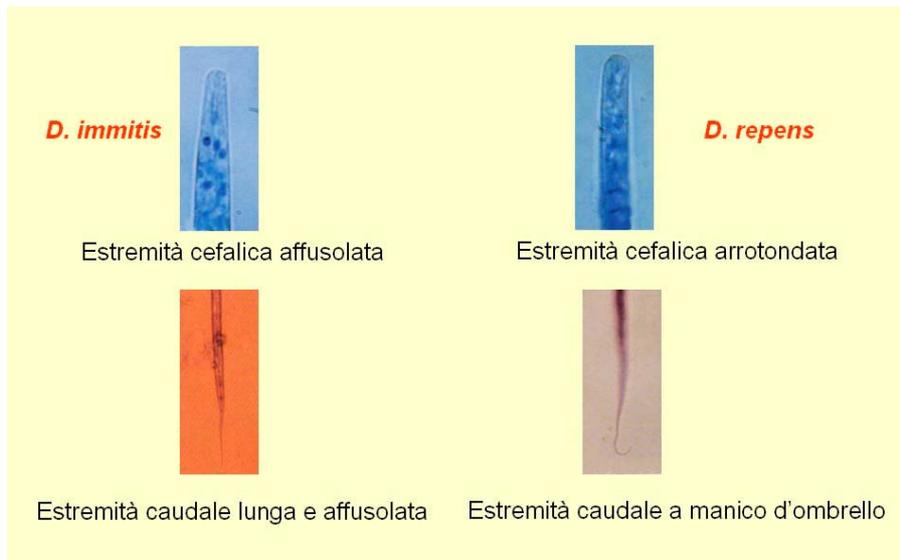
Dopo aver allontanato il sovrantante (pari a 6.0-7.0 mL), viene aggiunto un volume di acqua distillata pari a quello del sedimento e si ripete l'operazione fino a quando il liquido non appare completamente trasparente e sul fondo si deposita del materiale omogeneo. Dopo l'ultima centrifugazione si allontana il sovrantante e si aggiunge al sedimento una soluzione di blue di metilene all'1‰ (3-4 gocce).

Il colorante provoca la morte e distensione delle microfilarie e ne colora i tessuti, consentendone una facile identificazione.

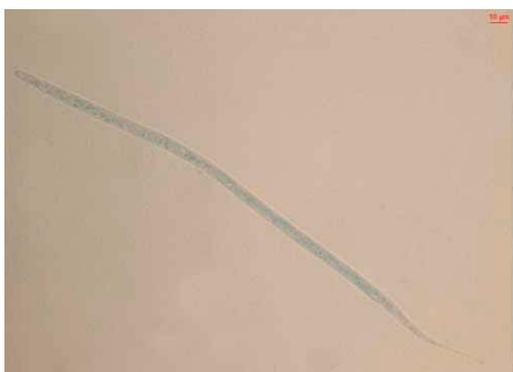
Inoltre il blue di metilene conferisce una colorazione celeste che consente di poter evidenziare meglio le microfilarie sul fondo del preparato. L'identificazione di specie viene eseguita valutando le caratteristiche morfologiche dell'estremità cefalica e dell'estremità caudale, del diametro e della lunghezza delle microfilarie (Tabella 1).

Tabella 1. -Diagnosi differenziale delle microfilarie rilevabili nel sangue circolante.

Specie	Lunghezza	Larghezza	Estremità cefalica	Estremità caudale
<i>Dirofilaria immitis</i>	300-330 μ	6-7 μ	Affusolata	Dritta e appuntita
<i>Dirofilaria repens</i>	345-365 μ	7.0-7.5 μ	Arrotondata	A manico d'ombrello
<i>Dipetalonema grassii</i>	570 μ	13 μ	Arrotondata	Uncinata
<i>Dipetalonema reconditum</i>	250-270 μ	4.2-5.6 μ	Asimmetrica con uncino cefalico	Bottenuta



Microfilarie di *Dirofilaria immitis* ritrovate attraverso la metodica di Knott



Microfilaria di *Dirofilaria immitis*



Microfilaria di *Dirofilaria repens*

c. Esami sierologici

Gli esami sierologici hanno il vantaggio di svelare i casi di infezioni occulte o caratterizzate da microfilariosi modeste o addirittura assenti (zone non endemiche).

I test attualmente in commercio sono numerosi ma essenzialmente riconducibili a 2 tipi, quello immunoenzimatico basato sulla tecnica ELISA e quello di immunomigrazione (test rapidi).

I test ELISA si avvalgono di anticorpi monoclonali specifici nei confronti di antigeni di *D. immitis* e anticorpi anti-specie coniugati all'enzima perossidasi in grado di dare una reazione colorimetrica con l'aggiunta di un substrato. La positività della reazione può essere valutata visivamente o mediante l'impiego dello spettrofotometro.

I test rapidi (immunomigrazione) ampiamente utilizzati nella pratica professionale da parte dei medici veterinari (SNAP test), possono essere acquistati in confezioni monouso, sono semplici da usare e hanno tempi di lettura brevi (10 minuti).

La ricerca di anticorpi contro antigeni somatici è di fondamentale importanza per valutare l'efficacia del trattamento adulticida. Dopo il trattamento è infatti consigliabile ripetere il test per verificarne la negativizzazione, prova certa dell'efficacia del trattamento macrofilaricida.



ESAME COPROLOGICO

Numerosi parassiti che vivono nell'apparato gastro-intestinale, bronco-polmonare e nei dotti biliari dell'ospite vertebrato producono uova, oocisti, o larve che liberano nell'ambiente esterno attraverso le feci. L'identificazione avviene attraverso l'esame coprologico ed è indispensabile per una corretta diagnosi parassitologica.

L'esame coprologico comprende un esame macroscopico ed uno microscopico e può essere qualitativo e/o quantitativo.

La ricerca di criptosporidi e larve L₁ di strongilidi bronco -polmonari si avvale di particolari metodiche che saranno trattate separatamente.

Un corretto campionamento è fondamentale affinché il risultato dell'esame coprologico sia sufficientemente attendibile.

a. Prelievo del campione

Il prelievo delle feci di cani e gatti viene effettuato direttamente dal terreno o dalla lettiera, avendo cura di escludere materiale estraneo. L'utilizzo del bulbo del termometro per il prelievo delle feci direttamente dall'ampolla rettale infatti non consente di raccogliere una quantità sufficiente di campione per lo svolgimento dell'esame.

Il prelievo delle feci degli animali da reddito viene invece effettuato direttamente dall'ampolla rettale per evitare di raccogliere larve e/o uova di nematodi e di artropodi che possono essere presenti nel terreno come contaminanti e che possono quindi confondere la diagnosi.

La quantità di feci "fresche" da prelevare per l'esame microscopico deve essere superiore ai 10-20 g.

I campioni emessi o raccolti dopo più di 48 ore sono disidratati e possono risultare di difficile interpretazione diagnostica per le modificazioni morfologiche degli elementi parassitari. In caso fosse necessario, il campione può essere conservato per 2-3 giorni a temperatura di refrigerazione (4°C) o più a lungo in soluzione di formalina al 10% a temperatura ambiente.

b. Esame macroscopico

L'esame macroscopico consiste nella valutazione delle caratteristiche fisiche del campione fecale e può fornire informazioni utili sulla funzionalità del tratto digerente dell'animale. Infatti, con l'analisi macroscopica è possibile evidenziare sia la presenza di residui alimentari indigeriti o insufficientemente digeriti (i.e. frammenti di mucosa, fiocchi di muco e materiale ematico). Adulti di anchilostomi, ascaridi, tricocefali e proglottidi di cestodi (i.e. *Taenia* spp., *Dipylidium caninum*, *Anoplocephala* spp. e *Moniezia* spp) possono essere macroscopicamente visibili nel campione fecale. In particolare, le proglottidi di alcuni cestodi si rendono facilmente individuabili per i caratteristici movimenti contrattili.

Nelle feci deposte e raccolte dal terreno è possibile talvolta rilevare la presenza di grosse uova (spesso impacchettate) o di larve dal colore bianco, spesso mobili, che rappresentano fasi del ciclo vitale di alcuni ditteri causa di miasi (miasi fecale).

Le feci omogenee, solide o suddivise in scibale (in caso di stipsi) devono essere preventivamente stemperate, con un'apposita spatola, con soluzione fisiologica o acqua.

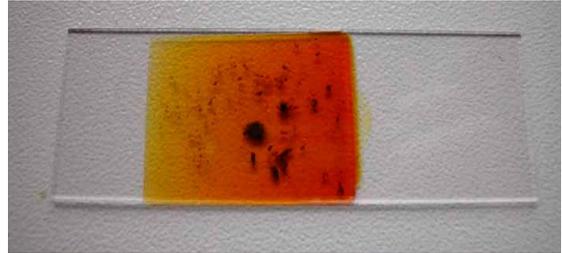
c. Esame microscopico a fresco

Con l'esame a fresco è possibile osservare oocisti, uova di nematodi, oncosfere di cestodi e talvolta alcuni protozoi intestinali.

L'esame si esegue stemperando su un vetrino una piccola quantità di feci con una goccia d'acqua (o soluzione fisiologica), al fine di ottenere un preparato omogeneo e trasparente. Un preparato microscopico può essere considerato ben riuscito, quando il materiale fecale deposto sul vetrino portaoggetti risulta più abbondante ad un'estremità e poi si assottiglia gradatamente fino ad esaurirsi del tutto poco prima di raggiungere l'altra estremità. Nel caso di negatività dell'esame, la presenza di parassiti non va comunque esclusa, vista la ridotta quantità di feci utilizzate. Si deve pertanto procedere ad un esame microscopico per arricchimento.

d. Esame microscopico a fresco previa colorazione

La colorazione si effettua utilizzando il liquido di Lugol (colorante a base di iodio) con cui si stemperano alcune ansate di materiale fecale in un vetrino da orologiaio fino ad ottenere un composto



omogeneo dal colore uniformemente bruno. Due ansate di questa sospensione vengono deposte su un vetrino portaoggetti e coperte con un vetrino coprioggetti. Dopo il trattamento iodico le forme vegetative di protozoi perdono la loro mobilità e possono quindi essere osservate a fresco.

Questa metodica consente di evidenziare trofozoiti e cisti di *Giardia* spp.



In particolare i trofozoiti di *Giardia* spp. appaiono di colore bruno mogano con corpo piriforme, dimensioni medie di 15 x 8 μ contenenti due nuclei, assostile, corpi parabasali e a volte è possibile osservare anche i flagelli (6 o 8).

Nell'area perinucleare è presente una depressione circolare detta disco adesivo, mediante la quale il protozoo aderisce all'orletto a spazzola delle cellule epiteliali duodenali.



Le cisti di *Giardia* spp. si presentano di forma ellittica, biancastre e rifrangenti di dimensioni medie di 12 x 8 μ . Con la colorazione di Lugol le cisti assumono colore che varia da giallastro fino a rosso mogano. Le cisti mature presentano due coppie di nuclei interni ognuna delle quali darà origine ad un trofozoite.

e. Esame microscopico previo arricchimento

L'arricchimento ha lo scopo di concentrare il maggior numero di uova (o altre forme parassitarie) nella minor quantità possibile di materiale fecale da analizzare. Tale esame permette di svelare la presenza di protozoi (stadi vegetativi e oocisti di coccidi), uova di nematodi (i.e. ascaridi, anchilostomi, strongili e tricostrongili), di digenea (*Fasciola spp.*, *Dicrocoelium spp.* e *Alaria spp.*), oncosferere di cestodi (tenie, anoplocefalidi) e occasionalmente larve di elminti.

L'arricchimento può essere effettuato per *sedimentazione* o per *flottazione*.

1. Sedimentazione

La tecnica per sedimentazione si utilizza quando si vuole svelare la presenza di uova di digenea (*Fasciola spp.* e *Paramphistomum spp.*).

La sedimentazione può essere spontanea, o ottenuta mediante centrifugazione a basso numero di giri (i.e. 600-1000 rpm). La prima, si effettua sospendendo le feci in acqua (o in soluzione di teepol al 5%) in un grande bicchiere conico e lasciando sedimentare spontaneamente per un tempo di circa 40-60 minuti. La sedimentazione mediante centrifugazione si effettua su un campione di circa 2 g di feci cui si aggiungono 7 mL di acqua. Dopo circa 5 minuti a 600-1000 rpm si elimina il surnatante e si esamina al microscopio il sedimento. Tale tecnica può, tuttavia, causare la sedimentazione di detriti fecali che possono rendere difficile la lettura del vetrino.

2. Flottazione

Questo metodo sfrutta il principio della differenza di peso specifico (p.s.) tra gli elementi parassitari e i detriti fecali. Gli elementi parassitari (oocisti, uova e oncosfere), quando immersi in una soluzione con peso specifico maggiore, tendono a salire in superficie, mentre i detriti fecali, essendo più pesanti, rimangono sul fondo della provetta. Le uova di molte specie di elminti hanno peso specifico compreso tra 1.080 e 1.400, per cui occorrono delle soluzioni aventi p.s. superiore a quello delle uova per ottenerne l'affioramento. Numerose sono le soluzioni che sono impiegate per l'esame coproscopico e a seconda dei loro differenti pesi specifici, rendono possibile distinguere differenti parassiti. Le soluzioni più comuni sono elencate di seguito, mentre la tecnica di allestimento dell'esame macroscopico e le tecniche di preparazione delle differenti soluzioni sono riportate negli allegati A e B.

- Soluzione a bassa densità, con p.s. intorno a 1.100 per la ricerca di oocisti di protozoi. Tale soluzione si ottiene effettuando una soluzione sovrasatura di cloruro di sodio (NaCl). Tale soluzione è molto semplice da preparare, ma instabile, poichè i valori di p.s. variano a seconda della temperatura (i.e. 1.120 a 10°C e 1.200 a 38°C).

- Soluzione a media-bassa densità con p.s. intorno a 1.200 per la ricerca di oocisti di protozoi e comuni uova di elminti. Tale soluzione è rappresentata da una soluzione acquosa al 33% di cloruro di zinco (ZnCl₂). La densità oscilla tra 1.180 e 1.250 (fino a raggiungere la densità di 1.350 aumentando la concentrazione di ZnCl₂). La soluzione tende però a schiumare, rendendo spesso poco agevole la lettura del vetrino, e altera la morfologia delle uova se lasciata per troppo tempo a contatto.

- Soluzioni a media densità, con p.s. intorno a 1.300 per la ricerca delle uova di tricostrongili, strongilidi gastro-intestinali e oncosfere di cestodi. Queste possono essere preparate in 3 modi:

- Soluzione costituita in parti uguali da cloruro di zinco e cloruro di sodio;
- Soluzione contenente il 36% di zucchero ed il 54% di nitrato di sodio (NaNO₃).
- Soluzione Tampieri contenente una miscela di zinco solfato e iodio mercurato di potassio.
- - Soluzioni ad alta densità, con densità intorno a 1.450 per la ricerca di uova dei Digenea (*Dicrocoelium dendriticum*, *Alaria alata*, *Fasciola* spp. e *Paramphistomun* spp.), uova di *Spirocerca lupi*, *Draschia megastoma*, *Habronema muscae* e oocisti di *Eimeria leuckarti*.
- Soluzione Iodio mercurato di potassio (K₂HgI₄) con densità pari a 1.450.

Le uova di *Fasciola hepatica* e *Paramphistomun* spp. con la soluzione di iodio mercurato appaiono alterate a causa della coartazione della cuticola esterna, pregiudicandone l'identificazione. Tale soluzione consente invece di evidenziare le uova di *Dicrocoelium dendriticum*.

f. Esame quali-quantitativo delle feci mediante camera di McMaster

Gli esami quantitativi permettono di valutare in maniera generale l'intensità dell'infestazione e quindi l'eventuale danno zootecnico.

Il numero di uova per grammo di feci non è sempre proporzionale al numero di parassiti adulti presenti nell'organismo in quanto tale rapporto può essere condizionato da vari fattori, non ultimo lo stato fisico del materiale fecale. Alcuni Autori per ovviare all'inconveniente consigliano di moltiplicare il numero delle uova per i seguenti fattori di correzione

FATTORI DI CORREZIONE	
fecce molli ma modellate	X 1,3
fecce pastose	X 2,0
fecce molli ma non liquide	X 3,0
Fecce diarroiche	X 4,0



Per effettuare la conta delle uova dei parassiti in una data quantità di materiale fecale ci si avvale della camera di McMaster.

Essa è formata da due vetrini sovrapposti delimitati tra loro da uno spazio di 1.5 mm. Sul vetrino superiore sono disegnati due quadrati di 1 cm di lato, per cui il volume delle camere sottostanti è di 0.30 mL (0,15 mL a camera). Ogni singola camera è attraversata da 6 corridoi, che rappresentano l'area dove saranno contate le uova.

Per effettuare il conteggio delle uova si procede nel modo seguente:

Materiale occorrente:

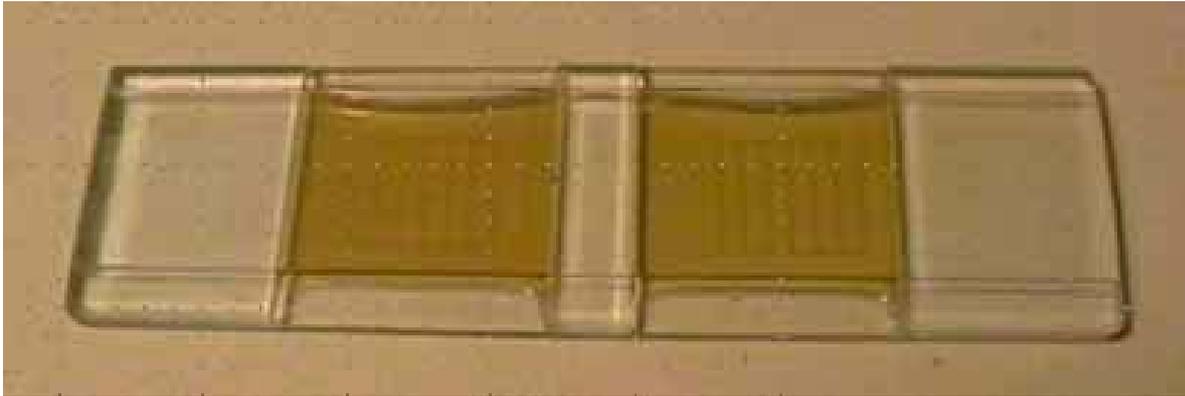
- bilancia
- camera di Mc Master
- mortaio e pestello
- bicchiere e becker
- garze e pipette Pasteur



Tecnica

- Si pesano 2.0 g di feci e si pongono nel mortaio;
- si aggiungono 28.0 mL della soluzione che si intende utilizzare (NaCl , ZnCl_2 , ZnSO_4); si agita energicamente fino a quando non si è ottenuta una soluzione omogenea;
- La soluzione fecale viene filtrata con garza a doppio strato e raccolta in un becker;
- con una pipetta Pasteur si preleva parte della soluzione avendo cura nell'effettuare questa operazione di applicare una rotazione continua all'interno del becker durante la fase di aspirazione del liquido;
- si posiziona la punta della pipetta in corrispondenza dell'intercapedine tra i due vetrini della camera facendo defluire il liquido che per capillarità si distribuirà omogeneamente;
- dopo aver lasciato riposare il preparato per qualche minuto, si esamina al microscopio a piccolo ingrandimento (4X o 10X);
- si contano tutte le uova/oocisti/larve comprese nel quadrato disegnato sul vetrino, (ossia nei sei corridoi) di ogni singola camera, e per ottenere il numero di uova per grammo di feci si applica questa formula:

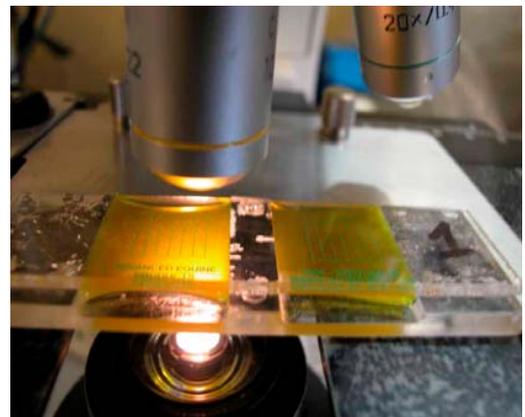
$$\text{u.p.g./o.p.g.} = \frac{\text{n}^\circ \text{ di uova totali}}{\text{X}} \times 100$$



Se ad esempio in entrambe le camere contiamo complessivamente 12 uova, occorre moltiplicare questo valore x 100 e dividerlo per 2. Il valore ottenuto sarà pari a 600 u.p.g.

Nel caso in cui non si dovesse osservare alcun uovo e/o oocisti, occorre confermare la negatività dell'esame attraverso la flottazione del liquido fecale non utilizzato per il riempimento della camera. La metodica di McMaster su descritta, infatti, ha una sensibilità pari a 50 u.p.g., pertanto cariche inferiori potrebbero essere interpretati come falsi negativi.

Il posizionamento del vetrino McMaster sul carrello traslatore del microscopio per la corretta visualizzazione del campione deve essere effettuato ricordando di utilizzare esclusivamente gli obiettivi 10X e 20X e non il 40X. Quest'ultimo, infatti potrebbe entrare in contatto con la parte superiore della camera danneggiandola.



g. Esame qualitativo delle feci mediante apparato di Baerman

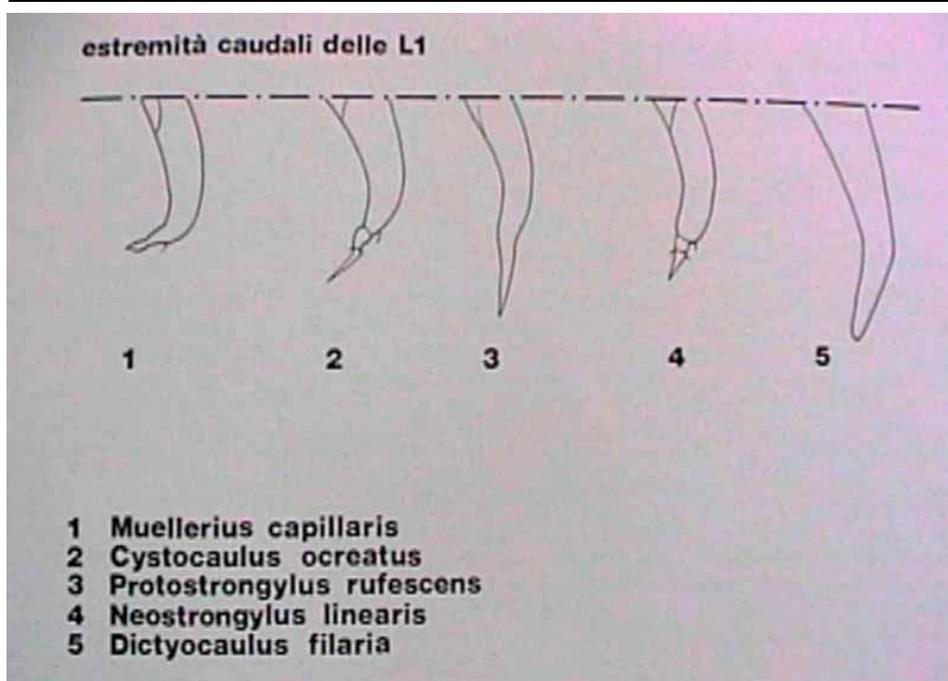


L'apparato di Baerman viene utilizzato per ricercare le larve (L₁) dei nematodi (protostrongilidi, dictyocaulidi e metastrongilidi), dotati di mobilità spontanea e spiccata idrofilia. Si può operare su campioni singoli o su pool di feci.

Tecnica

- a)** preparare pool di 5 campioni (utilizzando 5 g di ciascun campione) e porli direttamente su un rettangolo di garza;
- b.** chiudere il rettangolo con filo metallico morbido (da giardinaggio) a formare un sacchetto posizionare nell'imbuto non occludendo il foro di deflusione;
- c.** aggiungere acqua tiepida fino a riempire i 3/4 dell'imbuto e lasciare riposare per 24 ore;
- d.** aprire la valvola dell'imbuto e far fluire la soluzione fecale fin quasi a riempire una provetta a fondo conico da 10 mL;
- e.** centrifugare a 1.000 rpm per 5 minuti, allontanare il surnatante e aggiungere al liquido qualche goccia di soluzione iodica (acqua 100, ioduro di potassio 50, iodio cristalli 10);
- f.** raccogliere l'intero sedimento colorato con una pipetta ponendolo su un vetrino portaoggetti;

g. osservare al microscopio tutto il materiale, ricercare le larve di protostrongilidi e le larve di *Dictyocaulus*. Le caratteristiche morfologiche dell'estremità caudale delle larve (presenza/assenza di spine) consentono di differenziare le diverse specie.



Tratto da: Casarosa, 1997.

RICERCA DI CRYPTOSPORIDI

Mediante la colorazione di Ziehl Neelsen è possibile mettere in evidenza i cryptosporidi grazie alla loro proprietà di assumere e trattenere la fucsina basica resistendo al trattamento decolorante operato con acidi minerali e alcol.

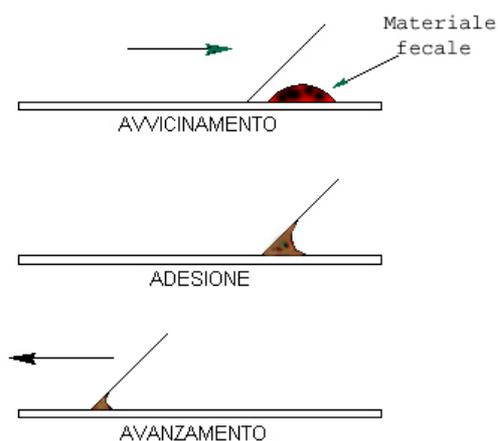
Colorazione di Ziehl Neelsen modificata

Materiale occorrente:

- alcool metilico (CH_3OH)
- fucsina fenicata
- verde malachite o blu di metilene
- alcol al 95% contenente il 3% di HCl
- acqua distillata

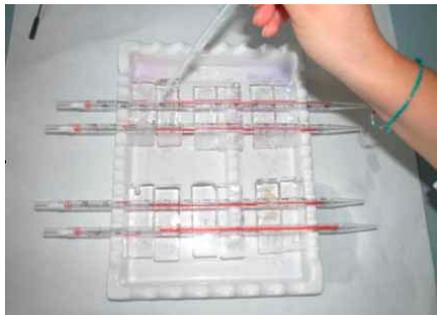
Tecnica:

1. stendere il materiale da esaminare su vetrino portaoggetti



Realizzazione di uno striscio fecale

2. essiccare e fissare il preparato (fissare con alcool metilico per 5 minuti);



3. versare la fucsina fenicata di Ziehl direttamente sul vetrino coprendolo completamente, e far reagire per 60 min;



4. lavare con acqua distillata;

5. decolorare con alcool al 95%, contenente il 3% in volume di HCl concentrato per 30 sec;

6. lavare con acqua distillata;

7. versare il colorante di contrasto, verde malachite o blu di metilene, e lasciare agire per 5 min;



8. lavare e asciugare.



9. osservare i preparati al microscopio ottico a forte ingrandimento.

I cryptosporidi appariranno colorati in rosso sul fondo blu o verde (in base al colorante di contrasto utilizzato).

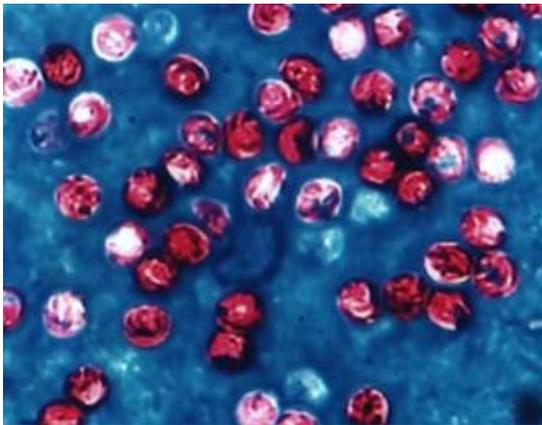


Immagine tratta da: <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Cryptosporidium>

Le oocisti di cryptosporidi possono essere talvolta confusi con pollini o spore di miceti e di lieviti che talvolta non assumono il colorante e presentano forme e dimensioni simili a quelle delle oocisti. Pertanto è indispensabile che l'operatore conosca la morfologia delle oocisti per evitare il rischio di falsi positivi o falsi negativi.

Recentemente sono stati immessi in commercio alcuni kit ELISA per la ricerca dei coproantigeni del parassita. Tali tecniche si rendono particolarmente utili in caso di screening di massa.

RICERCA DI TOXOPLASMA

La diagnosi di laboratorio della toxoplasmosi nel gatto (ospite definitivo) e negli altri animali domestici (ospiti intermedi) può essere diretta ed indiretta. La diagnosi diretta mira a evidenziare le oocisti di *Toxoplasma gondii* nelle feci del gatto. Tale diagnosi presenta notevoli difficoltà tecniche dovute alle dimensioni ridotte delle oocisti che inoltre non possono essere distinte da oocisti morfologicamente simili (*Hammondia heydorni* e *Besnotia besnoiti*), e al fatto che il gatto elimina le oocisti per un periodo di tempo molto limitato.

Le oocisti di *Toxoplasma gondii* appaiono di 10-12 μ di diametro, sferiche con doppia parete. Lo sporonte occupa buona parte del volume, mentre quando divengono mature (sporulazione) presentano all'interno 2 sporocisti di 5-6 μ ciascuna.



Durante la lettura di un campione è sempre bene ricordare che le oocisti di *Isospora felis* (40 X 30 μ di diametro) appaiono lievemente ellissoidali e quelle di *Isospora rivolta* (25-20 μ) appaiono sferiche.

In tutti gli altri animali ospiti intermedi la ricerca del parassita in tutti i suoi stadi evolutivi (tachizoiti, cisti contenenti bradizoiti e pseudocisti) è possibile mediante indagine microscopica (colorazione di Giemsa) e/o isolamento in vivo su animali da laboratorio o in vitro, terreni di coltura o mediante amplificazione del DNA di *T. gondii* con tecniche biomolecolari. Il materiale di partenza per la ricerca può essere costituito da muscoli, cervello, organi parenchimatosi, essudati, liquido amniotico e feto.

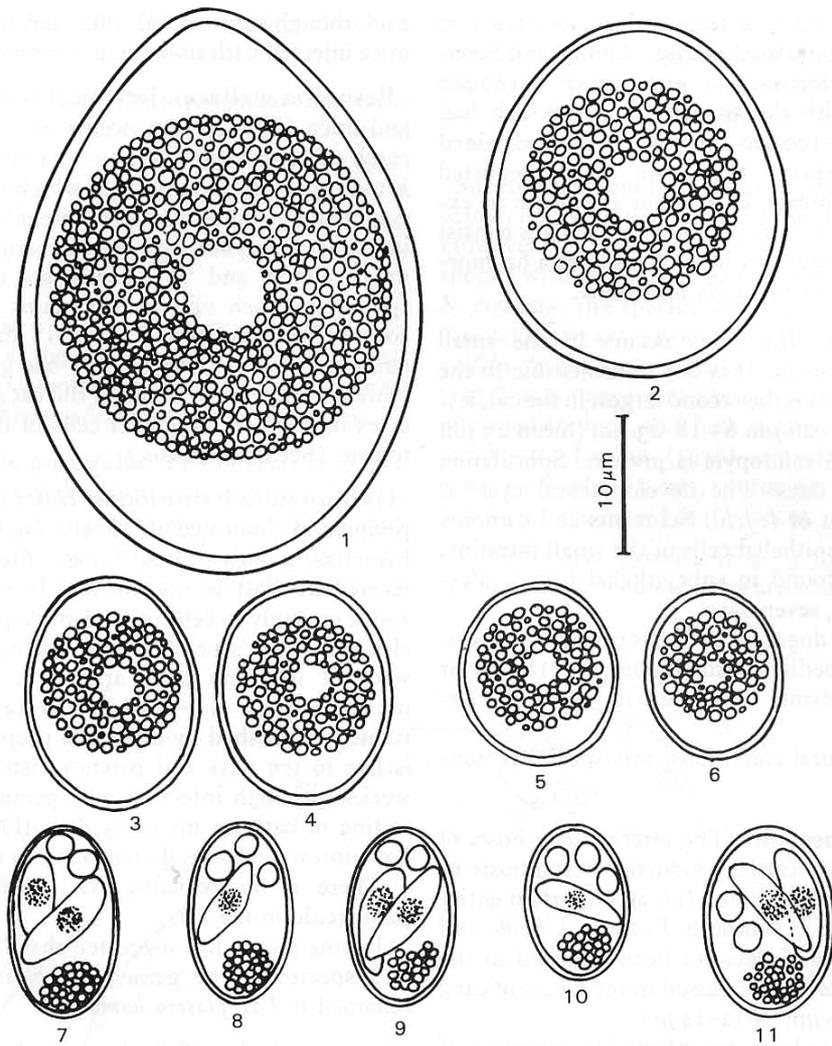


Fig 3.29 Coccidia of the cat. Oocysts in fresh faeces. (1) *Isospora felis*. (2) *I. rivolta*. (3) *Besnoitia besnoiti*. (4) *Besnoitia* sp. (probably *B. wallacei*). (5) *Hammondia hammondi*. (6) *Toxoplasma gondii*. Sporocysts in fresh faeces. (7) *Sarcocystis porcifelis*. (8) *S. hirsutal.* (9) *S. tenella*. (10) *S. muris*. (11) *Sarcocystis* sp. from Grant's gazelle (From Dubey 1976)

Tratto da: Soulsby, 1986.

RICERCA DI SARCOSPORIDI

La ricerca nelle feci di oocisti sporulate di sarcosporidi (10-12 μ) è di facile esecuzione con i metodi precedenti descritti.

La diagnosi di sarcosporidiosi nelle carni può essere effettuata anche con esami istologici e con metodi sierologici come la FdC (fissazione del complemento), l'emoagglutinazione e l'immunofluorescenza indiretta (IFI).



Tratto da: <http://www.uvg.edu.gt/dti/profesores/ggini/parasitologia/sarcocystis.htm>

RICERCA DEGLI ACARI

Gli artropodi di interesse medico-veterinario

Gli artropodi di interesse medico-veterinario appartengono alla classe ARACHNIDA. Sono rappresentati da acari e zecche che evolvono dall'uovo in larve a 6 arti, e poi in ninfe ad 8 arti, simili all'adulto, ma di dimensioni minori e con apparato sessuale non ancora maturo.

Il sottordine ASTIGMATA comprende tre famiglie: *Sarcoptidae*, *Psoroptidae* e *Knemidocoptidae*.

- Nella famiglia *Sarcoptidae* sono compresi acari parassiti permanenti, responsabili di malattie cutanee dei mammiferi.

Presentano forma rotondeggiante con arti corti. Hanno apparato buccale pungente e cheliceri atti a tagliare: si nutrono di linfa circolante e di cellule. Se ne conoscono due generi: *Sarcoptes* e *Notoedres*. Al primo appartiene una sola specie con diverse varietà non strettamente ospite-specifiche. E' stata più volte dimostrata la possibilità di contagio tra specie animali diverse (uomo compreso) e questo fa ritenere che si tratti di un parassita ancora in fase di evoluzione e non dotato di specificità completa.

- Nella famiglia *Psoroptidae* sono compresi acari parassiti permanenti che colpiscono prevalentemente gli erbivori. Presentano forma ovalare e con arti lunghi. Non possiedono apparato buccale atto a scavare gallerie, ma pungono la cute e si nutrono di essudato e di cellule. A differenza degli acari del genere *Sarcoptes* non sono di norma trasmissibili da una specie animale all'altra. I maschi misurano 0,5-0,6 mm di lunghezza e 0,32-0,35 mm di larghezza, le femmine misurano 0,6-0,7 X 0,4-0,45 mm.

Tre generi hanno importanza come parassiti degli animali domestici: *Psoroptes*, *Chorioptes* e *Otodectes*.

Al genere *Psoroptes* appartengono specie responsabili della rogna del corpo dei ruminanti, degli erbivori e della rogna auricolare di caprini e conigli.

Al genere *Chorioptes* appartengono alcune specie che si insediano prevalentemente sulla cute degli arti degli erbivori.

Al genere *Otodectes* appartengono gli acari che colonizzano il condotto uditivo dei cani, dei gatti e di altri carnivori selvatici.

La rogna otodettica interessa cani e gatti ed è causata da due varietà di *Otodectes cynotis* (rispettivamente *O. cynotis* var. *canis* e *O. cynotis* var. *cati*) che si insediano esclusivamente nel condotto uditivo esterno.

- Nella famiglia *Knemidocoptidae* sono compresi acari parassiti permanenti dei volatili.

Al sottordine PROSTIGMATA appartengono tre famiglie:

Trombiculidae, *Demodicidae* e *Cheyletiellidae*.

- Nella prima famiglia sono compresi acari a tegumento molle che allo stadio di ninfa e di adulto vivono sul terreno, mentre allo stadio larvale parassitano temporaneamente gli animali e l'uomo. *Neotrombicula autumnalis* è l'acaro adulto, mentre *Leptus autumnalis* è la larva, che si caratterizza per il suo colore rosso-arancione.

- Alla famiglia *Demodicidae* appartengono acari ospite-specifici del genere *Demodex*, agenti responsabili della rogna demodettica. Tali acari vivono e si moltiplicano nelle ghiandole sebacee e nei follicoli piliferi dell'ospite, sono sprovvisti di apparato digerente. Hanno forma allungata a sigaro. I maschi sono lunghi 0,170-0,250 mm e larghi 0,30-0,60 mm, le femmine sono lunghe 0,180-0,400 mm e larghe 0,40-0,60 mm. Adulti e ninfe sono provvisti di quattro paia di zampe. I maschi muoiono dopo l'accoppiamento. La femmina depone le uova nei follicoli piliferi, da cui schiuderanno le larve esapodi che successivamente mutano in ninfe ottopodi e poi in adulti. La trasmissione si realizza per via diretta. Nel determinismo della malattia intervengono altri fattori, quali le condizioni generali di salute, lo stato igienico, gli stress, malattie batteriche o virali, terapie immunosoppressive e meccanismi di natura immunitario-allergica.

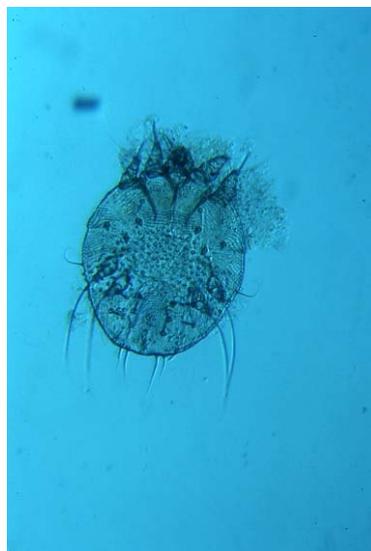
- Alla famiglia *Cheyletiellidae* appartiene un acaro di forma ovalare che compie l'intero ciclo sull'ospite, colonizzandone la superficie cutanea. Non scava gallerie, e dalle uova deposte alla base dei peli, nascono le larve esapodi, che in una settimana mutano in ninfe ottopodi e poi in adulti. Le

principali specie sono: *Cheyletiella yasguri* nel cane, *Cheyletiella blakei* nel gatto e *Cheyletiella parasitivorax* nel coniglio.

RICERCA DEGLI ECTOPARASSITI

La ricerca degli ectoparassiti si effettua esaminando un raschiato cutaneo o il materiale ceruminoso prelevato dal condotto uditivo.

Il raschiato cutaneo può essere costituito da croste cutanee, ottenute mediante scarificazione a sangue, o peli e forfora, ottenuti mediante semplice passaggio della lama del bisturi sul mantello dell'animale. Per non incorrere nel rischio di falsi negativi è essenziale scegliere una zona cutanea "tipica", cioè in cui la possibilità di ritrovare i parassiti è maggiore, su cui eseguire il



raschiato. E' bene prelevare il materiale dai margini della lesione. Tuttavia è opportuno scegliere un punto che non sia stato alterato da escoriazioni od altri traumi e che non sia stato medicato.

Il materiale occorrente e la tecnica di esecuzione di un esame diretto per la ricerca di ectoparassiti sono descritti di seguito.

Materiale occorrente

- Vetrino da orologiaio;
- Pipette Pasteur;
- Soluzione di KOH o NaOH a concentrazione variabile (dal 10 al 20%);
- Vetrini portaoggetti e coprioggetti.



Tecnica:

-Esame delle croste con uso di sostanze cheratolitiche

1. Il materiale (compresa la lama del bisturi) va posto in un vetrino da orologiaio, quindi si versano 5-6 ml di soluzione di idrato di sodio o di potassio (NaOH e KOH hanno proprietà cheratolitiche) amalgamando il tutto. Si lascia agire per 30 minuti in stufa termostata alla temperatura di 37°C.



2. Si preleva un'aliquota del materiale frammentato e si pone sul vetrino portaoggetti.

Si copre con il vetrino coprioggetti e si esamina al microscopio a piccolo ingrandimento (10- 20X).

In caso di rogna otodettica il materiale ceruminoso, generalmente prelevato mediante un tampone auricolare, realizzato con una garza, può essere esaminato direttamente, senza preventivo trattamento con sostanze cheratolitiche direttamente sulla garza, o dopo averlo trasportato su di un vetrino.

Esame delle croste mediante arricchimento:

Alcuni frammenti di materiale in esame (croste, peli, lama del bisturi), sono posti in una provetta da centrifuga da 10 ml. Si versano 5 cc di soluzione di KOH al 10% e si stempera il materiale mediante una bacchetta di vetro. Quindi si lascia agire la soluzione per 60 minuti in stufa a 37°C, agitando di tanto in tanto per 3-4 volte; oppure si lascia per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente il materiale viene centrifugato per 10 minuti a circa 1000 giri. Si elimina il surnatante, e il sedimento viene sospeso nella stessa provetta con 5 cc di una soluzione al 50% di zucchero (saccarosio) mescolando con una bacchetta. Il campione viene nuovamente posto in centrifuga per 10 minuti e poi lasciato a temperatura ambiente per almeno 10 minuti. Con una pipetta si prelevano alcune gocce del surnatante, si depongono su di un vetrino e si osserva ad ingrandimento 10- 20X.

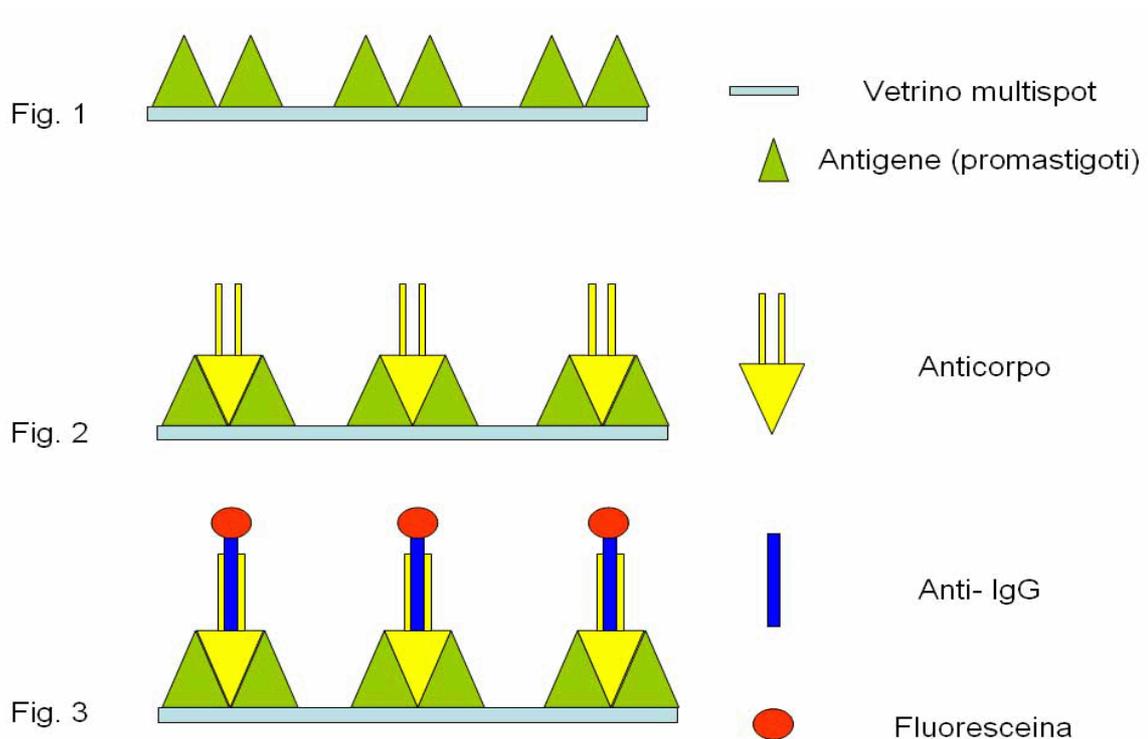
Allegato A

Immunofluorescenza indiretta –IFI

La reazione antigene-anticorpo viene rivelata dalla presenza di fluorocromi (fluoresceina, rodamina), coniugati con anti-anticorpi che hanno la capacità di emettere fluorescenza (rispettivamente verde e rossa) se colpiti da luce ultravioletta (UV).

La tecnica viene utilizzata per rilevare gli anticorpi specifici nel siero di sangue (immunofluorescenza indiretta). L'antigene (Ag) verso cui si cercano gli anticorpi viene fissato sul vetrino (fig. 1). Gli anticorpi (Ac) diretti contro il parassita (presenti nel siero da esaminare) si legano con l'antigene (fig. 2). Il complesso Ag/Ac viene evidenziato con l'aggiunta successiva di anti-gammaglobuline specie specifiche coniugate con isotiocianato di fluoresceina (fig. 3) o rodamina.

L'osservazione dovrà essere eseguita con il microscopio a fluorescenza.

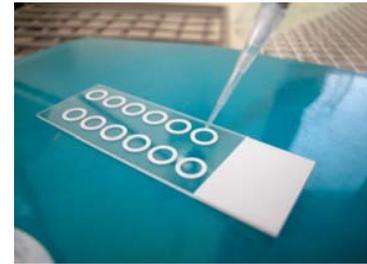


Procedura:

- 1.** I sieri vengono opportunamente diluiti in PBS nei pozzetti della piastra microtiter, utilizzando opportune diluizioni dipendenti dal tipo di parassita e dall'endemicità della patologia (i.e. 1:80 in aree endemiche per leishmaniosi) per i campioni da esaminare e per il controllo positivo e negativo. E' preferibile partire da diluizioni 1:10 e procedere con diluizioni a raddoppio fino a quella prestabilita
- 4.** Dopo aver effettuato tutte le diluizioni dei sieri e dei controllo, si prelevano ca. 15-20 μ l di siero (la quantità dipende dal diametro del pozzetto del vetrino multi spot), e si pongono nei pozzetti del vetrino. Il vetrino viene messo in camera umida 37°C per 30 minuti.
- 5.** Trascorso tale tempo si effettuano tre abbondanti lavaggi (di 10 minuti ognuno) in PBS: così solo gli anticorpi specifici rimangono legati all'antigene. Si asciuga il vetrino in stufa.
- 6.** Preparazione del coniugato. Il coniugato viene diluito prima dell'uso (alla concentrazione dichiarata dalla ditta fornitrice) in PBS in base alla necessità (ca 20 μ L per pozzetto) e si aggiunge 1 μ l di blue di Evans diluito 1:10.000 ogni 100 μ L di coniugato diluito.
- 7.** Si aggiungono 15-20 μ L di coniugato precedentemente preparato in ogni singolo pozzetto (si legherà al complesso antigene-anticorpo). Il vetrino viene messo in camera umida 37°C per 30 minuti. Si effettuano i lavaggi ripetendo l'operazione descritta al punto 5. Si asciuga il vetrino in stufa
- 8.** Si pongono 5 μ L di soluzione di montaggio (glicerolo diluito in PBS 50:50) in ogni pozzetto e si copre con un vetrino coprioggetto osservando il preparato al microscopio a fluorescenza.

Descrizione MATERIALI:

- **Vetrini** ad anello (multispot), su cui è stato precedentemente fissato l'antigene



- **PBS** (phosphate buffered saline) a pH 7.2: si prepara sciogliendo in un litro di acqua distillata 2,5878 g di KH_2PO_4 (Potassio diidrogeno fosfato) e 6,78 g di NaHPO_4 (fosfato monobasico di sodio).

- **Bleu d'Evans**: serve per eliminare la fluorescenza aspecifica, si utilizza una soluzione diluita 1:10.000 con PBS aggiunto al coniugato oppure aggiungendolo alla fine della reazione.

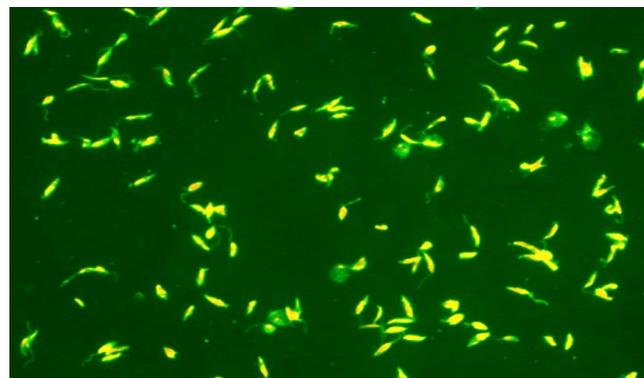
- **Piastre microtiter**, a 96 pozzetti, per effettuare le diluizioni dei sieri.



- **Anti-gammaglobuline** coniugate con fluoresceina o rodamina.

- **Controllo positivo e controllo negativo**:

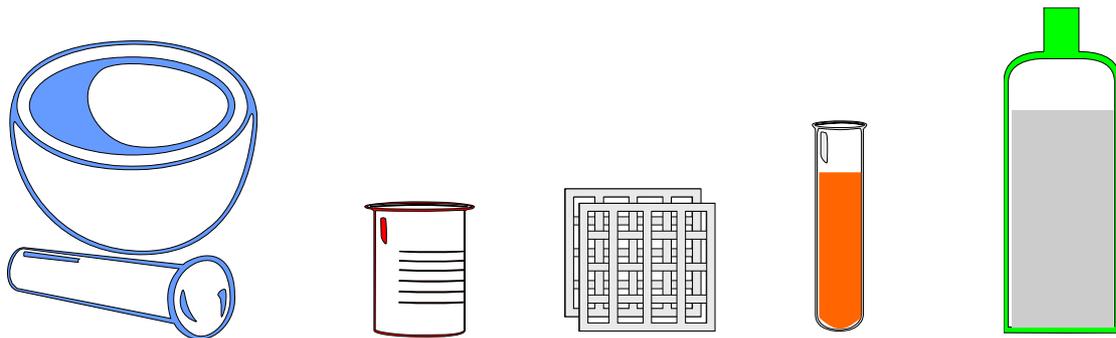
servono per verificare la corretta esecuzione del test.



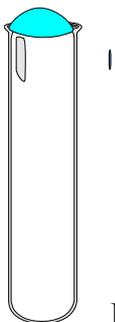
Allegato B

Tecnica esame coprologico

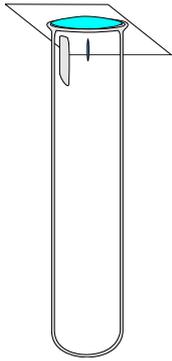
- a. Prelevare e Omogeneizzare 2-5 g di feci da più parti del campione.
- b. Stemperare le feci con il pestello in un mortaio insieme alla soluzione prescelta (soluzione sovrasatura di cloruro di sodio, soluzione zinco-cloruro o soluzione iodomercurata). Ottenuta una preparazione liquida omogenea, la si lascia riposare per qualche secondo. Dopo 1 minuto circa si può osservare (meglio se con una lente da ingrandimento) se sulla superficie siano affiorati frammenti o vermi adulti o proglottidi di cestodi.
- c. Filtrare tutto il contenuto del mortaio in un becker in plastica o vetro (100 mL) attraverso un doppio strato di garza di cotone;



- d. La flottazione viene ottenuta versando il contenuto in una provetta a fondo conico del volume di 10 mL avendo cura di formare un menisco superiore sulla superficie della provetta.
- e. Fare sostare il preparato per almeno 20 minuti.



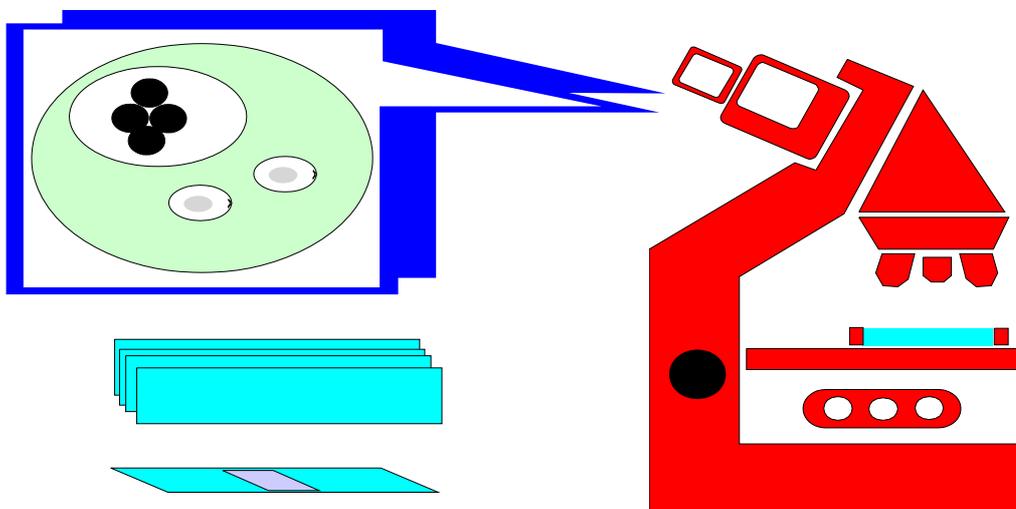
Porre un vetrino coprioggetto sulla parte superiore della provetta, raccogliere il menisco, e posizionarlo su di un vetrino portaoggetto.



Oppure, avendo l'accortezza di riempire la provetta fino all'orlo, appoggiare un vetrino coprioggetto in modo che le forme parassitarie, man mano che affiorano, aderiscano alla faccia inferiore del vetrino.

Fare sostare il preparato per almeno 20 minuti e appoggiare il vetrino coprioggetto su di un vetrino portaoggetto.

f. effettuare la lettura al microscopio ottico prima a piccolo ingrandimento (5X) e poi a medio ingrandimento (10 o 20X) osservando tutta l'area del vetrino coprioggetto.



Per accorciare i tempi di attesa, è possibile effettuare una centrifugazione (a 800-1500 rpm per 3-5 minuti) del liquido fecale versato nella provetta, raccoglierne con una ansa 2-3 gocce di sovrantante e porle fra vetrino portaoggetto e coprioggetto. Quindi osservare al microscopio ottico a 4X e poi a 10 X.

Materiale occorrente per l'esecuzione di un esame coprologico completo.



Nel corso dell'esame microscopico delle feci possono riscontrarsi occasionalmente sostanze ed elementi estranei alla loro composizione. Alcuni di questi sono artefatti dovuti a difetti nella tecnica di allestimento dei preparati microscopici (bolle d'aria, precipitati di reagenti, cristalli, impurità di vetrini e cristalli, spore vegetali, fibre vegetali e materiale indigerito);

Le bolle d'aria si formano con facilità durante l'allestimento dei preparati, specialmente quando si lascia cadere bruscamente il liquido fecale nella provetta o si comprime il materiale sul vetrino coprioggetti. Alcune si presentano trasparenti, altre di colore nero, di forma sferica e con dimensioni estremamente variabili (da 20-30 μm a 150-200 μm), hanno con un contorno netto e marcato che, con il focettamento, si ispessisce e si moltiplica in cerchi concentrici.

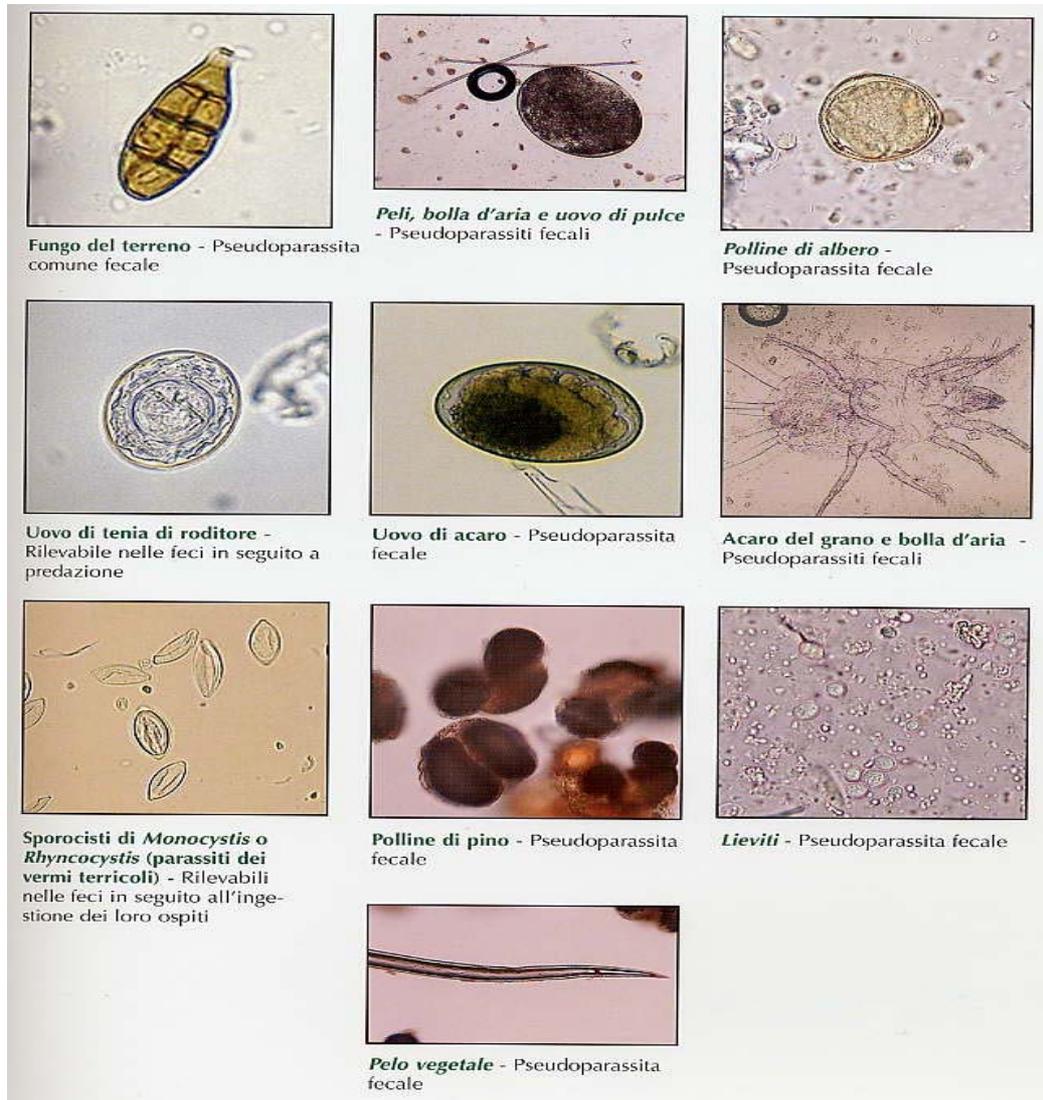
Altri reperti possono essere rappresentati da:

- **parassiti degli alimenti:** provengono da miceti parassiti del frumento e di altri cereali (*Tilletia caries* e *Tilletia laevis*);

- **infiorescenze e pollini di vegetali** (spore di *Lycopodium* spp., di *Capsicum* spp.). filamenti di foglia di quercia o pollini (*Pinus* spp. *Cynara* spp., *Fraxinus* spp., *Quercus* spp. e *Populus* spp.);
- **protozoi**: l'ingestione di acqua e di alimenti inquinati può essere veicolo di cisti di flagellati, di ciliati e di rizopodi liberi che, sviluppandosi nelle feci, danno origine a forme mobili confondibili con protozoi parassiti;
- **aracnidi detriticoli** (*Thiroylyphus longinor* e *Acarus siro*): questi riconoscono come loro habitat diversi cereali e possono riscontrarsi nelle feci interi o frammentati;
- **insetti** (coleotteri, farfalle e mosche): possono essere presenti nelle feci piccole parti del loro corpo, frammenti di ali e di zampe (rivestite da peli acuminati e di spine);
- **parassiti coprofilii**: le feci possono costituire l'habitat di insetti alati e terricoli che vi depongono le uova da cui schiudono larve mobili che rendono difficile la diagnosi. Talvolta è possibile osservare nelle feci larve di *Rhabditis terricola*, molto simile alle larve di *Ancylostoma caninum* o alle larve di strongiloidi;
- **cristalli** di ossalato di calcio e di altri minerali. Possono rinvenirsi liberi o inclusi nelle cellule vegetali che, disposte a nido d'ape o allineate parallele, contengono ciascuna un cristallo di ossalato. Hanno forma per lo più di blocchi poliedrici e di piramidi con cuspidi e facce disposte irregolarmente.

Allegato C

Tavola degli pseudoparassiti:



Tratta da: Byron L.B., 2000.

Allegato D

TECNICA PREPARAZIONE SOLUZIONI

SOLUZIONE SOVRASATURA DI CLORURO DI SODIO A BASSO PESO SPECIFICO (p.s. 1,200)

La densità di questa soluzione è fortemente legata alla temperatura, oscillando da un minimo di 1120 a 10°C ad un massimo di 1200 a 37°C.

Materiale occorrente:

- Cloruro di sodio (NaCl)
- Cilindro
- Densimetro Baumé
- Bacchetta di vetro
- Bottiglia di vetro



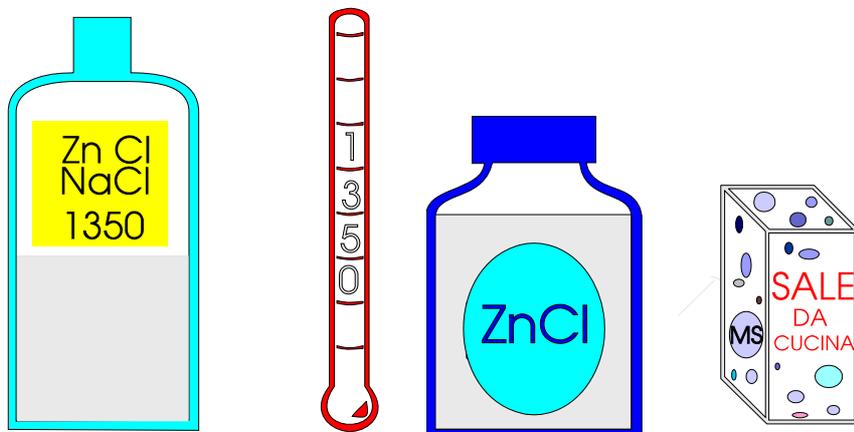
Tecnica:

Riempire con acqua calda a circa 50-60°C, sino ad un volume di 1000 mL, un bicchiere di vetro con del comune sale da cucina (NaCl). Agitare il tutto per lungo tempo: in genere la soluzione diviene satura dopo 24 ore. Utilizzando circa 720 g di sale, si giunge, a circa 20°C, ad una densità di 1200, valore questo, che viene verificato dopo ogni preparazione (ed ogni volta che si riempie il flacone nel caso in cui venga preparata in grande quantità). E' importante lasciare sempre sul fondo del recipiente 2-3 cm di sale indisciolto.

SOLUZIONE ZINCO-CLORURO A PESO SPECIFICO MEDIO-ALTO (p.s. 1350)

Materiale occorrente:

- Cloruro di Zinco
- Cloruro di Sodio
- Acqua di fonte
- Cilindro di vetro
- Bicchiere conico
- Densimetro Baumé
- Bacchetta di vetro
- Bottiglia di vetro



Tecnica:

- a.** Pesare separatamente 210 g di NaCl e 220 g di ZnCl₂ e porli nel bicchiere di vetro, aggiungendo poco alla volta l'acqua di fonte, fino ad un volume di 800 mL.
- b.** Agitare energicamente con la bacchetta di vetro fino a quando tutto il sale non sia completamente disciolto.
- c.** Trasferire la soluzione nel cilindro di vetro ed inserire il densimetro per valutare il peso specifico raggiunto.

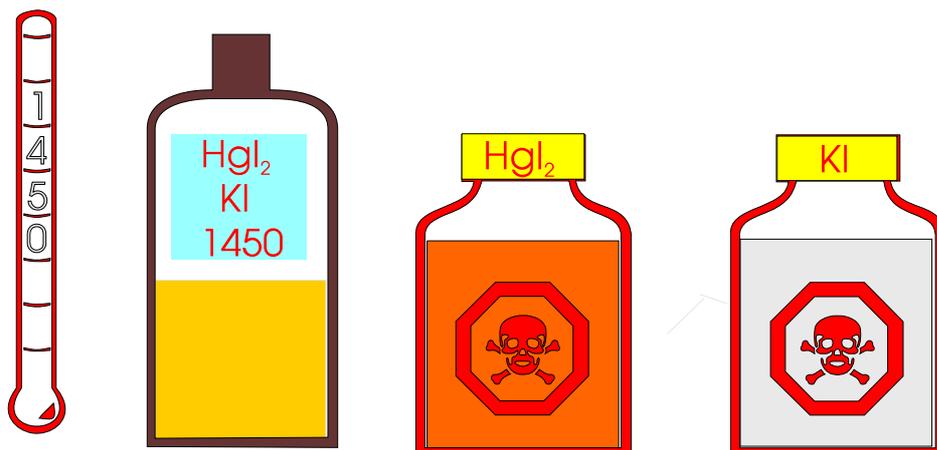
Se occorre una soluzione con un peso specifico maggiore, aggiungere in proporzione del ZnCl₂ e poi valutare la densità.

Aspettare che la soluzioni si raffreddi e successivamente porla nella bottiglia applicando l'etichetta con l'indicazione della densità.

SOLUZIONE ZINCO-MERCURIO (TAMPIERI) A PESO SPECIFICO MEDIO-ALTO (p.s. 1350)

Materiale occorrente:

- Zinco solfato eptaidrato (ZnSO₄·7H₂O)
- di Mercurio ioduro (HgI₂)
- Potassio ioduro (KI)
- Acqua di fonte
- Cilindro di vetro
- Bicchiere conico
- Densimetro Baumé
- Bacchetta di vetro
- Bottiglia di vetro



Tecnica:

La soluzione Tampieri è costituita da due soluzioni (soluzione A e soluzione B).

a. Soluzione A

Pesare 600 g di zinco solfato eptaidrato e discioglierlo in 600 mL di acqua di fonte.

b. Agitare energicamente con la bacchetta di vetro fino a quando tutto il sale non sia completamente disciolto.

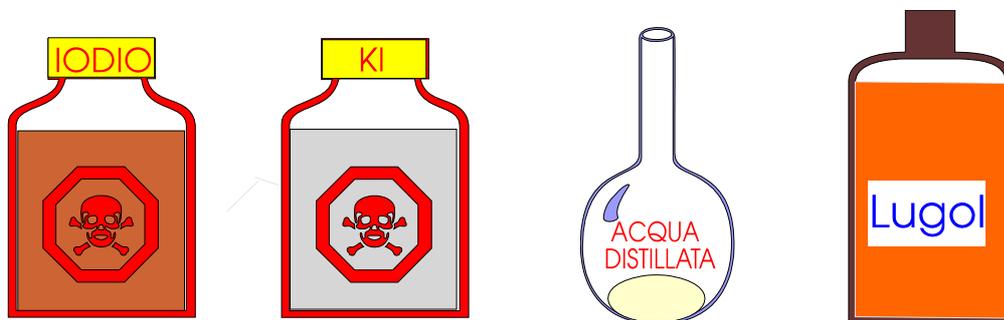
c. Soluzione B

d. Pesare 100 g di ioduro di mercurio e discioglierlo in 63 mL di acqua di fonte, Quando tutto il sale è completamente disciolto aggiungere 78 g di ioduro di potassio.

Trasferire la soluzione A e B nel cilindro di vetro ed inserire il densimetro per misurare il peso specifico raggiunto.

SOLUZIONE IODIO-MERCURATO DI POTASSIO AD ALTO PESO SPECIFICO (p.s. 1450)

Materiale occorrente:

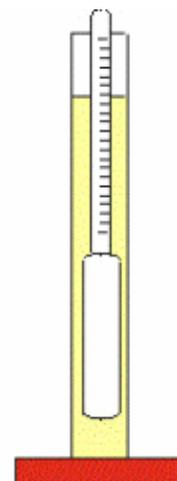


- Ioduro di mercurio
- Ioduro di potassio
- Bicchiere conico e cilindro
- Densimetro Baumé
- Bottiglia di vetro e bacchetta di vetro

Modalità:

- Pesare 185 g di KI e 250 g di HgI_2 .
- Aggiungere lo KI poco alla volta nel bicchiere di vetro contenente ml 665 di acqua di fonte.
- Sciogliere successivamente lo HgI_2 .

Agitare continuamente con la bacchetta di vetro fino a quando tutta la soluzione si presenta di colore giallo paglierino. Passare la soluzione nel cilindro di vetro ed inserire il densimetro per controllare il peso specifico raggiunto.



Allegato E

Colorazione di Giemsa

Composizione del reattivo: Soluzione di Blue Eosina e Blue di Metilene

La colorazione di Giemsa è volta ad evidenziare i costituenti cellulari che hanno reazione basica e che fissano l'eosina (acida), colorandosi in rosso-arancio. I componenti cellulari aventi reazione acida con il blu di metilene (basico) si colorano invece in azzurro.

Materiale Occorrente:

- Reattivo di Giemsa
- Acqua distillata
- Soluzione tampone a pH 7,2
- Becker
- Pipette Pasteur
- Vetrini
- Vaschetta per la colorazione

Tecnica:

1a Fase

- a. Strisciare il sangue o altro materiale da esaminare sul vetrino (preventivamente sgrassato con alcool) secondo le comuni tecniche;
- b. essiccare all'aria;
- c. fissare il materiale essiccato con alcool metilico, facendolo agire per 2-3 minuti.

2a Fase

- a. eliminare l'eccesso di alcool metilico e versare il reattivo di Giemsa preventivamente diluito in rapporto 1:20 (1 mL di Giemsa e 19 mL di soluzione tamponata) coprendo interamente il vetrino. (N.B.: la preparazione del reattivo di Giemsa si effettua immediatamente prima dell'utilizzo procedendo a filtrazione su carta bibula);

b. versare il reattivo di Giemsa diluito sul vetrino, coprendolo interamente, facendolo reagire per 20 minuti;

3a Fase

- a. Lavare rapidamente ed abbondantemente il vetrino con acqua distillata;
- b. asciugare completamente e osservare al microscopio ottico con ingrandimento 100X ad immersione, utilizzando olio di cedro o minerale;
- c. dopo aver osservato integralmente il vetrino, pulire il vetrino e l'obiettivo del microscopio con una garza imbevuta di xilolo. Il vetrino potrà così essere conservato.

Colorazione di May-Grunwald Giemsa

Materiale Occorrente:

- Reattivo di May-Grunwald
- Reattivo di Giemsa
- Acqua distillata o soluzione tampone a pH 7,2 (PBS)
- Bottiglia per lavaggio
- Pipette Pasteur
- Vetrini
- Carta bibula
- Vaschetta con cestello per la colorazione
- Pinza per vetrini a punte piatte

Tecnica:

1a Fase

- a. Strisciare il sangue (o altro materiale da esaminare) sul vetrino secondo le comuni tecniche.
- b. Essiccare all'aria.

2a Fase

- a. Versare il reattivo di May-Grunwald sul vetrino, coprendolo interamente, facendolo agire per 3 minuti;
- b. aggiungere un volume pari al 50% di acqua distillata o di soluzione tampone sul vetrino (in modo tale da diluire il reattivo) e attendere 5 minuti;
- c. Eliminare il tutto senza effettuare alcun lavaggio.

3ª Fase

- a. Versare il Reattivo di Giemsa preventivamente diluito in rapporto 1:20 coprendo interamente il vetrino. Il Giemsa viene preparato immediatamente prima dell'utilizzo (1 ml di Giemsa e 19 ml di acqua distillata o PBS) filtrandolo su carta bibula. Il colorante deve permanere sul vetrino per 20 minuti.

4ª Fase

- a. Lavare rapidamente ed abbondantemente con acqua distillata.
- b. Far asciugare completamente il vetrino ed osservare al microscopio con ingrandimento 100X ad immersione utilizzando l'olio di cedro.
- c. dopo aver osservato integralmente il vetrino, pulire il vetrino e l'obiettivo del microscopio con una garza imbevuta di xilolo.

Allegato F

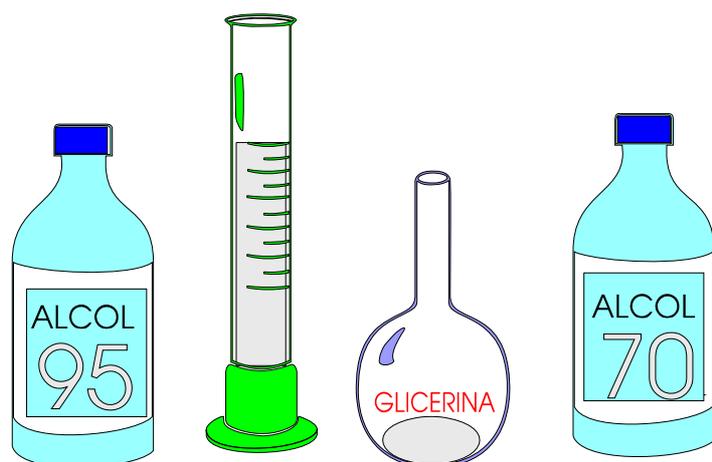
PREPARAZIONI DI SOLUZIONI E REAGENTI

PREPARAZIONE DI ALCOL AL 70% GLICERINATO

Questa soluzione viene utilizzata per conservare per lungo tempo larve di ditteri (*Hypoderma* spp., *Oestrus ovis*, *Gasterophilus* spp.), parassiti adulti, (ascaridi, trematodi), proglottidi di cestodi, zecche, pidocchi e pulci.

Materiale occorrente:

- alcool assoluto;
- acqua distillata;
- glicerina;



Preparazione:

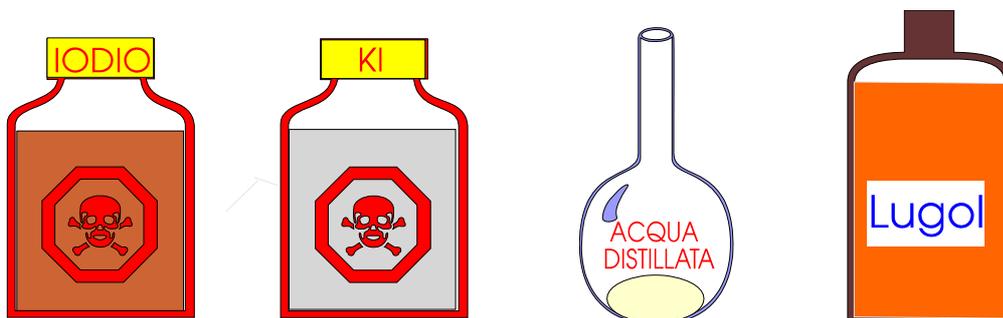
- Miscelare in un bicchiere di vetro 74 ml di alcool assoluto e 25 ml di acqua distillata;
- aggiungere 2-3 ml di glicerina e agitare energicamente.

LUGOL

La soluzione di Lugol viene utilizzata per colorare trofozoiti e cisti di protozoi (*Giardia* spp. e *Trichomonas* spp.), larve (L₁) di nematodi di strongili bronco-polmonari (*Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus*, *Protostrongylus rufescens*, *Neostrongylus linearis*, *Dyctiocaulus viviparus*, *Dyctiocaulus filaria* e *Aelurostrongylus abstrusus*), dell'apparato cardio-circolatorio (*Angiostrongylus vasorum*) e gastro-intestinali (tricostrongilidi); può essere inoltre utilizzata per individuare granuli di amido.

Materiale occorrente:

- Iodio metallico;
- Ioduro di potassio;
- acqua distillata;
- beuta.



Metodiche:

Tutte le soluzioni iodo-iodurate si preparano sciogliendo in acqua dapprima lo Ioduro di Potassio e successivamente lo Iodio metallico polverizzato.

Liquido di Gram o Lugol semplice

Pesare 1 g di Iodio metallico e 2 g di Ioduro di Potassio; scioglierli in una beuta contenente 300 mL di acqua distillata.

Liquido di Lugol e Nicolle

Pesare 1 g di Iodio metallico e 2 g di ioduro di potassio; scioglierli in una beuta contenente 200 ml di acqua distillata.

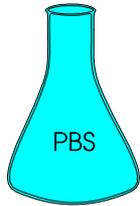
Liquido di Lugol doppio

Pesare 1 g di Iodio metallico e 2 g di Ioduro di Potassio; scioglierli in una beuta contenente 100 ml di acqua distillata.

Normalmente per la ricerca dei protozoi vengono usate soluzioni più concentrate (5 g di iodio metallico, 10 g di ioduro di potassio; 100 mL di acqua distillata). Per evitare che i preparati presentino un eccesso di colorante, si consiglia di diluire la soluzione madre a seconda delle esigenze tecnico-diagnostiche.

Le soluzioni vanno conservate in bottiglie scure con tappo di vetro e rinnovate ogni due-tre settimane.

PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)



Questa soluzione tampone a pH 7.2 viene utilizzata per effettuare le diluizioni dei campioni da esaminare con Immunofluorescenza indiretta (IFAT) o ELISA.

Occorrente:

- Potassio diidrogeno fosfato
- Fosfato monobasico di sodio
- Acqua distillata
- Agitatore magnetico
- Bilancia analitica
- Beuta

Modalità:

- a. Si prepara sciogliendo 2,59 g di KH_2PO_4 e 6,78 g di NaHPO_4 in una beuta contenente 1000 mL di acqua distillata.
- b. Si pone poi la soluzione in un agitatore magnetico a media velocità per 10 minuti.

SOLUZIONE CLORO-PEPTIDICA

Viene utilizzata per effettuare la digestione del piede di molluschi gasteropodi polmonati (*Ceriuella virgata*, *Eobania vermiculata*, *Monacha* spp.); per la ricerca delle L₁ dei protostrongilidi bronco-polmonari: (*Muellerius capillaris*, *Cystocaulus ocreatus*, *Neostrogylus lilearis*, *Protostrongylus rufescens*).



Composizione della soluzione:

- 100 ml di Acqua distillata
- 2 ml di HCl concentrato (37-40%);
- 2 g di pepsina (1:30.000).

Materiale occorrente:

- Becker
- Matraccio
- Forbici
- Agitatore magnetico

Modalità:

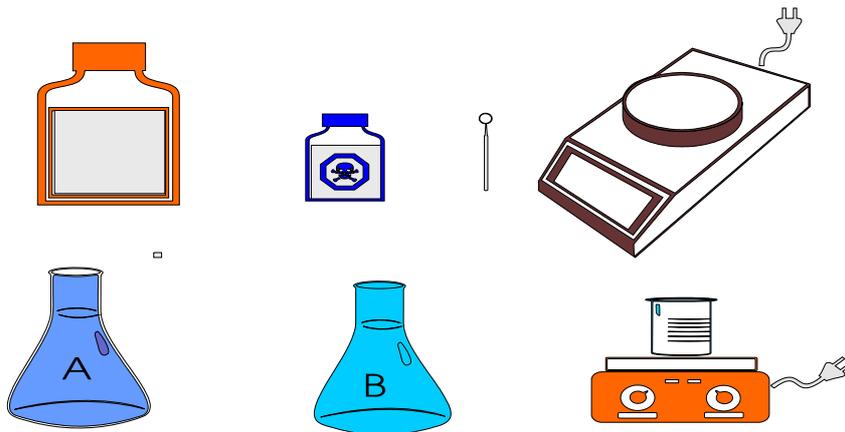
Dopo aver preparato la soluzione cloro-peptidica tritare finemente con delle forbici il piede del mollusco in piccoli frammenti e porli in un matraccio. Aggiungere la soluzione in rapporto di 1:10 - 1:20 in un piccolo becker. Mettere il becker in stufa a 37°C con un agitatore magnetico per 5-6 ore. La sospensione viene filtrata, centrifugata a 1500 rpm per 4 minuti ed il sedimento viene esaminato per la ricerca delle larve al microscopio.

SOLUZIONE TAMPONE

La soluzione tamponata neutra viene utilizzata per diluire il reattivo di Giemsa.

Occorrente:

- monofosfato di potassio;
- fosfato disodico;
- acqua distillata;
- beute;
- agitatore magnetico;
- bilancia.



Modalità:

- Pesare 35 g di monofosfato di potassio e scioglierli in 1000 mL di acqua distillata in una grossa beuta (soluzione A) che va posta sull'agitatore magnetico per 15 minuti a media velocità.
- Pesare 75 g di monofosfato di potassio e scioglierli in 1000 mL di acqua distillata in una grossa beuta (soluzione B) che va posta sull'agitatore magnetico per 15 minuti a media velocità.

Prelevare 10 mL della soluzione A e miscelarli con 20 ml della soluzione B in una beuta che va posta sull'agitatore magnetico per 10 minuti. La nuova soluzione così ottenuta è utilizzabile per le diluizioni dei reagenti e per i lavaggi.

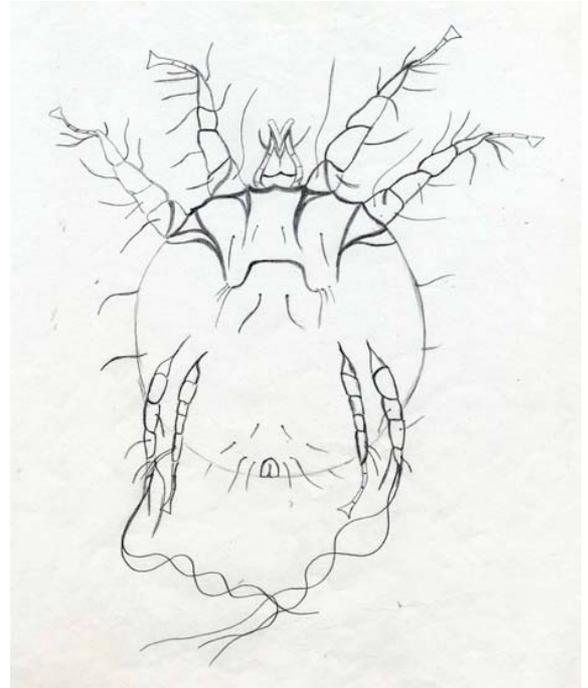
Psoroptes spp.

ACARO DELLA ROGNA DEL CORPO

Dimensioni: femmina 600-700 x 400-500 μ

maschio 500-580 x 300-390 μ

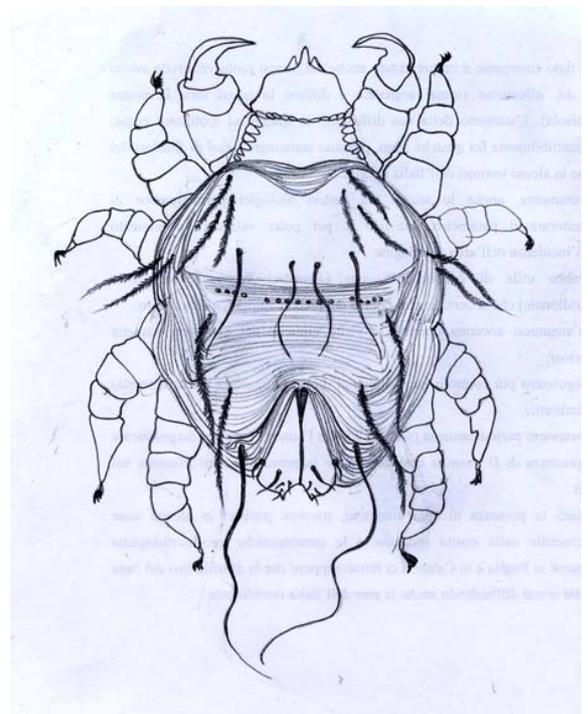
Corpo sub-sferico, privo di scaglie e spine ma con creste e solchi. Apparato buccale appuntito. Gli arti sono lunghi e robusti con 3° e 4° paio ben evidenti oltre il profilo dell'addome. Il maschio presenta ventose lunghe e segmentate sul 1°, 2° e 3° paio di arti, la femmina non sul 3° ma sul 4°.



***Cheyletiella yasguri* (cane) e *C. blakey* (gatto)**

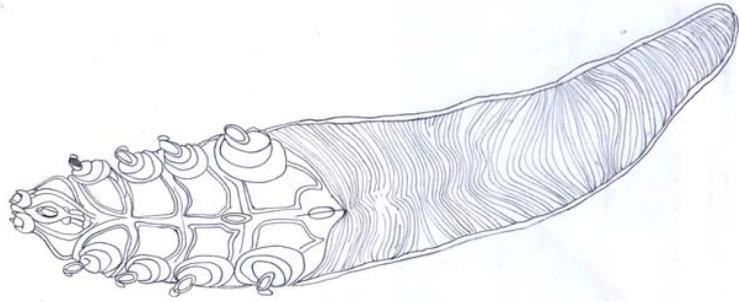
Dimensioni: 450-550 x 300-320 μ

Corpo ovale con una scanalatura trasversale come se fosse costretto da una cintura. Rostro conico, pedipalpi ben sviluppati, terminanti con uncini curvi e prominenti. La faccia dorsale e ventrale porta setole complesse sulle quali sono presenti setole più piccole. Due lunghe setole semplici si dipartono posteriormente al corpo. Gli adulti hanno 4 paia di arti lunghi e separati in due gruppi terminanti con unghie simili a pettini. La cheyletellosi deve essere sospettata in caso di desquamazione cutanea con forfora, e scarso prurito. E' molto frequente nei giovani carnivori ed è trasmissibile all'uomo.



***Demodex canis* (adulto)**

Dimensioni: 250 x 40µ



Acaro dal corpo allungato (a

forma di sigaro), dall'aspetto vermiforme e con arti atrofizzati che terminano con piccole unghie smussate. Rostro corto e tondo. Arti inseriti su epimeri uniti in mezzo a formare una barra longitudinale. Opistosoma allungato e striato trasversalmente.

La malattia è più frequente nei soggetti da tre mesi a due anni, particolarmente in alcune razze (Pastore tedesco, Bassotto tedesco, Boxer, Shar Pei, Pinscher, Dobermann).

Allegato H

DIFFERENZE MORFOLOGICHE DEGLI ACARI RESPONSABILI DI ROGNA

DIFFERENZE MORFOLOGICHE TRA GLI ACARI DI MAGGIOR INTERESSE VETERINARIO

SARCOPTES		NOTOEDRES		CORIOPTES		PSOROPTES	
Corpo rotondeggiante		Corpo rotondeggiante		Corpo ovoidale		Corpo ovoidale	
Presenza di scaglie e spine		Presenza di scaglie assenza di spine		Assenza di scaglie e spine		Assenza di scaglie e spine	
Pieghe trasversali parallele		Pieghe trasversali concentriche		Presenza di creste e solchi		Presenza di creste e solchi	
Apparato buccale corto e tozzo		Apparato buccale corto e tozzo		Apparato buccale rotondeggiante		Apparato buccale appuntito	
Zampe corte e tozze		Zampe corte e tozze		Zampe allungate		Zampe allungate	
3° e 4° paio di zampe quasi interamente coperte dall'addome		3° e 4° paio di zampe quasi interamente coperte dall'addome		3° e 4° paio di zampe ben evidenti oltre il profilo dell'addome		3° e 4° paio di zampe ben evidenti oltre il profilo dell'addome	
Pedicello lungo senza giunture		Pedicello lungo senza giunture		Pedicello corto senza giunture		Pedicello lungo con 3 giunture	
Ventosa a imbuto		Ventosa a imbuto		Ventosa a coppa		Ventosa a imbuto	
Ano posto ventralmente		Ano posto dorsalmente		Maschio	Femmina	Maschio	Femmina
Maschio	Femmina	Maschio	Femmina	385 µ x 215 µ		500-580 µ x 300-390 µ	600-700 µ x 400-500 µ
200-250 µ	350-500 µ	150 µ	225 µ	Tubercoli tronchi	Nessun tubercolo	Tubercoli arrotondati	Nessun tubercolo
				4° paio di zampe corto	4° paio di zampe lungo	4° paio di zampe corto	4° paio di zampe lungo
Ventose su 1°, 2° e 4° paio di arti	Ventose su 1° e 2° paio di arti	Ventose su 1°, 2° e 4° paio di arti	Ventose su 1° e 2° paio di arti	Ventose su tutte e 4 le paia di arti	Ventose su 1°, 2° e 4° paio di arti	Ventose su 1°, 2° e 3° paio di arti	Ventose su 1°, 2° e 4° paio di arti

Allegato I

DIFFERENZE MORFOLOGICHE DELLE LARVE DI III STADIO DELLE OESTRIDAE



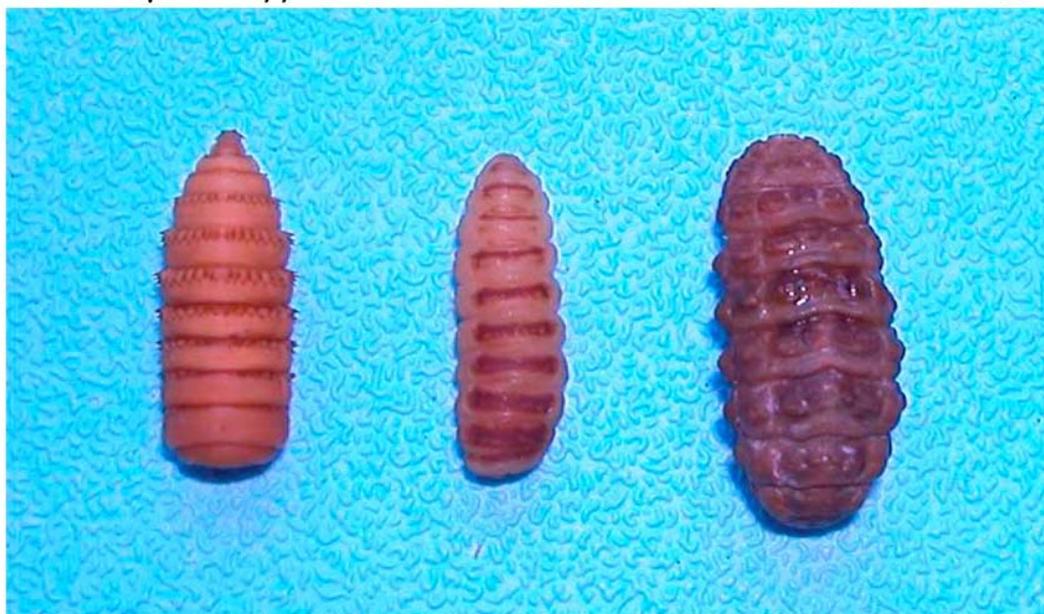
Gasterophiulus spp.



Oestrus ovis



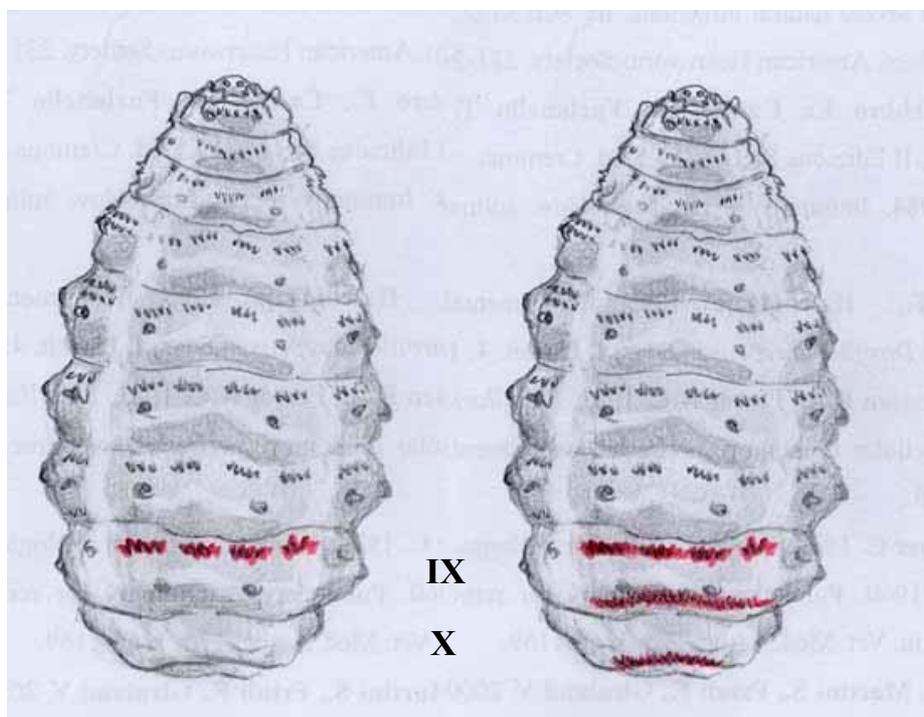
Hypoderma spp.



Gasterophilus spp. forma a barilotto, rossastre, dimensioni 1-2 cm, corpo con 11 segmenti e evidente spinulazione. All'estremità cefalica presenza di una coppia di uncini buccali chitinosi, robusti e sporgenti. All'estremità posteriore è visibile una coppia di peritremi di forma ovalare.

Oestrus ovis forma a barilotto, scura, dimensioni 1.5-2.5 cm, corpo con 11 segmenti e lieve spinulazione. All'estremità cefalica presenza di una coppia di uncini buccali chitinosi e sporgenti. All'estremità posteriore è visibile una coppia di peritremi di forma sferica.

Hypoderma spp. scura, forma a barilotto, dimensioni 1.0-3.0 cm, corpo con 11 segmenti e assenza di spinulazione evidente. Estremità cefalica ridotta. All'estremità posteriore è visibile una coppia di peritremi reniformi.

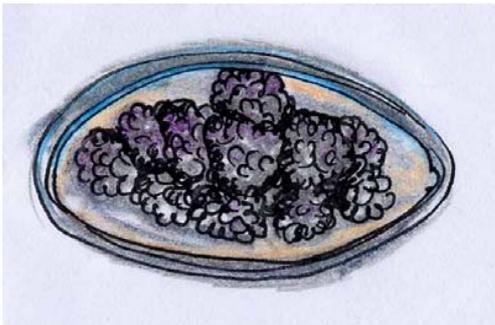
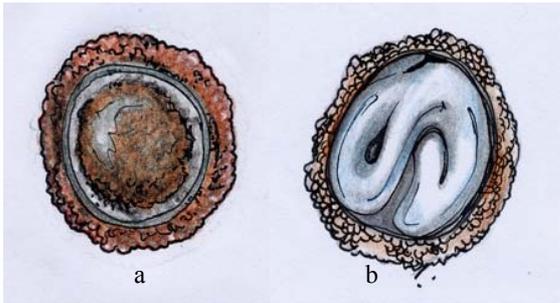
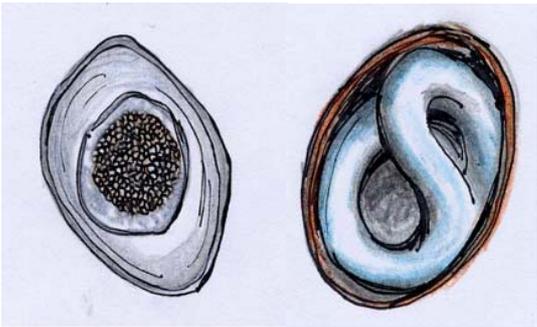


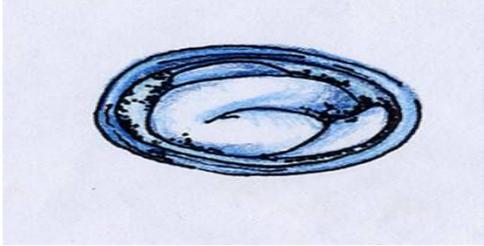
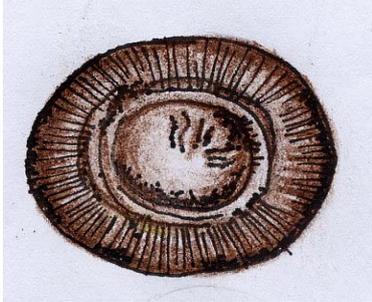
<i>Hypoderma bovis</i>	Segmento	<i>Hypoderma lineatum</i>
Microprocessi spinosi soltanto nel settore centrale del margine anteriore, assenti nei settori laterali e su tutto il margine posteriore.	IX	Microprocessi spinosi presenti su tutto il margine anteriore e posteriore.
Assenza di spinulazione	X	Spinulazione presente sul margine posteriore nel settore centrale e laterale.

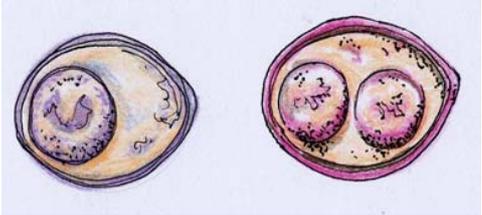
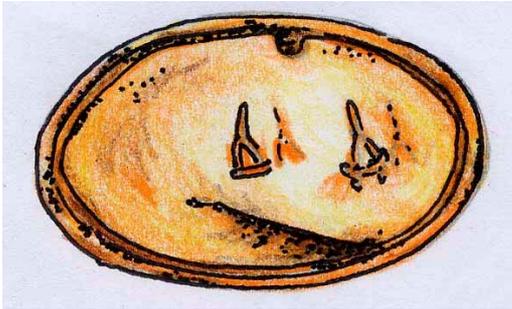
Allegato L

MORFOLOGIA DELLE PIÙ COMUNI UOVA RILEVABILI ATTRAVERSO L'ESAME

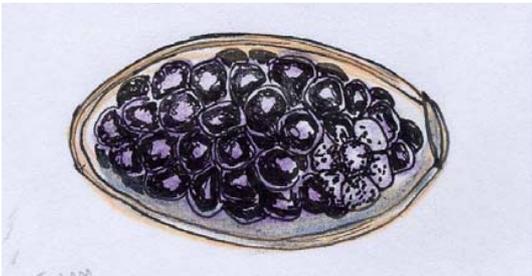
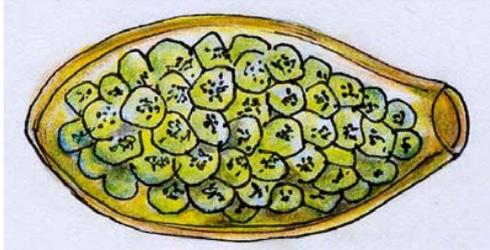
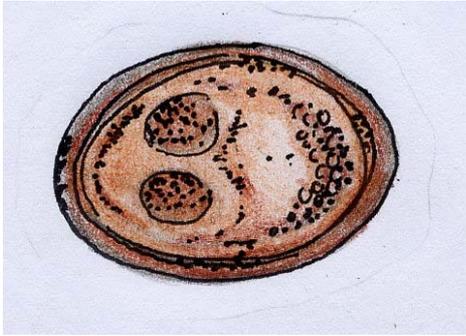
Uova dei parassiti del cane e del gatto

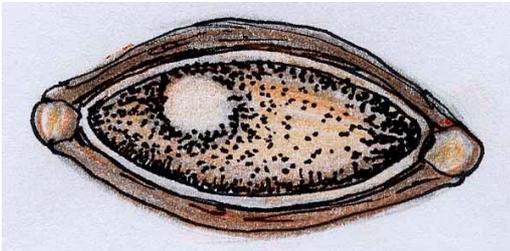
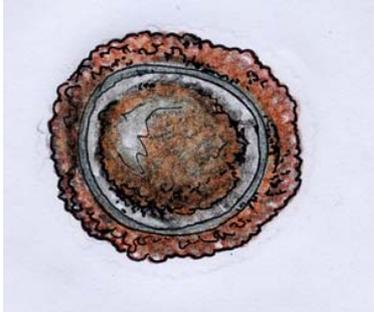
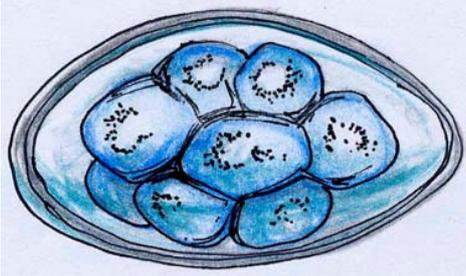
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Anchilostoma caninum</i>		60 x 45	Forma ellissoidale, colore chiaro, con parete sottile liscia e morula a blastomeri.
<i>Toxocara canis</i>		90 x 80	Forma sub-sferica, colore bruno, con parete spessa e granulosa, con un'unica cellula non segmentata (a). Uovo con larva matura L ₃ (b).
<i>Toxocara cati</i>		80 x 70	Forma sub-sferica, colore giallo ambra, con parete spessa e granulosa, con un'unica cellula non segmentata.
<i>Toxoascaris leonina</i>		75 x 70	Forma sub-sferica, colore giallo chiaro, con parete liscia e un'unica cellula non segmentata (a). Uovo con larva matura L ₃ (b).

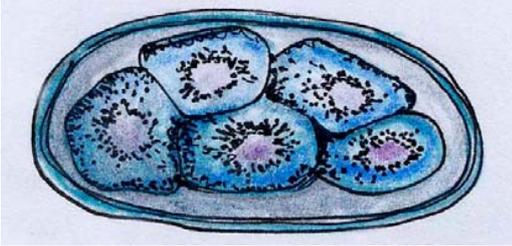
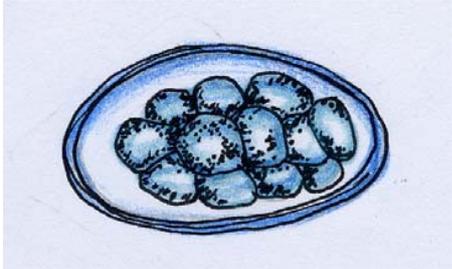
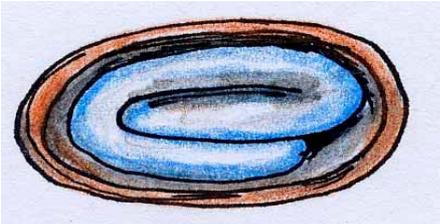
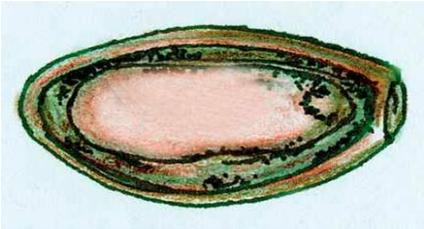
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Trichuris vulpis</i>	 <p style="text-align: center;">a b</p>	80 x 40	<p>Ellissoidali, bottonute ai due poli (forma a limone) bruno-giallastre, con parete liscia con un'unica cellula insegmentata (a).</p> <p>Uovo con larva matura L₃ (b).</p>
<i>Spirocerca lupi</i>		30 x 10	Uovo cilindriche embrionato, con parete spessa contenete una larva
<i>Dypilidium caninum</i>		200 x 120	<p>Capsula ovigera Forma ellissoidale, colore beige, con parete liscia contenente 10-30 uova (oncosfere) di 25-23 μ di diametro.</p>
<i>Taenia spp.</i>		35 x 45	<p>Uovo di forma sferica, colore beige, con parete liscia e spessa contenente un'embrione esacanto provvisto di 3 paia di uncini.</p>

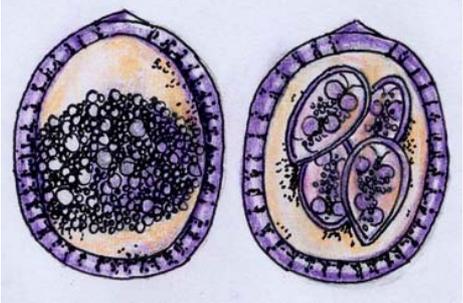
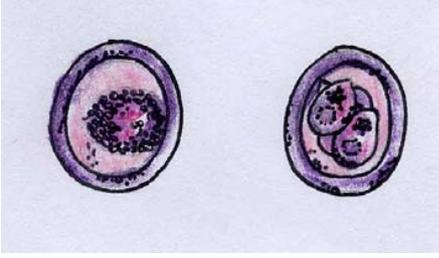
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Isospora</i> spp.	 <p style="text-align: center;">a b</p>	<p>25-50 x 35-40</p>	<p>Oocisti sub-sferica con parete sottile e liscia contenente una formazione sferica (sporonte) granulosa (a). Oocisti contenete 2 sporocisti (b).</p>
<i>Linguatula serrata</i>		<p>90 x 70</p>	<p>Forma ovalare, colore beige, contenente un l'embrione armato con 2 paia di uncini. Parete liscia a triplice strato avvolta da un secreto mucoso che fa aderire le une alle altre.</p>

Uova dei parassiti dei ruminati

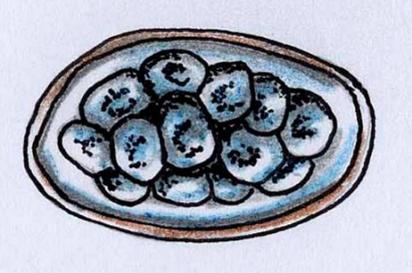
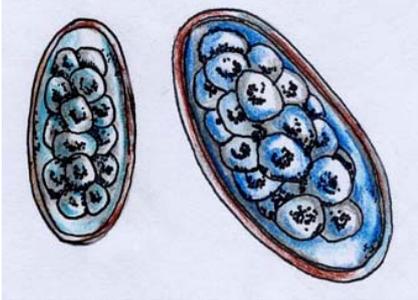
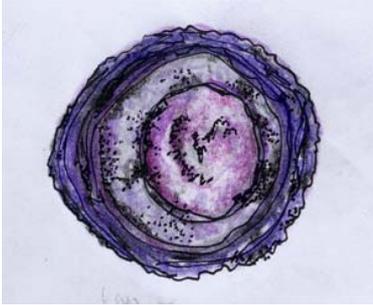
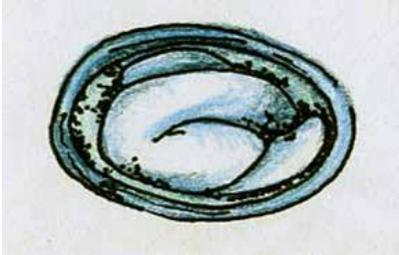
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Fasciola hepatica</i>		160 x 80	Forma ovale, colore giallastro, con parete sottile e liscia ed opercolo poco distinto; contenente una massa di cellule in divisione che occupano l'intero volume
<i>Paramphistomum spp</i>		180 x 100	Uova trasparenti, di forma ovale, opercolate, con parete sottile, contenente una massa in divisione che occupano l'intero volume.
<i>Dicrocoelium dentriticum</i>		40 x 23	Forma ovalare (chicco di caffè), colore bruno, opercolato, contenente un miracidio già formato con due formazioni sferiche (germ balls).
<i>Moniezia expansa</i>		55 x 65	Oncosfera di forma piramidale esagonale, colore trasparente contenente un embrione esacanto entro un apparato piriforme.

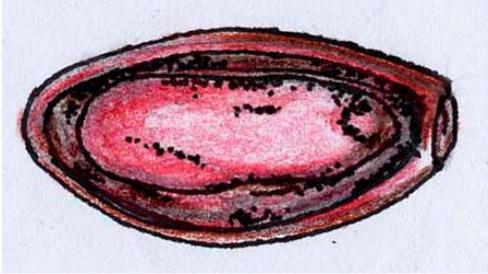
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Moniezia benedeni</i>		70 x 94	Forma cubica, colore trasparente contenente un embrione esacanto (oncosfera di 18-22 μ) provvisto di 3 paia di uncini.
<i>Trichuris ovis</i>		75 x 35	Uova tipicamente bottonute ai due poli (forma a limone) e colore bruno-giallastro contenenti una cellula in segmentata.
<i>Toxocara vitulorum</i>		80 x 70	Forma sub-sferica, colore bruno, con parete spessa e irregolare, con un'unica cellula in segmentata.
<i>Nematodirus spp</i>		200 x 90	Forma ovalare-cilindrico, parete sottile e liscia, morula di grosse dimensioni con 4-8 blastomeri di colore scuro.

Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Bunostomum</i> spp.		110 x 45	Forma ellissoidale, colore trasparente contenente un morula composta da pochi blastomeri.
Trichostrongylidae (comuni uova di strongili gastro-intestinali)		70-90 x 40-60	Forma ellissoidale, colore trasparente contenente un morula composta da numerosi blastomeri che riempiono incompletamente il volume interno.
<i>Strongyloides papillosus</i>		60 x 30	Forma cilindrica, colore trasparente, contenente una larva mobile all'interno con esofago rabditoide.
<i>Skrjabinema ovis</i>		65 x 30	Forma cilindrica, asimmetrica, colore giallastre con tappo mucoide ad una estremità.

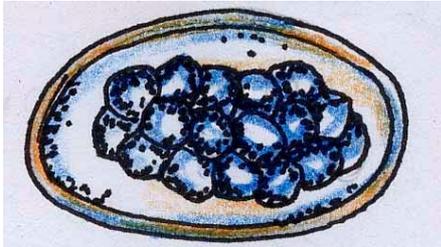
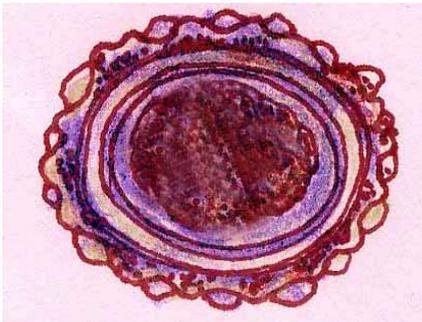
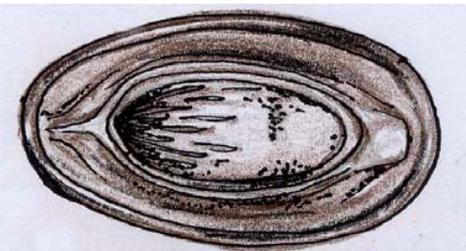
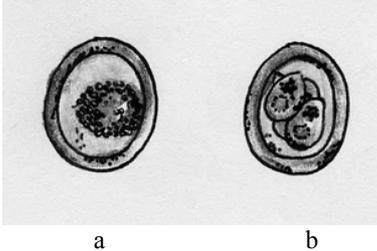
Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Eimeria faurei</i>	 <p style="text-align: center;">a b</p>	28 x 25	Oocisti ellissoidale, giallo-bruna, doppia parete con micropilo evidente contenente uno sporonte (a). Oocisti contenete 4 sporocisti (b).
<i>Eimeria intricata</i>	 <p style="text-align: center;">a b</p>	35 x 40	Oocisti ellissoidale, giallina, doppia parete con micropilo. contiene uno sporonte granuloso (a). Oocisti con 4 sporocisti (b).
<i>Eimeria pallida</i>	 <p style="text-align: center;">a b</p>	15 x 13	Oocisti ellissoidale, trasparente, doppia parete con micropilo impercettibile contenente uno sporonte (a). Oocisti contenete 4 sporocisti (b).

Uova dei parassiti del cavallo

Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Strongylus</i> <i>spp.</i> (grossi strongili)		80-90 x 45-50	Forma ellissoidale, colore trasparente contenente un morula composta da numerosi blastomeri che riempiono il volume interno
Cyatostomidae (piccoli strongili)		100-110 x 40-45	Forma ellissoidale, colore trasparente contenente un morula composta da numerosi blastomeri che riempiono il volume interno.
<i>Parascaris</i> <i>equorum</i>		90 x 85	Forma sub-sferica, colore bruno, con parete spessa con guscio punteggiato con un'unica cellula in segmentata.
<i>Strongyloides</i> <i>westeri</i>		45 x 35	Forma ovale, colore trasparente, contenente una larva mobile all'interno.

Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Oxyuris equi</i>		90 x 45	Forma cilindrica, asimmetrica, colore grigio-bruno con tappo mucoide ad un polo.
<i>Anoplocephala perfoliata</i>		65 x 60	Forma cubica, colore trasparente, apparato piriforme contenente un embrione esacanto (oncosfera di 15 μ) provvisto di 3 paia di uncini.
<i>Eimeria leukarti</i>		80 x 55	Oocisti ellissoidale, brunastra, doppia parete con micropilo evidente contenente una uno sporonte (a). Occisti contenete 4 sporocisti (b).

Uova dei parassiti del suino

Specie	Morfologia	μ	Struttura
<i>Hystrongylus rubidus</i>		70 x 35	Forma ellissoidale, colore trasparente contenente un morula composta da numerosi blastomeri.
<i>Ascaris suum</i>		80 x 50	Forma sub-sferica, colore giallo-bruno, con parete spessa con guscio mammellonato con un'unica cellula insegmentata
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>		90 x 55	Forma ellissoidale, colore brunastro contenente un embrione che presenta una spina.
<i>Eimeria deblickei</i>		25 x 15	Forma ovoidale, con parete spessa con guscio liscio contenente una uno sporonte (a). Occisti contenete 4 sporocisti (b).

I disegni sono stati realizzati dalla Dott.^{ssa} Viviana D. Tarallo.

Allegato M

Scheda accertamento copro-diagnostico piccoli animali

Veterinario.....

Allevatore.....

Proprietario.....

Indirizzo.....

Città.....

Numero:

Data:

SPECIE ANIMALE

CANE M F

NOME.....

RAZZA.....ETA'.....

GATTO M F

NOME.....

RAZZA.....ETA'.....

APPARTAM. VILLA CAMPAGNA CANILE RANDAGIO

CONVIVENZA CON ALTRE SPECIE ANIMALI: SI NO QUALI ?.....

TRATTAMENTI: NO SI MOLECOLA.....EPOCA.....

CONSISTENZA FECI: SOLIDE MOLLI DIARROICHE SANGUINOL.
Vomito

SINTOMAT. GASTRO-INTEST.: LIEVE MODESTA GRAVE Stipsi

DIAGNOSI COPROLOGICA

Elminti del cane e del gatto:
Toxocara canis *Ancylostoma caninum*
Toxascaris leonina *Trichuris vulpis*
Toxocara cati *Aelurostrongylus abstrusus*
Angiostrongylus vasorum
Strongyloides stercoralis

Cestodi del cane e del gatto:

Taenia spp. *Dipylidium caninum*

Protozoi:
Isospora hiedorni *Isospora canis* *Isospora felis*
Isospora rivolta *Cryptosporidium spp.*

ESAME MICROSCOPICO QUANTITATIVO

Metodica: Conta con camera di **Mc Master**, effettuata con sensibilità di **50** u.p.g./o.p.g.

VALORI U.P.G. O.P.G. L.P.G.

0-50	51-100	101-200	201-300	301-400	401-500	501-600	601-700	701-800	801-900	901-1000	> 1000
------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------	--------

Altro.....

Allegato N

Scheda accertamento copro-diagnostico ruminanti

Veterinario.....

Richiedente.....

Indirizzo.....

.....

SPECIE ANIMALE:

CAMPIONI FECALI

PECORA CAPRA BOVINO MATRICOLA n°.....

EVENTUALI TRATTAMENTI EFFETTUATI NO SI

MOLECOLA..... EPOCA

RICHIESTA

ESAME MACROSCOPICO

ESAME MICROSCOPICO QUALITATIVO Baermann

ESAME MICROSCOPICO QUANTITATIVO Metodica Mc Master

COPROCULTURA

DIAGNOSI COPROLOGICA

Strongili gastro-intestinali dei ruminanti:

Toxocara vitulorum

Strongili *Trichuris* spp.

Nematodirus spp. *Strongyloides papillosus*

Strongili bronco-polmonari: *M. capillaris* *N. linearis* *D. filaria*

dei ruminanti *C. ocreatus* *P. rufescens* *D. viviparus*

Trematodi: *Dicrocoelium dendriticum* *Fasciola hepatica*

Paramphistomum spp.

Cestodi: *Moniezia expansa* *Moniezia benedeni*

Protozoi: *Eimeria* spp. *Cryptosporidium* spp.

VALORI U.P.G. O.P.G. L.P.G.

0-50	51-100	101-200	201-300	301-400	401-500	501-600	601-700	701-800	801-900	901-1000

1000-2000	2001-3000	3001-4000	4001-5000	5001-6000	6001-7000	7001-8000	8001-9000	9001-10000

Allegato O

Scheda accertamento copro-diagnostico equini

Veterinario.....
Richiedente.....
Indirizzo.....
.....

Numero:

Data:

CAVALLO PULEDRO

Mesi Anni MATRICOLA n°.....

EVENTUALI TRATTAMENTI EFFETTUATI NO SI

MOLECOLA..... EPOCA

ESAME MACROSCOPICO

ESAME MICROSCOPICO QUALITATIVO Baermann

ESAME MICROSCOPICO QUANTITATIVO

Metodica di Mc Master

DIAGNOSI COPROLOGICA

Strongili gastro-intestinali degli equini:

- Grossi Strongili
- Piccoli Strongili
- Oxyuris equi*
- Parascaris equorum*
- Dictyocaulus arnfieldi*
- Cestodi

Altro.....

VALORI U.P.G. O.P.G. L.P.G.

0-50	51-100	101-200	201-300	301-400	401-500	501-600	601-700	701-800	801-900	901-1000

1000-2000	2001-3000	3001-4000	4001-5000	5001-6000	6001-7000	7001-8000	8001-9000	9001-10000

Allegato P

Scheda accertamento copro-diagnostico suini

Veterinario.....

Richiedente.....

Indirizzo.....

.....

Numero:

Data:

SUINO ADULTO SUINETTO

MATRICOLA.....

EVENTUALI TRATTAMENTI EFFETTUATI NO SI

MOLECOLA..... EPOCA

—————RICHIESTA —————

ESAME MACROSCOPICO

ESAME MICROSCOPICO QUALITATIVO Baermann

ESAME MICROSCOPICO QUANTITATIVO
Metodica di Mc Master

DIAGNOSI COPROLOGICA

Elminti dei suini:

Ascaris suum *Stephanurus dentatus*
Macracanthorhynchus hirudinaceus
Strongyloides ransomi *Oesophagostomun dentatum*

Protozoi:

Eimeria deblieki *Eimeria spp.* *Isospora suis*

VALORI U.P.G. O.P.G. L.P.G.

0-50	51-100	101-200	201-300	301-400	401-500	501-600	601-700	701-800	801-900	901-1000

1000-2000	2001-3000	3001-4000	4001-5000	5001-6000	6001-7000	7001-8000	8001-9000	9001-10000

Allegato Q

Prova pratica dell'esame di parassitologia, malattie parassitarie e tecniche diagnostiche di laboratorio

Argomenti:

A) Metodologie e campionamento

Prelievo ed invio dei campioni, scelta della tecnica analitica. Trattamento e conservazione del campione con gli opportuni reagenti e apparecchiature. Strumentazione di laboratorio. Schede individuali di refertazione.

B) Tecniche di ricerca degli endoparassiti

-Parassiti ematici e del sistema reticolo istiocitario (ricerca di emoprotozoi, di *Leishmania* e di microfilarie), tecniche di colorazioni. Metodiche dirette, indirette, esami specifici e aspecifici.

-Parassiti dell'apparato respiratorio (estrazione delle larve di I stadio).

-Parassiti gastro-intestinali ed epatici: identificazione degli adulti; generalità sulla composizione delle feci; esame copro-macroscopico, soluzioni d'arricchimento, diagnosi copro-microscopica, metodi quali-quantitativi. Determinazione del rischio zootecnico. -Allestimento di coproculture.

-Misurazioni ed identificazione delle oocisti, delle uova, delle oncosfere e delle larve su base morfologica (colorazioni e ricerca di *Giardia* spp. e di *Cryptosporidium* spp.).

-Diagnosi diretta, identificazione su base morfologica delle cisti parassitarie da cestodi.

-Ricerca dei parassiti nelle carni lavorate, trasformate (fresche, refrigerate, congelate, salate, insaccate e in scatola) e nei prodotti ittici.

-Test sierologici: ricerca e determinazione degli anticorpi con metodiche ELISA, IFAT e Test rapidi. Diagnosi molecolare.

C) Tecniche di ricerca degli ectoparassiti

-Acari: ricerca e identificazione degli acari su materiale cutaneo e nel condotto uditivo.

Ricerca e identificazione morfologica delle zecche argasidae e ixodidae.

-Insetti: ricerca e identificazione di culicidi, flebotomi, mosche (lambitrici e pungitrici), culicoidi, tabanidi, pidocchi, pulci, hippoboscidi, cimici e blatte.

Larve di ditteri: ricerca e identificazione morfologica e molecolare delle larve responsabili di miasi (Oestridae, Gasterophilidae, Calliphoridae e Sarcophagidae).

Allegato R

Esame di malattie parassitarie degli animali domestici (prova pratica di laboratorio)

Data esame

Nome del candidato

N° Matricola

Ordinamento

Anno di frequenza del corso

Identificazione del materiale in esame

Descrizione del vetrino 1

.....
.....
.....
.....
.....

Diagnosi

.....

Descrizione del vetrino 2

.....
.....
.....
.....

Diagnosi

.....

ESAME DI MALATTIE PARASSITARIE DEGLI ANIMALI DOMESTICI PROVA PRATICA DI LABORATORIO

Data esame

Nome del candidato

N° Matricola

Ordinamento

Anno di frequenza del corso

Argomento	Punteggio		
	0	1	2
Coprologia animali da compagnia	0	1	2
Coprologia dei ruminanti	0	1	2
Diagnosi Malattie Protozoarie	0	1	2
Diagnosi Leishmaniosi	0	1	2
Diagnosi Filariosi	0	1	2
Diagnosi Ectoparassitosi	0	1	2
Identificazione Protozoi o Oocisti	0	1	2
Identificazione Digenea e loro Uova	0	1	2
Identificazione Cestoda e loro Uova	0	1	2
Identificazione Nematoda e loro Uova	0	1	2
Identificazione di Artropoda	0	1	2
Identificazione Larve di miasi	0	1	2
Identificazione vetrino n° 1	0	1	2
Identificazione vetrino n° 2	0	1	2
Laboratorio di biologia molecolare	0	1	2
Altro	0	1	2

Punteggio Totale: / 10

Firma esaminatore

Firma candidato

Bibliografia

- Ambrosi M.** Parassitologia zootecnica. Edagricole, Bologna 1995.
- A.V.** La leishmaniosi canina. Quaderni di veterinaria. Edizione SCIVAC, Grafica Essebierre, Abbiategrasso (Milano), 1989.
- Boni A., Macchiarelli C.** Microscopia clinica per la diagnostica coprologica. Idelson Napoli, 1987.
- Bowman D.D.** Georgi's Parasitology for Veterinarians, Ed. Sanders, 2003.
- Byron L.B.** Atlante Pfizer di Parassitologia Clinica Veterinaria. Pfizer Inc., 2000.
- Casarosa L.** Parassitologia degli animali domestici. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1997.
- Georgi J.R. e Georgi M.E.** Malattie parassitarie del cane. Edizione italiana a cura di Puccini V. e Giangaspero A. Edagricole, Bologna, 1996.
- Puccini V.** Guida alle malattie parassitarie degli animali domestici. Edagricole, Bologna, 1992.
- Urquhart G.M.** Parassitologia veterinaria. Edizione italiana a cura di Genchi C. Edizioni U.T.E.T., Torino, 1999.
- Soulsby E.J.L.** Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals, 7 th Ed., Baillière Tindall, London, 1986.
- Sloss M.W., Kemp R.L. Zajac A.M.** Veterinary Clinical Parasitology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1994.

www.bariparasitology.it

Università degli Studi di Bari

Facoltà di Medicina Veterinaria

S.S.D. VET/06 “Parassitologia e Malattie Parassitarie”

a cura di Riccardo Paolo Lia

1^a Versione del 15.07.08