ESCCAP

EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES®



4 Diagnosi parassitologica in gatti, cani ed equini

Linee guida ESCCAP 04 Prima edizione – Novembre 2022

ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

Pubblicato per la prima volta da ESCCAP 2022

© ESCCAP 2022–2024

Tutti i diritti riservati

La presente pubblicazione è resa disponibile a condizione che qualsiasi ridistribuzione o riproduzione parziale o totale dei relativi contenuti, in qualsiasi forma o tramite qualunque mezzo, elettronico, meccanico, fotocopie, registrazioni o altro, sia effettuata previa autorizzazione scritta di ESCCAP.

La presente pubblicazione può essere distribuita solo con la copertina con cui è stata pubblicata originariamente, salvo in caso di una previa autorizzazione scritta di ESCCAP.

Una copia della presente pubblicazione è disponibile presso la British Library.

ISBN: 978-1-913757-54-0

INDICE

INTRODUZIONE	6
Campionamento, spedizione e stoccaggio del materiale diagnostico	7
Dotazione standard di un laboratorio parassitologico	8
Mezzi e soluzioni	10
1. ESAMI FECALI	10
1.1. Informazioni generali	10
1.2. Metodi coproscopici	12
1.2.1. Sedimentazione in acqua	12
1.2.2. Flottazione con centrifugazione	13
1.2.3. Metodo combinato di sedimentazione-flottazione	14
1.2.4. Tecnica di conta delle uova McMaster modificata	15
1.2.5. Mini-FLOTAC	16
1.2.6. Tecnica di doppia centrifugazione per l'individuazione di uova di *Anoplocephala* nelle feci di cavallo	17
1.2.7. Tecnica SAFC	18
1.2.8. Metodo Telemann-Rivas	19
1.2.9. Tecnica di Baermann	19
1.2.10. Coltura larvale fecale	20
1.2.11. Strisci fecali, colorazione	20
1.2.12. Metodo del nastro adesivo	21
1.2.13. Kit commerciali per l'analisi delle feci/InPouch™ TF Feline/test antigenico delle feci	21

4 Diagnosi parassitologica in gatti, cani ed equini

Linee guida ESCCAP 04 Prima edizione – Novembre 2022

2. SIEROLOGIA 23

2.1. Informazioni generali 23

2.2. Metodi quantitativi per il rilevamento degli anticorpi 26

2.2.1. Test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) per la ricerca degli anticorpi 26

2.2.2. Test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) 26

2.3. Metodi qualitativi 27

2.3.1. Sistemi di test rapidi 27

3. ESAME DELLA CUTE 27

3.1. Informazioni generali 27

3.2. Pettinatura per la rimozione delle pulci 27

3.3. Raschiati cutanei 28

3.4. Metodo del nastro adesivo 29

3.5. Tricogramma 29

3.6. Rilevamento degli acari nel cerume 30

3.7. Tecniche biomolecolari 30

4. VARIE 30
4.1. Strisci di sangue 30
4.1.1. Informazioni generali 30
4.1.2. Patogeni rilevabili negli strisci di sangue 31
4.2. Metodo del buffy coat 32
4.3. Agoaspirato con ago sottile 32
4.3.1. Informazioni generali 32
4.3.2. Patogeni rilevabili nei campioni ottenuti tramite agoaspirato con ago sottile 33
4.4. Rilevamento e identificazione delle microfilarie 33
4.4.1. Informazioni generali 33
4.4.2. Test di Knott 34
4.4.3. Test di Knott modificato 34
4.4.4. Metodo di filtrazione (Difil-Test®) 34
4.4.5. Colorazione con fosfatasi acida 35
4.4.6. Misurazione delle microfilarie 35
4.5. Metodi di rilevamento e differenziazione biomolecolare: reazione a catena della polimerasi (PCR) 36
4.5.1. Informazioni generali 36
4.5.2. Informazioni specifiche 37
4.6. Rilevamento dei dermatofiti 40
4.6.1. Informazioni generali 40
4.6.2. Esame diretto del pelo 40
4.6.3. Esame con lampada di Wood 40
4.6.4. Coltura micologica 40

APPENDICI

APPENDICE 1 - INFORMAZIONI SU ESCCAP 41
APPENDICE 2 - GLOSSARIO, ABBREVIAZIONI E LINK UTILI 42

INTRODUZIONE

La corretta diagnosi di un'infezione e/o di una malattia è un prerequisito per poter individuare il trattamento appropriato e raggiungere un controllo efficace, e la diagnosi delle malattie parassitarie non fa eccezione. Una diagnosi iniziale basata su anamnesi, segni clinici, analisi ematochimiche, patologia o istopatologia può essere utile per scegliere un'analisi diagnostica specifica per la rilevazione diretta o indiretta dei parassiti (o una combinazione di entrambe).

Lo sviluppo di procedure standard e di buone pratiche di laboratorio è di fondamentale importanza per assistere i veterinari. Che si tratti di confermare la diagnosi di infezione in animali da compagnia che presentano segni clinici compatibili con una malattia parassitaria, o di effettuare uno screening dell'infezione nell'ambito di un programma più ampio di prevenzione e controllo, è necessario disporre di metodi accurati e affidabili.

Rilevamento diretto

I metodi di laboratorio parassitologici consentono spesso il rilevamento morfologico diretto dei parassiti o il rilevamento diretto di molecole di parassiti come antigeni o DNA.

Il rilevamento diretto dei parassiti è possibile attraverso:

- identificazione morfologica (macroscopica, microscopica, diretta o dopo concentrazione, dopo colorazione o marcatura con anticorpi specifici, dopo coltura per funghi patogeni);
- rilevamento immunodiagnostico degli antigeni dei parassiti;
- rilevamento biomolecolare del DNA parassitario;
- rilevamento delle macromolecole parassitarie tramite spettrometria di massa;
- coltura in vitro per la moltiplicazione o lo sviluppo di stadi parassitari.

I fattori limitanti includono:

- distribuzione ed escrezione irregolare dei parassiti;
- campionamento, stoccaggio e trasporto non corretti;
- informazioni genetiche/proteomiche limitate;
- bassa sensibilità o specificità in alcuni casi.

Avvertenza: La rilevazione biomolecolare del DNA o dell'antigene può talvolta portare a risultati falsi positivi, a causa della loro permanenza per un certo periodo di tempo dopo la risoluzione dell'infezione.

Rilevamento indiretto

Per alcune infezioni parassitarie il rilevamento diretto non è sempre possibile, ad esempio a causa della localizzazione dei parassiti nell'organismo, della loro densità, che quando è molto bassa non è rilevabile in modo affidabile con metodi diretti, oppure perché il metodo è tecnicamente molto laborioso o troppo invasivo per il paziente. In questi casi, il rilevamento indiretto, attraverso la diagnosi delle reazioni immunitarie ai parassiti, può essere molto utile. I metodi di rilevamento indiretto prevedono la rilevazione di anticorpi specifici da diversi substrati.

I fattori limitanti includono:

- reazioni immunitarie variabili e ritardate (a seconda del momento successivo all'infezione, dell'intensità, della localizzazione e del tipo di reazione);
- persistenza e reattività incrociata degli anticorpi;
- bassa sensibilità o specificità in alcuni casi.

Gli anticorpi possono permanere nell'organismo per un periodo di tempo variabile dopo che l'infezione è stata risolta, quindi la loro capacità di rilevare le infezioni in corso può essere limitata.

Queste linee guida sono destinate ai professionisti veterinari che eseguono procedure diagnostiche di routine nel loro studio per il rilevamento di infezioni parassitarie e a coloro che inviano regolarmente campioni a laboratori esterni.

Il testo è suddiviso in capitoli, sulla base del materiale da testare e dei metodi disponibili. Include anche informazioni generali sul prelievo, la manipolazione e la conservazione dei campioni.

CAMPIONAMENTO, SPEDIZIONE E STOCCAGGIO DEL MATERIALE DIAGNOSTICO

Considerazioni generali

L'accuratezza dei test diagnostici dipende in larga misura dal corretto campionamento, stoccaggio e spedizione dei materiali da analizzare. Ogni campione deve essere etichettato in modo appropriato (indicando i dati per identificare il paziente e il proprietario e la data del prelievo), spedito in contenitori ermetici e infrangibili (etichettati secondo la legislazione nazionale e internazionale per il trasporto di materiale potenzialmente infettivo), trasferito rapidamente al laboratorio e accompagnato da moduli correttamente compilati per consentire al personale del laboratorio di assegnare il campione ed eseguire il test richiesto. I campioni di sangue/siero devono essere inviati con un corriere notturno in una provetta di plastica chiusa ermeticamente con tappo a vite in una confezione fredda. La provetta deve essere riposta in un sacchetto con chiusura a zip o per campionamento, nel caso in cui la provetta si rompesse, avvolta in materiale protettivo e riposta in una scatola di spedizione robusta.

Molti laboratori forniscono linee guida specifiche per il campionamento e la spedizione. Inoltre, è necessario prendere in considerazione le precauzioni di sicurezza generali e speciali e smaltire correttamente le sostanze tossiche o i materiali infettivi.

Campionamento e stoccaggio

1. Materiale fecale

I campioni fecali devono essere raccolti per via rettale o immediatamente dopo la deposizione, per evitare la contaminazione con materiale proveniente dall'ambiente che potrebbe contenere nematodi a vita libera. L'analisi deve essere eseguita con campioni freschi o dopo la conservazione a 4 °C perché le uova di alcuni elminti e le oocisti di coccidi possono continuare a svilupparsi e modificare le loro caratteristiche diagnostiche. Nei campioni fecali più vecchi, le larve del primo stadio del verme polmonare (L1) potrebbero non essere sufficientemente vitali per la migrazione con la tecnica di Baermann. Le larve di *Strongyloides* spp. e gli strongili possono schiudersi dalle uova rispettivamente dopo ore o giorni e i campioni possono dare un risultato falso negativo per la rilevazione delle uova. Per evitare l'ulteriore sviluppo di uova di nematodi, i campioni e i contenitori devono contenere la minor quantità possibile di ossigeno ed essere ben chiusi.

In parassitologia veterinaria, generalmente i campioni fecali non vengono conservati a lungo prima dell'esame. Lo stoccaggio a lungo termine può richiedere la conservazione, ad esempio con sostanze chimiche (vedere la letteratura specifica per i mezzi di conservazione) o tramite congelamento a -20 °C. In questi casi, va notato che alcuni stadi parassitari, in particolare le larve di nematodi, strongili e altre uova di elminti a guscio sottile, non possono essere rilevati in modo affidabile nel materiale conservato o precedentemente congelato.

2. Siero

Nella maggior parte dei casi, i campioni di siero per l'identificazione e la quantificazione degli antigeni o degli anticorpi sono ottenuti dal sangue periferico. Idealmente, il sangue deve poter fluire liberamente nella provetta, per prevenire l'emolisi. Quando possibile, è necessario prelevare almeno 5 ml di sangue per garantire un volume di siero di 2 ml per un intero profilo di esami. Dopo una coagulazione di almeno 20 minuti, il siero viene separato dal coagulo mediante centrifugazione, trasferito in una provetta nuova e possibilmente spedito subito. Se necessario, il siero può essere conservato a 4 °C per un massimo di 24 ore prima della spedizione. Se è necessario uno stoccaggio per un periodo più lungo, questo deve avvenire a -20 °C. Si noti che la centrifugazione prima della completa coagulazione può causare emolisi, che può interferire con il test; conservare il sangue prelevato troppo a lungo può invece portare alla crescita microbica e alla conseguente degradazione del campione. Se il siero non è disponibile, per alcuni test si può usare il plasma; è bene ricevere conferma dal laboratorio prima dell'analisi.

3. Sangue intero

Per la rilevazione microscopica o molecolare dei parassiti o del loro DNA nel sangue intero (direttamente o dopo la concentrazione, ad esempio nel test di Knott), si utilizzano provette con un anticoagulante (EDTA, Li-eparina). I campioni di sangue intero possono essere conservati a 4 °C per un massimo di 4 giorni. Il congelamento dei campioni a -20 °C per una conservazione più lunga, consentirà comunque la rilevazione del DNA, ma limiterà l'isolamento e l'identificazione degli stadi parassitari.

4. Parassiti isolati

Gli artropodi vivi (e i raschiati cutanei) devono essere conservati in un contenitore ben chiuso per impedirne la fuga. Si può aggiungere del tessuto di carta umido per evitare la disidratazione. Per essere sottoposti a ulteriori esami, i campioni devono essere fissati in etanolo al 70%. I parassiti provenienti da feci, vomito, pelle ecc. devono essere raccolti separatamente e conservati in soluzione fisiologica (a breve termine) o in etanolo al 70%.

DOTAZIONE STANDARD DI UN LABORATORIO PARASSITOLOGICO

Poiché la microscopia è una tecnica standard per la valutazione dei campioni, un microscopio ottico su cui viene fatta un'adeguata manutenzione è indispensabile per la diagnosi parassitologica. Per l'identificazione dei parassiti sono spesso necessarie le misurazioni al microscopio, pertanto devono essere disponibili strumenti per l'esecuzione di misurazioni accurate e standardizzate. Per gli oggetti visibili a occhio nudo, uno stereomicroscopio è di solito l'opzione migliore per un esame dettagliato (vedere Tabella 1).

Tabella 1: Range di ingrandimento e criteri raccomandati per l'identificazione degli stadi parassitari

Stadi	Range di ingrandimento*
Uova e larve di elminti, piccoli artropodi	Basso ingrandimento per lo screening: 40-100x Per maggiori dettagli: 400x
Protozoi	Ingrandimento medio-alto: 400–650x Strisci di sangue, oggetti molto piccoli nelle feci: 1000x (immersione in olio)
Artropodi di grandi dimensioni, elminti adulti (o parti di essi, per esempio proglottidi)	Basso ingrandimento (stereomicroscopio)

* Si noti che l'ingrandimento è calcolato come l'ingrandimento oculare (di solito 8-10x) x l'ingrandimento dell'obiettivo per un microscopio ottico, mentre uno stereomicroscopio utilizza solo un set di lenti di ingrandimento.

Per la diagnosi degli stadi parassitari al microscopio si devono considerare diverse caratteristiche, come le dimensioni, la forma, il colore e la morfologia della superficie, del guscio stesso e del contenuto. Per l'identificazione delle larve di nematodi (vermi polmonari, strongili degli equini, anchilostomi di cani e gatti o *Strongyloides* spp.), si può considerare la mobilità quando sono vive. Inoltre, per l'identificazione è utile considerare strutture specifiche come la morfologia della parte anteriore, dell'esofago e della coda.

Altri strumenti di un laboratorio di diagnostica parassitologica in genere includono:

(A) per la coproscopia:

- Strumenti di pesatura
- Pestello e mortaio
- Contenitore di plastica e spatola, abbassalingua, cucchiaio di plastica o simili
- Bastoncino di plastica o spatola sottile
- Tampone di cotone
- Bottiglia di plastica per lavaggio (*squeeze*)
- Provette da centrifuga (12-15 ml; 50 ml)
- Centrifuga da tavolo con rotore estraibile
- Becher (250 ml) o altro contenitore adatto alla sedimentazione
- Imbuto
- Colini da tè con un setaccio da circa 0,5-1 mm (per flottazione o sedimentazione-flottazione) e 0,3 mm (per sedimentazione)
- Ansa metallica (piegata ad angolo retto, diametro di circa 6 mm), o altri dispositivi per rimuovere le gocce di soluzione di flottazione dalla superficie
- Vetrini per microscopio
- Vetrini coprioggetto
- Olio per immersione
- Piastra di Petri (di vetro o di plastica, con griglia per facilitare l'esame al microscopio)
- Soluzione di blu di metilene (inchiostro)
- Pompa a getto d'acqua (o pipette da 10-20 ml)
- Garza di cotone (20 x 20 cm)
- Pipette Pasteur in plastica o vetro
- Camera per il conteggio di uova od oocisti di vermi (ad es. McMaster, FLOTAC)

Inoltre, per la tecnica di Baermann:

- Apparecchio di fissaggio a imbuto
- Tubo di gomma e morsetto per tubi
- Cilindri di misura calibrati (≥100 ml)
- Agitatore magnetico e magneti di agitazione

Anche per le coprocolture:

- Barattolo di vetro da 500 ml (o simile)
- Piastra di Petri di diametro leggermente superiore a quello del barattolo di vetro
- Camera di coltura a 25 °C, al buio
- Segatura, carbone o vermiculite autoclavati

(B) per ematologia e sierologia:

- A seconda del formato e del metodo di lettura, sono necessari strumenti diversi, ad esempio un microscopio a fluorescenza per IFAT o un lettore di piastre per ELISA, ecc., oltre a pipette di laboratorio e strumenti per la colorazione

(C) per i raschiati cutanei:

- Soluzione di KOH al 10% o lattofenolo
- Olio minerale o glicerina

MEZZI E SOLUZIONI

- NaCl 0,9% (soluzione fisiologica salina)
- Mezzi di flottazione (vedere Tabella 2)
- Soluzione di Lugol (10 g di ioduro di potassio, 5 g di iodio, 200 ml di acqua distillata)
- Etere dietilico[1]
- SAF (sodio acetato, acido acetico e formalina): 4,5 g di acetato di sodio, 6,0 ml di acido acetico concentrato, 12,0 ml di formalina[1]
- Colorazione di Ziehl-Neelsen: carbolfucsina, verde malachite, alcool-acido (15 ml di HCl (37%) in 485 ml di EtOH), metanolo (utilizzare il set di colorazione)

[1] etere, formalina o mertiolato-iodio-formaldeide (contenente mercurio) sono utilizzati per la tecnica di concentrazione SAF (vedere 1.2.7.), il metodo Telemann-Rivas (vedere 1.2.8.) e/o la tecnica MIFC (concentrazione mertiolato-iodio-formaldeide) (non descritta in queste linee guida). La scelta del metodo adottato può essere determinata dalle diverse misure di sicurezza standard di laboratorio relative a queste soluzioni.

Tabella 2: Ingredienti e proprietà delle soluzioni di flottazione per le analisi parassitologiche coproscopiche (selezione)

Soluzione di flottazione	Quantità	Volume d'acqua	Peso specifico*
Soluzione salina satura (NaCl)	340-360 g di NaCl	1000 ml	~1,18-1,2
Soluzione salina di cloruro di zinco ($ZnCl_2$ + NaCl)	275 g $ZnCl_2$ + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Soluzione di cloruro di zinco ($ZnCl_2$)	440 g $ZnCl_2$	1000 ml	1,3
Soluzione di cloruro di zinco ($ZnCl_2$)	660 g $ZnCl_2$	1000 ml	1,45
Soluzione di solfato di zinco ($ZnSO_4$)	760 g $ZnSO_4$	1000 ml	1,3
Soluzione di solfato di magnesio ($MgSO_4$)	350 g di $MgSO_4$	1000 ml	1,28
Soluzione di saccarosio**	550 g di saccarosio	440 ml	1,28
Soluzione salina satura con il 50% di glucosio	375 g di glucosio + 250 g di NaCl	Fino a 1000 ml	1,27
Soluzione salina di saccarosio**	50 g di saccarosio + 100 ml di soluzione salina satura		1,33

* a temperatura ambiente, da misurare con un **densimetro**.

** Aggiungere 0,7 ml di formalina (37%) o 1 g di fenolo cristallino ogni 100 ml, per prevenire la crescita batterica e micotica, oppure conservare a 4 °C.

1. ESAMI FECALI

1.1. Informazioni generali

Esame macroscopico

Prima dell'elaborazione, ogni campione fecale deve essere esaminato macroscopicamente per verificare la presenza di elminti escreti (ad esempio vermi tondi, proglottidi di tenia, tenie) o di sangue (per la conservazione dei parassiti isolati, vedere l'Introduzione).

Esame microscopico

Permette di rilevare uova, capsule ovigere, larve, oocisti, trofozoiti (solo nelle feci fresche, se non mescolate con una soluzione di conservazione) e cisti.

Le uova di elminti e le oocisti di protozoi devono essere differenziate in base alle loro caratteristiche:

- forma: rotonda, ovale, poligonale, a forma di limone;
- dimensioni: grandi = circa 80-150 (-300) µm (ad es. uova di *Fasciola hepatica*, capsule ovigere di *Dipylidium caninum*), medie = circa 60-80 (-120) µm (uova di *Ancylostomatidae*, uova di *Strongylidae*), piccole = circa 40-60 µm (ad es. uova di *Strongyloides* , uova di *Taeniidae*) e molto piccole = circa <40 µm (ad es. oocisti di coccidi e *Cryptosporidium*, cisti di *Giardia*);
- guscio/involucro: spessore, superficie (ad esempio, liscia, ruvida, scalfita), colore, caratteristiche distintive come calotte o micropili;
- contenuto (in relazione al tempo successivo alla deposizione delle feci): cellule non segmentate, blastomeri, embrione o larva nelle uova di elminti, numero di sporocisti e sporozoiti e altre strutture nei coccidi e in altri protozoi.

Le larve di nematodi si differenziano in base alla lunghezza complessiva, alla morfologia della guaina cuticolare, all'apparato digerente e alle estremità anteriori e posteriori. Si distinguono dalle larve di nematodi liberi per l'assenza di guaine aggiuntive. Le larve di nematodi a vita libera hanno un'apertura boccale distinta e sono di colore più scuro rispetto agli stadi larvali infettivi; possono presentare bulbi esofagei e diverse altre caratteristiche particolari.

A seconda del principio operativo, si distinguono diversi metodi coproscopici: procedure dirette senza concentrazione (cioè strisci fecali senza colorazione, rilevamento di stadi mobili o strisci colorati) in contrapposizione ai metodi per la concentrazione degli stadi parassitari:

- Sedimentazione
- Flottazione (con o senza centrifugazione)
- Processo combinato di sedimentazione-flottazione
- Tecnica di Baermann
- Metodi di concentrazione specifici, come il metodo Telemann-Rivas, SAFC, ecc.

Conclusività degli esami coproscopici

I metodi elencati sono spesso in grado di rilevare una gamma di parassiti di diverso tipo; tuttavia, nessun metodo è ugualmente adatto a tutti gli stadi e a tutti i parassiti presenti. Il metodo deve essere scelto in base agli stadi parassitari previsti e per coprire l'intero spettro delle possibili infezioni saranno necessari più metodi.

In generale, maggiore è la quantità di feci, maggiore è la probabilità di rilevare gli stadi parassitari (maggiore sensibilità, cioè meno falsi negativi). Tuttavia, la quantità di feci esaminate sarà limitata dal grado di contaminazione del campione elaborato: troppi detriti riducono la sensibilità (con più falsi negativi) e anche la specificità.

Poiché con il **metodo combinato di sedimentazione-flottazione** è possibile trattare una maggiore quantità di feci, il livello di sensibilità è più elevato, soprattutto nel caso di bassi livelli di escrezione. Pertanto, questo è il **metodo preferito** per gli esami di routine. Come la flottazione e la sedimentazione, questo metodo è classificato come semiquantitativo quando viene eseguito con una metodologia coerente e quantità definite di campioni fecali. La flottazione attiva supportata dalla centrifugazione è preferibile alla flottazione passiva. Inoltre, la scelta della soluzione di flottazione, e quindi del peso specifico di tale soluzione, è fondamentale perché alcuni parassiti non vengono rilevati con un peso specifico elevato e altri non vengono rilevati con un peso specifico basso.

La sensibilità dei metodi coproscopici è limitata dai seguenti fattori:

- Le infezioni devono essere in fase patente, cioè nel substrato devono essere presenti stadi (uova, larve, oocisti) indicanti un'infezione in corso con moltiplicazione/generazione di progenie. Le infezioni pre o postpatenti non possono essere rilevate tramite copromicroscopia.
- Non tutti gli stadi/parassiti sono escreti in modo continuo; possono essere necessari diversi campioni prelevati da singoli animali (ad esempio per 3 giorni consecutivi) o un nuovo campionamento.
- Spesso le infezioni di basso livello producono un numero ridotto di stadi rilevabili. Come già osservato, l'aumento della quantità di feci o l'esecuzione di più analisi per animale possono essere vantaggiosi.

La diarrea può diluire i campioni aumentando il volume delle feci e quindi diminuendo la sensibilità. Per evitare questo problema si può ricorrere al metodo combinato di sedimentazione-flottazione, che concentra le feci liquide per sedimentazione prima della concentrazione dei parassiti per flottazione.

A causa della bassa sensibilità della copromicroscopia, i **risultati negativi** devono essere interpretati con cautela. Il fatto che non vengano rilevati stadi parassitari nelle feci non esclude un'infezione parassitaria in presenza di segni clinici tipici (ad esempio, infezioni ancora in fase prepatente). Questi casi meritano un ulteriore approfondimento. In alcuni casi, possono essere adottati metodi alternativi (ad esempio, la rilevazione di antigeni o anticorpi).

D'altra parte, la rilevazione diretta degli stadi parassitari ha, in generale, un'elevata specificità e i risultati falsi positivi sono rari quando l'analisi è eseguita correttamente. I risultati falsi positivi possono derivare dalla coprofagia nei cani (cioè il passaggio intestinale osservato dei parassiti del gatto *Toxocara cati* o *Toxoplasma gondii* nei campioni fecali dei canidi). Pertanto, è opportuno consigliare ai proprietari di cercare di evitare questo comportamento, in particolare nei giorni precedenti il prelievo di un campione coproscopico, per evitare di rilevare in modo falsamente positivo gli stadi parassitari di passaggio. Il test dell'antigene, disponibile in commercio per alcune specie di nematodi canini, può aggirare questo problema.

In merito all'interpretazione dei risultati in un contesto clinico, i risultati parassitologici devono essere valutati insieme ad altri risultati diagnostici (ad esempio, esame clinico, analisi ematologiche, ecc.) e, nel caso di stadi zoonotici, alle loro implicazioni per la salute umana.

1.2. Metodi coproscopici

1.2.1. Sedimentazione in acqua

Principio:
Con questo metodo, gli stadi parassitari con un peso specifico relativamente alto (ad esempio, le uova di trematodi, soprattutto quelle di *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis felineus*, ma anche le oocisti di *Eimeria leuckarti*) e le particelle fecali pesanti sedimentano rapidamente nell'acqua. Mediante ripetute sedimentazioni e decantazione del surnatante, vengono rimosse le particelle fecali più leggere. Questo metodo viene solitamente applicato per rilevare le uova di parassita epatico dalle feci dei cavalli, ma anche dei gatti.

Materiale fecale richiesto:
5-10 g di feci (la sensibilità aumenta con campionamenti ripetuti).

Procedura:

1. Mescolare il campione fecale con acqua fino a ottenere una soluzione omogenea con l'aiuto di una spatola. Se la consistenza è molto solida, mescolarla preventivamente con acqua utilizzando un pestello e un mortaio.
2. Versare la sospensione di feci/acqua attraverso un piccolo setaccio (con maglie da 0,3 mm) in un contenitore adatto (ad esempio un becher o simile) e sciacquare il setaccio con un forte getto d'acqua utilizzando una bottiglia di plastica per lavaggio fino a riempire il becher.
3. Lasciare riposare per 3 minuti.
4. Versare il surnatante in un unico movimento senza interruzioni (o sifonarlo con una pompa di aspirazione dell'acqua).
5. Riempire il becher con acqua.
6. Ripetere la sedimentazione per tre volte in totale. Il surnatante finale deve essere quasi traslucido.
7. Aggiungere 1-3 gocce di blu di metilene (inchiostro) all'ultima sedimentazione e mescolare accuratamente in modo circolare.
8. Versare l'intero sedimento in una piastra di Petri (rivestita).
9. Esaminare il sedimento al microscopio o allo stereomicroscopio (ingrandimento 20-50x).

Per la rilevazione standardizzata delle uova *di Fasciola* nei campioni di cavallo, è disponibile anche un dispositivo commerciale, FlukeFinder®.

1.2.2. Flottazione con centrifugazione

Principio:
La flottazione viene eseguita per individuare uova di elminti, cisti di protozoi e oocisti che hanno un peso specifico inferiore a quello della soluzione di flottazione. In una sospensione di un campione fecale mescolato con una soluzione di flottazione di densità specifica nota, gli stadi parassitari più leggeri si accumulano in superficie, mentre le particelle più pesanti affondano o rimangono in sospensione.

È possibile utilizzare diverse soluzioni di flottazione (vedere Tabella 2). La soluzione scelta deve essere preparata almeno un giorno prima dell'analisi e il peso specifico deve essere controllato con un densimetro.

Utilizzando una soluzione satura di cloruro di sodio, è possibile rilevare uova di *Strongyloides* (feci fresche), strongili, ascaridi, ossiuri, oocisti di coccidi e altre cisti di protozoi. Con questo metodo, gli stadi parassitari galleggiano grazie al loro basso peso specifico in una soluzione salina con peso specifico più elevato. L'individuazione di uova di *Trichuris*, *Capillaria*, *Taeniidae*, spiruridi o ossiuridi e delle oocisti di *Eimeria leuckarti* può essere incerta, poiché richiedono soluzioni di flottazione con peso specifico più elevato. Le cisti di *Giardia* sono deformate, mentre le uova di trematodi non vengono rilevate. La conservazione prolungata di uova di elminti o stadi di protozoi in soluzioni ipertoniche può portare alla deformazione degli stadi, complicando la diagnosi. Talvolta nei preparati di flottazione possono essere rilevate delle larve di nematodi, che in genere si riducono rapidamente, con una forte compromissione della diagnosi morfologica.

Oltre agli stadi sopra citati, le uova di *Trichuris*, *Capillaria*, *Taeniidae* e spiruridi e le cisti di *Giardia* (deformi) possono essere rilevate utilizzando soluzioni di solfato di zinco, cloruro di zinco, solfato di magnesio o saccarosio/sale di saccarosio. Le soluzioni usate contenenti zinco (metallo pesante) devono essere raccolte e smaltite come rifiuti speciali.

Sono possibili diversi adattamenti alla tecnica di flottazione standard, alcuni dei quali sono descritti di seguito.

Materiale fecale richiesto:
Piccoli animali: 4-5 g (circa la dimensione di una noce), possibilmente raccolti per 3 giorni consecutivi, analizzati come sottocampione del campione raggruppato; cavalli: fino a 20 g di feci.

Procedura:

1. Preparare la soluzione di flottazione a temperatura ambiente e verificare il peso specifico con un densimetro (se non disponibile, fino a quando il sale è quasi completamente disciolto).
2. Mescolare il campione fecale con un volume 10 volte superiore di soluzione di flottazione fino a ottenere una soluzione omogenea. Se la consistenza è solida, immergere preventivamente il campione in acqua.
3. Versare la sospensione fecale attraverso un setaccio e un imbuto in due provette da centrifuga per campione. Lasciare un margine di 1 cm dall'estremità superiore di ogni provetta per evitare la fuoriuscita all'interno della centrifuga.
4. Centrifugare le provette per 3-5 minuti a 300 x *g*.
5. Con un'ansa metallica (o un dispositivo simile), prelevare 3-5 gocce dalla superficie della sospensione e posizionarle su un vetrino da microscopio.
6. Coprire il vetrino con un vetrino coprioggetto ed esaminare al microscopio con un ingrandimento di 40x. Mettere a fuoco al livello ottico corretto usando come riferimento piccole bolle d'aria o particelle. L'intera area del vetrino coprioggetto può quindi essere esaminata con un ingrandimento maggiore (100–400x). Nei casi di campioni solo moderatamente sporchi, l'esame senza vetrino coprioggetto a basso ingrandimento può aumentare la sensibilità, poiché le uova e le cisti si concentrano sulla superficie convessa delle gocce.

Esistono diverse opzioni per l'esame microscopico degli stadi parassitari che galleggiano sulla superficie dei campioni:

- Alcune gocce dalla superficie della sospensione fecale possono essere trasferite su un vetrino utilizzando un'ansa metallica piegata ad angolo retto e quindi esaminate (con o senza vetrino coprioggetto) al microscopio. Fare attenzione a non rompere la superficie della sospensione quando si rimuovono le gocce e assicurarsi che l'occhiello venga pulito tra un campione e l'altro (lavaggio seguito da flambatura).
- Posizionare un vetrino coprioggetto sull'orlo di una provetta da centrifuga riempita (il vetrino coprioggetto deve essere a contatto con la superficie della soluzione di flottazione) e centrifugare con il vetrino coprioggetto in posizione. Il vetrino coprioggetto può quindi essere rimosso, posizionato su un vetrino da microscopio ed esaminato al microscopio. Gli stadi parassitari galleggianti vengono trasferiti sul vetrino insieme al liquido che aderisce al lato inferiore del vetrino coprioggetto. La centrifugazione con un vetrino coprioggetto funziona meglio con una soluzione di saccarosio.
- Dopo la centrifugazione, posizionare un vetrino coprioggetto sulla provetta (per fare questo, la provetta deve essere riempita fino all'orlo in modo che la sospensione formi un menisco) e attendere qualche minuto per permettere agli stadi parassitari di galleggiare.

1.2.3. Metodo combinato di sedimentazione-flottazione

Con questo metodo, gli stadi parassitari prima si accumulano, formando un sedimento nell'acqua, e poi galleggiano grazie al loro basso peso specifico in una soluzione di flottazione con un peso specifico più elevato. Il vantaggio di questo metodo combinato è la maggiore sensibilità, poiché è possibile esaminare una quantità maggiore di feci (fino a 20 g).

Il metodo può essere utilizzato per identificare con precisione tutte le classi di uova di elminti e la maggior parte delle oocisti e cisti di protozoi. L'individuazione delle larve di nematodi e delle uova di trematodi richiede una certa esperienza perché si deformano. Con questo metodo non è possibile individuare trofozoiti e cisti di amebe.

Materiale fecale richiesto:
Per cani e gatti, si raccolgono almeno 4-5 g di feci (all'incirca delle dimensioni di una noce). In alcuni casi, per aumentare le probabilità di rilevamento, può essere utile raccogliere campioni fecali in ciascuno dei 3 giorni successivi e analizzare un sottocampione del campione raggruppato. Per i cavalli: fino a 20 g di feci.

Procedura:

1. Mettere il campione in un mortaio e mescolarlo accuratamente con l'acqua usando il pestello.
2. Versare la sospensione feci/acqua attraverso un piccolo setaccio e un imbuto in due provette da centrifugazione. Sciacquare le feci attraverso il setaccio utilizzando un getto d'acqua abbondante da un flacone spray (nel processo non si deve perdere materiale).
3. Centrifugare per 8 minuti, a circa 500-700 x *g*, per la sedimentazione.
4. Versare il surnatante in un unico movimento senza interruzione (o sifonarlo con una pompa di aspirazione dell'acqua) fino a quando non rimangono al massimo 5 mm di sedimento.
5. Riempire le provette con la soluzione di flottazione.
6. Centrifugare le provette per 3-5 minuti a 300 x *g*.
7. Procedere come per la tecnica di flottazione (vedere 1.2.2.).

In alternativa, se non è disponibile una centrifuga, mescolare il campione fecale con acqua e lasciare le provette a temperatura ambiente per 30 minuti o un'ora, versare il surnatante e mescolare il sedimento con la soluzione di flottazione fino a osservare un menisco. Aggiungere un vetrino coprioggetto, attendere 10-20 minuti (a seconda della soluzione di flottazione), mettere il vetrino coprioggetto su un vetrino ed esaminare al microscopio. Questo metodo è meno sensibile di quelli basati sulla centrifugazione e di solito rileva solo gli stadi parassitari presenti in numero maggiore.

1.2.4. Tecnica di conta delle uova McMaster modificata

Principio:
Questa tecnica viene adottata per l'esame **quantitativo** delle uova di elminti o delle oocisti di coccidi nelle feci. Una quantità definita di feci viene fatta galleggiare in una camera e contata al microscopio sotto un campo marcato. Dal numero di stadi contati, si calcola la quantità in 1 g di feci, espressa come epg (conta delle uova per g) o opg (conta delle oocisti per g). La conta delle uova viene spesso adottata per la determinazione quantitativa delle uova di strongili nei cavalli, ma è applicabile anche ad altri stadi parassitari che galleggiano. Di solito si utilizza una soluzione di flottazione di NaCl satura; utilizzando soluzioni di flottazione con densità specifica più elevata, è possibile rilevare uova più pesanti.

Per gli studi di campo sulla resistenza ai farmaci, la tecnica viene applicata prima e dopo il trattamento antielmintico (test di riduzione della conta delle uova nelle feci, FECRT). Il FECRT è un test di screening per l'efficacia del trattamento.

Nei programmi di controllo con trattamenti mirati e selezionati, la conta epg fornisce informazioni sul ruolo dei singoli animali nella contaminazione dei pascoli e può essere utilizzata per supportare il processo decisionale nelle procedure di trattamento selettivo dei cavalli (si rimanda alle linee guida 8 dell'ESCCAP: Linee guida per il trattamento ed il controllo delle infezioni parassitarie gastrointestinali degli equidi).

A causa dei suoi limiti di rilevazione (vedere sotto), la tecnica di conteggio delle uova di McMaster modificata non è raccomandata per lo screening dei parassiti negli animali, specialmente per gli endoparassiti altamente rilevanti (ad esempio *Echinococcus* spp. nei carnivori o *Parascaris* spp. nei cavalli).

Materiale fecale richiesto:
Almeno 4 g di feci.

Procedura:
1. Mescolare esattamente 4 g di feci con circa 30 ml di soluzione di flottazione in un mortaio e pestello.
2. Versare la sospensione di feci attraverso il setaccio e l'imbuto nel cilindro; spremere i residui del setaccio con un pestello; lavare il mortaio e il pestello con la soluzione di flottazione.
3. Rimuovere il setaccio e l'imbuto e riempire la soluzione di flottazione fino a 60 ml.
4. Trasferire la sospensione in un becher e mescolare bene agitando continuamente, ad esempio con un agitatore magnetico.
5. Prelevare rapidamente un campione con una pipetta e riempire il primo scomparto del vetrino di conteggio con un volume di almeno 0,15 ml. La griglia di conteggio deve essere riempita completamente; non devono essere introdotte bolle d'aria.
6. Mescolare di nuovo accuratamente la sospensione e prelevare un secondo campione per riempire il secondo scomparto del vetrino.
7. Lasciar riposare il vetrino per 5-10 minuti per permettere alle uova/oocisti di galleggiare.
8. Posizionare il vetrino di conteggio sul microscopio e contare tutti gli stadi parassitari all'interno della griglia di conteggio (ingrandimento 40–100x).

Calcolo di epg/opg:
epg/opg = (numero di uova/oocisti di tutte le griglie contate (N)/ quantità di feci (g) x area della griglia di conteggio (cm^2)) x volume della sospensione fecale (ml)/altezza della camera di conteggio (cm) x numero di griglie contate (n),
- con N indicante il numero medio di uova/oocisti contate per griglia;
- con n come numero di griglie contate;
- volume sotto la griglia = area della griglia di conteggio (cm^2) x altezza della camera di conteggio (cm).

A titolo di esempio:
Quando la quantità di feci = 4 g e il volume della sospensione = 60 ml e il volume sotto la griglia = 0,15 ml, il limite tecnico di rilevazione inferiore è 100 epg/opg. Con vetrini dotati di due camere e sommando il numero totale di uova contate sotto entrambe le griglie, il limite tecnico di rilevazione inferiore per vetrino è di 50 epg/opg.

epg/opg =

uova contate		volume della sospensione fecale (ml)
quantità di feci (g) x dimensione della griglia (cm^2)	**x**	altezza della camera (cm) x numero di griglie contate

epg/opg = uova/oocisti per grammo di feci
Dimensioni della griglia: 1 x 1 cm = 1 cm^2
altezza della camera = 0,15 cm
volume sotto la griglia = 0,15 ml (calcolato in base all'altezza della camera e alle dimensioni della griglia)
numero di griglie contate: può variare, quindi è incluso nella formula

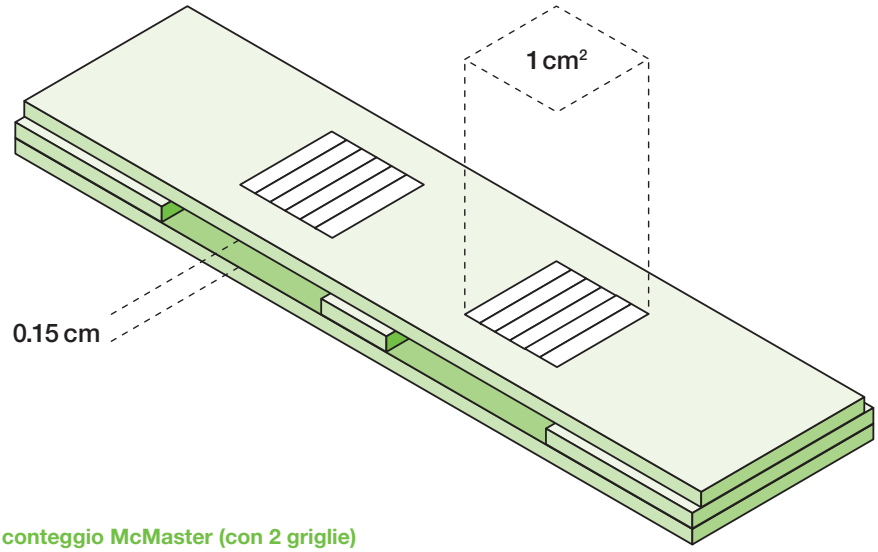


Figura 1: Camera di conteggio McMaster (con 2 griglie)

1.2.5. Mini-FLOTAC

Principio:
Il Mini-FLOTAC consente di rilevare e quantificare i parassiti gastrointestinali, comprese le oocisti di coccidi, le uova di elminti e le larve di nematodi. È derivato dall'apparecchiatura FLOTAC originale, ma ha il vantaggio di non richiedere una fase di centrifugazione. Il Mini-FLOTAC può essere eseguito su campioni fecali freschi o fissati, e offre l'opportunità di elaborare i campioni giorni o settimane dopo il trasferimento in laboratorio. La sensibilità del Mini-FLOTAC è di 5 oocisti/uova/larva/coccidi per grammo di feci.

Il Mini-FLOTAC è composto da due componenti: la base e il disco di lettura. Sono presenti due camere di flottazione da 1 ml, progettate per l'esame di sospensioni di campioni fecali che consentono un ingrandimento massimo di 400x.

Fill-FLOTAC 2 e 5 sono dispositivi di campionamento monouso che fanno parte dei kit FLOTAC e Mini-FLOTAC. Sono costituiti da un contenitore, un raccoglitore (2 g o 5 g) e un filtro. Questi kit facilitano l'esecuzione delle prime quattro fasi consecutive delle tecniche Mini-FLOTAC, ossia la raccolta del campione (compresa la pesatura), l'omogeneizzazione, la filtrazione e il riempimento. Il kit e il processo del Mini-FLOTAC sono descritti di seguito.

Per il cane e il gatto

Materiale fecale richiesto:
Almeno 2 g di feci.

Procedura:

1. Aggiungere 18 ml di soluzione di flottazione nel contenitore Fill-FLOTAC 2.
2. Con una spatola, riempire il raccoglitore conico del dispositivo Fill-FLOTAC con 2 g di feci e livellare la superficie.
3. Omogeneizzare il campione muovendo su e giù il raccoglitore conico.
4. Mettere l'asta sul Fill-FLOTAC, omogeneizzare brevemente e poi riempire le due camere del dispositivo Mini-FLOTAC fino a formare un piccolo menisco.
5. Dopo 10 minuti, ruotare il disco di lettura in senso orario e posizionare il dispositivo sotto un microscopio utilizzando l'adattatore fornito con il kit. Il Mini-FLOTAC può essere esaminato con un ingrandimento massimo di 400x.
6. Esaminare il campione leggendo entrambe le camere del Mini-FLOTAC. Moltiplicare ogni uovo contato per 5 per ottenere il conteggio di uova/larve/oocisti per grammo.

Nota: per un'individuazione affidabile delle uova di *Taeniidae*, è necessario utilizzare soluzioni di flottazione con una densità più elevata (vedere Tabella 2).

Per i cavalli

Materiale fecale richiesto:
Almeno 5 g di feci.

Procedura:

1. Aggiungere 45 ml di soluzione di flottazione (cioè NaCl saturo) nel contenitore Fill-FLOTAC 5.
2. Con una spatola, riempire il raccoglitore conico del dispositivo Fill-FLOTAC con 5 g di feci e livellare la superficie.
3. Omogeneizzare il campione muovendo su e giù il raccoglitore conico.
4. Mettere l'asta sul Fill-FLOTAC, omogeneizzare brevemente e poi riempire le due camere del dispositivo Mini-FLOTAC fino a formare un piccolo menisco.
5. Dopo 10 minuti, ruotare il disco di lettura in senso orario e posizionare il dispositivo sotto un microscopio utilizzando l'adattatore fornito con il kit. Il Mini-FLOTAC può essere esaminato con un ingrandimento massimo di 400x.
6. Esaminare il campione leggendo entrambe le camere del Mini-FLOTAC. Moltiplicare ogni uovo contato per 5 per ottenere il conteggio delle uova per grammo.

1.2.6. Tecnica di doppia centrifugazione per l'individuazione di uova di *Anoplocephala* nelle feci di cavallo

L'individuazione delle uova di tenia nelle feci di cavallo con il metodo standard di flottazione con 20 g di feci fornisce solo una sensibilità limitata. L'utilizzo di una procedura combinata di sedimentazione-flottazione, durante la quale vengono impiegate due fasi di centrifugazione con 15 g di feci, fornisce un tasso di rilevamento più elevato.

Materiale fecale richiesto:
15 g

Procedura:

1. Mescolare accuratamente il campione fecale (minimo 15 g) con almeno 40 ml di acqua utilizzando una spatola.
2. Posizionare il setaccio sopra il becher da 250 ml e trasferire il campione fecale nel setaccio. Far passare tutto il liquido attraverso il setaccio premendo il campione fecale con la spatola.
3. Trasferire il filtrato in provette da 50 ml.
4. Centrifugare per 10 minuti a 400 x *g*.
5. Rimuovere il surnatante con una pompa di aspirazione o una pipetta.
6. Sciogliere i granuli rimanenti in 1-2 ml di soluzione di saccarosio e trasferire la sospensione in una provetta da 15 ml.
7. Riempire con soluzione di saccarosio.
8. Centrifugare per 10 minuti a 200 x *g*.
9. Con un'ansa metallica, trasferire le gocce dalla superficie (completa) della sospensione fecale centrifugata su un vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto.
10. Esaminare al microscopio l'intera area sotto il vetrino coprioggetto come descritto nella sezione 1.2.2.

1.2.7. Tecnica SAFC

Principio:
La tecnica **SAFC** (**S**odium Acetate Acetic **A**cid **F**ormalin **C**oncentration) è adatta a rilevare gli stadi incistati e vegetativi di protozoi (ad esempio *Giardia*) e piccole uova di alcuni trematodi come *Opisthorchis* e *Metorchis*. Si utilizza la precedente conservazione dei campioni fecali freschi in soluzione SAF. Con la lavorazione del campione, i componenti grassi vengono rimossi con l'etere e gli stadi parassitari vengono concentrati. Varianti della tecnica SAFC sono il metodo Telemann-Rivas (vedere 1.2.8.) e la tecnica MIFC (non descritta in queste linee guida).

Soluzione SAF:
20 ml di acido acetico concentrato
40 ml di formaldeide (37%)
15 g di acetato di sodio
1 L di acqua distillata

Materiale fecale richiesto:
Almeno 1 g di feci fresche trasferite in provette con 10 ml di soluzione SAF.

Procedura:

1. Agitare la provetta contenente le feci e la soluzione SAF.
2. Versare metà della sospensione attraverso una garza in una provetta da centrifuga e centrifugare per 2 minuti (500 x *g*).
3. Decantare il surnatante, aggiungere 8 ml di soluzione fisiologica e mescolare il sedimento con una spatola o un bastoncino di plastica.
4. Aggiungere 3 ml di etere etilico, chiudere la provetta e mescolare il contenuto agitando delicatamente.
5. Rimuovere il coperchio e centrifugare per 5 minuti (500 x *g*) per consentire la formazione di diversi strati.
6. Staccare i detriti dalla parete della provetta con un bastoncino e decantare il surnatante.
7. Trasferire due o più gocce di sedimento su un vetrino. Aggiungere facoltativamente la soluzione di Lugol, quindi coprire le gocce con un vetrino coprioggetto.
8. Esaminare al microscopio l'intera area sotto i vetrini coprioggetto come descritto nella sezione 1.2.2.

1.2.8. Metodo Telemann-Rivas

Principio:
Questo metodo è una variante della tecnica SAFC. Permette di concentrare le uova, le cisti e le larve in campioni fecali con elevate concentrazioni di grassi (come quelli dei carnivori).

Materiale fecale richiesto:
1 g, fresco.

Procedura:

1. Pesare 1 g di feci fresche.
2. Mettere le feci in un barattolo di vetro e aggiungere 5 ml di acido acetico (con una concentrazione minima del 5%).
3. Omogeneizzare accuratamente con un bastoncino e filtrare attraverso un doppio strato di garza.
4. Trasferire la soluzione fecale in una provetta da centrifuga (12 ml).
5. Aggiungere una quantità uguale di etere etilico e mescolare agitando.
6. Centrifugare per 5 minuti (300 x *g*). La miscela si separa in 4 strati (dall'alto verso il basso): etere etilico/detrito (compresi i componenti grassi)/acido acetico/sedimento. Il sedimento è spesso molto piccolo.
7. Prelevare il sedimento con una pipetta e trasferirlo su un vetrino. Aggiungere facoltativamente la soluzione di Lugol per la rilevazione di alcuni stadi parassitari (es. cisti di *Giardia*); coprire le gocce con un vetrino coprioggetto.
8. Esaminare al microscopio l'intera area sotto i vetrini coprioggetto come descritto nella sezione 1.2.2.

1.2.9. Tecnica di Baermann

Principio:
Questo metodo viene solitamente utilizzato per l'isolamento di larve di nematodi mobili (L1 di vermi polmonari, *Strongyloides*). La tecnica di Baermann può essere utilizzata anche per recuperare larve al terzo stadio (L3) di strongili dalla coprocoltura. Il principio si basa sulla migrazione delle larve (idrotassi positiva) e sulla gravità, pertanto può essere eseguito solo con larve vive provenienti da feci fresche. Pesando le feci e contando tutte le larve presenti (o aliquote rappresentative), è possibile effettuare un'analisi quantitativa.

Materiale fecale richiesto:
Almeno 4-10 g di feci; il campionamento per tre giorni consecutivi è utile per superare lo spargimento intermedio di L1 dei vermi polmonari.

Procedura:

1. Preparare l'apparecchio Baermann posizionando l'imbuto nel dispositivo di fissaggio dell'imbuto e il tubo di gomma sull'estremità dell'imbuto, con la pinza parallela al taglio angolare della gomma e il primo lato di apertura della pinza più vicino al fondo. Versare un po' di acqua di rubinetto nell'imbuto. Assicurarsi che la pinza non abbia perdite, ad esempio riempiendo l'apparecchio il giorno prima dell'uso.
2. Mescolare bene le feci (se il campione è solido e compattato, si può usare della segatura per scioglierle) e mettere il composto omogeneo nella garza.
3. Mettere la garza contenente le feci nell'imbuto e aggiungere acqua fino a coprirla quasi completamente.
4. Tenere il campione per almeno 12 ore a temperatura ambiente. Le larve migrano dalle feci nella provetta e affondano (per gravità) fino all'estremità dell'imbuto.
5. Aprendo la pinza di gomma, le prime gocce possono essere analizzate al microscopio (ingrandimento 40–400x). Se le larve si muovono, si può aggiungere 1 goccia di soluzione di Lugol, che uccide le larve facilitando l'identificazione delle loro caratteristiche morfologiche. In alternativa, raccogliere 10-14 ml di liquido in una provetta, centrifugare per 2 minuti (500 x *g*), scartare il surnatante ed esaminare 0,5-1 ml di sedimento.

Per la determinazione quantitativa del numero di larve per grammo di feci (GPL), pesare preventivamente le feci, contare tutte le larve (o le aliquote) nel sedimento ed estrapolare il GPL.

1.2.10. Coltura larvale fecale

Principio:
Vengono effettuate coprocolture con feci di cavallo per il recupero di larve al terzo stadio (L3) di nematodi gastrointestinali: le uova di tricostrongilidi e strongilidi vengono coltivate fino a L3 per consentire la differenziazione a livello di genere.

Materiale fecale richiesto:
Almeno 50 g di feci, prelevate direttamente dal retto o subito dopo la defecazione per evitare la contaminazione con i nematodi del suolo.

Procedura:

1. Mescolare le feci con segatura sterilizzata fino a ottenere una massa umida e friabile (se necessario, aggiungere acqua di rubinetto, ma assicurarsi che l'acqua rimanga assorbita; se la miscela è troppo umida, le larve non si svilupperanno).
2. Trasferire il composto in un barattolo di vetro con tappo a vite, riempito per metà, e chiudere leggermente il coperchio (l'aria deve poter entrare nel barattolo).
3. Incubare il barattolo per 7-10 giorni al buio a 25 °C, permettendo alle larve sviluppate di migrare sulle pareti di vetro del barattolo.
4. Aprire il barattolo e premere la coltura fecale con un pestello o un cucchiaio.
5. Riempire con cura il barattolo fino all'orlo con acqua di rubinetto senza agitare la coltura fecale.
6. Premere con forza il coperchio di una piastra di Petri di vetro sul collo del barattolo di vetro, quindi capovolgere la coltura.
7. Riempire per metà la piastra di Petri con acqua e lasciare riposare il barattolo e la piastra per 12 ore, per consentire alle larve di passare dal bicchiere di coltura al liquido della piastra di Petri.
8. Raccogliere il liquido nella piastra di Petri con una pipetta e differenziare le larve al microscopio (vedere 1.2.9.).

In alternativa, dopo l'incubazione e lo sviluppo delle larve del terzo stadio (punto 3), queste possono essere concentrate con il metodo di Baermann (vedere 1.2.9.).

1.2.11. Strisci fecali, colorazione

Principio:
Gli strisci fecali diretti su vetrini da microscopio possono essere un'opzione più rapida per l'individuazione di un ampio numero di larve di vermi polmonari o di protozoi trofozoiti. Tuttavia, senza concentrazione, questa procedura ha una bassa sensibilità e nella maggior parte dei casi è insufficiente per una rilevazione affidabile dei parassiti. L'unica eccezione è rappresentata dalla colorazione per rilevare il *Cryptosporidium* qui descritta.

Le oocisti di *Cryptosporidium* possono essere rilevate in sottili strisci fecali dopo la colorazione. Dopo la colorazione di Ziehl-Neelsen modificata (colorazione Acid-Fast) le oocisti appaiono come oggetti tondeggianti di colore rosa (diametro 4-6 µm) su uno sfondo turchese. Dopo la colorazione con carbolfucsina secondo Heine, le oocisti sono visibili come strutture prive di colore su uno sfondo rossastro. Anche altre colorazioni, come quella di Kinyoun, sono adatte a rilevare tali oocisti.

Materiale fecale richiesto:
1 g di feci, semiliquide o liquide (mescolate con acqua se troppo solide).

Procedura di colorazione (Ziehl-Neelsen):

1. Distribuire il materiale fecale in uno strato sottile su un vetrino da microscopio utilizzando un tampone di cotone.
2. Lasciare asciugare all'aria per circa 30 minuti a temperatura ambiente.
3. Fissare in metanolo per 5 minuti in una stazione di colorazione.
4. Lasciare asciugare all'aria.
5. Colorare con carbolfucsina per 4 minuti in una stazione di colorazione.
6. Risciacquare con acqua corrente fredda.
7. Decolorare con alcool acido in una stazione di colorazione fino a quando il colore non scorre più.
8. Risciacquare con acqua corrente fredda.
9. Controcolorare con verde malachite per 4 minuti in una stazione di colorazione.
10. Risciacquare con acqua corrente fredda.
11. Lasciare asciugare all'aria.
12. Eseguire un esame microscopico con ingrandimento 400–1000x (immersione in olio), alla ricerca di oggetti tondeggianti di colore rosa (diametro 4-6 µm).

Procedura (colorazione di Heine):

1. Mescolare una goccia di feci con la carbolfucsina e spalmare uno strato sottile su un vetrino da microscopio.
2. Lasciare asciugare all'aria fino a quando la superficie appare opaca ed esaminare immediatamente al microscopio con immersione in olio come descritto sopra.

1.2.12. Metodo del nastro adesivo

La tecnica dell'impronta diretta utilizza un nastro adesivo trasparente (largo circa 1 cm e lungo 4 cm) per raccogliere il materiale intorno all'ano dei cavalli e individuare le uova di *Oxyuris equi*. Lo stesso metodo può essere applicato per ottenere uova di *Echinococcus* e di altre *Taeniidae* dall'area perianale dei cani. Il lato appiccicoso del nastro viene premuto più volte sulla pelle. Successivamente, viene premuto (sempre con il lato appiccicoso rivolto verso il basso) su un vetrino. Il nastro funge da coprioggetto e il campione può essere valutato al microscopio.

1.2.13. Kit commerciali per l'analisi delle feci/ InPouch™ TF Feline/test antigenico delle feci

Per facilitare l'esame delle feci sono disponibili in commercio diversi kit per l'esecuzione della procedura di flottazione (ad esempio Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus); questi kit funzionano con una soluzione di flottazione pronta all'uso (peso specifico 1,2) e recipienti per l'analisi.

In generale, questi kit sono più adatti per l'analisi delle feci di cani e gatti. Sono interessanti perché sono facili da usare e rappresentano un modo igienico di manipolare ed esaminare i campioni fecali.

Tuttavia, occorre considerare che i kit sono in grado di trattare solo piccole quantità di feci perché il recipiente è piccolo e la procedura può comportare il montaggio del campione fecale sul lato inferiore dell'inserto del setaccio. Di conseguenza, i kit sono adatti solo per campioni raccolti da carnivori e, nel caso di infestazioni leggere, hanno una sensibilità di rilevamento inferiore (minore quantità di feci esaminate, minore peso specifico delle soluzioni di flottazione, nessuna concentrazione per centrifugazione) rispetto al metodo combinato di sedimentazione-flottazione descritto sopra. Inoltre, di solito non è possibile ispezionare macroscopicamente il campione (ad esempio per verificare la presenza di proglottidi) se il proprietario dell'animale ha già chiuso il contenitore contenente il campione fecale prima di portarlo per l'analisi. Rispetto ai metodi convenzionali, le analisi condotte con un kit comportano un costo maggiore e producono più rifiuti plastici, poiché vengono utilizzati componenti monouso.

InPouch™ TF Feline

Questa procedura è utilizzata per la coltura e la rilevazione di trofozoiti di *Tritrichomonas foetus* nelle feci di gatto. La materia fecale (0,03 g, corrispondente alle dimensioni di una capocchia di spillo) viene introdotta mediante un tampone di cotone sterile in una busta disponibile in commercio (InPouch™ TF Feline) contenente il terreno di coltura. La busta viene etichettata e datata e poi chiusa per la coltura in posizione verticale a 37 °C per 24 ore, quindi conservata a temperatura ambiente al buio. La sacca viene esaminata al microscopio per verificare la presenza di trofozoiti dopo 24 ore, 48 ore e poi ogni due giorni fino a 12 giorni.

Sebbene il test sia considerato specifico per *T. foetus*, in coltura possono comparire flagellati non patogeni come *Pentatrichomonas*, rendendo necessaria una differenziazione molecolare.

Test antigenici delle feci e altri test di rilevamento dei parassiti guidati da anticorpi

I test antigenici delle feci rilevano qualitativamente gli antigeni dei parassiti nella materia fecale e sono comunemente utilizzati come test point-of-care nella pratica clinica, ma anche nei laboratori specializzati, poiché la sensibilità è elevata quando vengono utilizzati per l'esame della specie ospite prevista. I formati per la rilevazione dei coproantigeni possono essere i test di immunofluorescenza diretta (DFA) su vetrini, i test di rilevazione dell'antigene in formato ELISA o immunoenzimatico (EIA) in piastre a 96 pozzetti o i test immunocromatografici dipstick (ICT) (vedere anche Tabella 3). Poiché sono ora disponibili test progettati per l'uso nei cani e nei gatti, questi sono preferiti a quelli sviluppati per i campioni di feci umane, grazie alla maggiore garanzia di qualità, soprattutto per quanto riguarda la specificità.

Nel caso della *Giardia*, va notato che la rilevazione del coproantigene non è sempre correlata alla malattia e i risultati del test devono essere interpretati in relazione ai segni clinici.

Tabella 3: Esempi di test coproantigenici disponibili in commercio (senza pretese di completezza)

Test	Produttore	Parassita rilevato	Formato	Specie ospite*
Anigen Rapid CPV/CCV/Giardia Ag 2.0	BioNote, Corea	*Giardia*	immunocromatografia	cane e gatto
*FAST*est® GIARDIA Strip	Megacor, Austria	*Giardia*	immunocromatografia	cane e gatto
*FAST*est® CRYPTO-GIARDIA Strip	Megacor, Austria	*Giardia*/ *Cryptosporidium*	immunocromatografia	cane e gatto
SNAP® *Giardia*	IDEXX, USA	*Giardia*	ELISA	cane e gatto
Merifluor® *Cryptosporidium*/*Giardia*	Meridian Bioscience, Regno Unito	*Giardia*/ *Cryptosporidium*	rilevamento diretto in immunofluorescenza	cane
PetChek™ IP Fecal Dx™**	IDEXX, USA	*Giardia* Ascaridi Trichuridae Anchilostomi	ELISA	cane e gatto***
Speed Giardia™	BVT-Virbac, Francia	*Giardia*	immunocromatografia	cane e gatto
Uranotest® Giardia	Uranovet, Spagna	*Giardia*	immunocromatografia	cane e gatto
WITNESS® GIARDIA	Operon S.A., Spagna****	*Giardia*	immunocromatografia	cane e gatto

* secondo le istruzioni del produttore; alcuni test possono essere estesi ad altre specie come descritto in letteratura.

** kit di raccolta PetChek™ IP venduto dagli ambulatori veterinari; i campioni devono essere inviati al produttore per l'analisi. Fecal Dx™ si riferisce agli stessi test e alla stessa azienda.

*** descritto per l'uso nei cani.

**** distribuito da Zoetis.

2. SIEROLOGIA

2.1. Informazioni generali

I test sierologici sono preferiti alla rilevazione diretta nelle infezioni croniche, dove le basse densità dei parassiti nel substrato per la rilevazione diretta riducono il tasso di successo, ad esempio nella babesiosi o nella neosporosi, o nei casi in cui il tessuto infetto non può essere campionato e gli stadi non sono direttamente accessibili nei liquidi corporei. Ne sono un esempio i protozoi che abitano i tessuti e che in essi causano infezioni croniche, ad esempio nel cervello o nei tessuti oculari per il *Toxoplasma gondii* o l'*Encephalitozoon cuniculi*. Nella diagnosi della leishmaniosi canina, i test sierologici vengono utilizzati insieme alla rilevazione diretta a supporto di una corretta interpretazione dell'infezione e dello stato immunologico degli animali, per monitorare la risposta al trattamento e per anticipare una potenziale ricaduta.

Rilevamento dell'antigene

Analogamente ai test antigenici delle feci (vedere 1.2.13.), con la rilevazione sierologica degli antigeni le parti del parassita (antigeni somatici) o gli antigeni escretori/secretori prodotti dal parassita vengono rilevati direttamente nel sangue o nel siero. Analogamente al rilevamento del DNA, questo fornisce una prova diretta della presenza del parassita nella circolazione sanguigna e quindi informazioni sullo stato attuale dell'infezione. La *Dirofilaria immitis* e l'*Angiostrongylus vasorum* sono parassiti del sangue di cui è possibile individuare sierologicamente gli antigeni nel torrente circolatorio (vedere Tabella 4).

Tabella 4: Selezione di test sierologici disponibili in commercio per la diagnosi di parassiti o patogeni trasmessi da vettori di cani, gatti e cavalli.

(Fonti: www.megacor.at; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com e altri; senza pretese di completezza)

Test	Produttore	Individuazione di parassiti o batteri trasmessi da vettori	Formato	Specie ospite
Test di rilevamento dell'antigene				
Anigen Rapid CHW Ag 2.0	BioNote, Corea	*Dirofilaria immitis*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
DiroCHEK®	Zoetis, USA	*Dirofilaria immitis*	ELISA	cane
*FAST*est® HW Antigen	Megacor, Austria	*Dirofilaria immitis*	ELISA	cane
Angio Detect™ Test	IDEXX, USA	*Angiostrongylus vasorum*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Speed Diro™	BVT-Virbac, Francia	*Dirofilaria immitis*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Spagna	*Dirofilaria immitis*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane e gatto
WITNESS® Dirofilaria	Zoetis, USA	*Dirofilaria immitis*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Test di rilevamento degli anticorpi				
ANAPLASMA-ELISA DOG	Afosa, Germania	*Anaplasma phagocytophilum*	ELISA	cane
Antigen Rapid Leishmania Ab	BioNote, Corea	*Leishmania infantum*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
BABESIA-ELISA DOG	Afosa, Germania	*Babesia canis*	ELISA	cane
EHRLICHIA-ELISA DOG	Afosa, Germania	*Ehrlichia canis*	ELISA	cane
Diagnosteq	University of Liverpool, Regno Unito	*Anoplocephala perfoliata*	ELISA	cavallo
EquiSal	Austin Davis Biologics, Regno Unito	*Anoplocephala perfoliata*	ELISA (tramite la saliva)	cavallo
LEISHMANIA-IgG ELISA DOG	Afosa, Germania	*Leishmania infantum*	ELISA	cane
SARCOPTES-ELISA 2001 DOG	Afosa, Germania	*Sarcoptes scabiei* var. *canis*	ELISA	cane
SNAP® *Leishmania*	IDEXX, USA	*Leishmania infantum*	ELISA	cane
Speed Leish K™	BVT-Virbac, Francia	*Leishmania infantum*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Uranotest® Ehrlichia-Anaplasma	Uranovet, Spagna	*Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Uranotest® Ehrlichia	Uranovet, Spagna	*Ehrlichia canis*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Uranotest® Leishmania	Uranovet, Spagna	*Leishmania infantum*	Immunocromatografia a flusso laterale	cane
Test per il rilevamento di antigeni (Ag) e anticorpi (Ab) misti				
SNAP® 4Dx® Plus	IDEXX, USA	*Dirofilaria immitis* (Ag) *Borrelia burgdorferi* (Ab) *Ehrlichia canis* (Ab) (*E. ewingii, E. chaffeensis*) *Anaplasma phagocytophilum* (Ab), *A. platys* (Ab)	ELISA	cane
Uranotest® Quattro	Uranovet, Spagna	*Dirofilaria immitis* (Ag) *Leishmania infantum* (Ab) *Ehrlichia canis* (Ab), *A. platys* (Ab)	Immunocromatografia	cane

Rilevamento degli anticorpi

Il rilevamento di anticorpi specifici contro i parassiti in un singolo campione indica se l'animale è stato precedentemente esposto a questo antigene/parassita. Poiché la produzione di anticorpi è ritardata, questi in genere sono rilevabili solo 2-3 settimane dopo l'infezione primaria. Gli anticorpi permangono anche dopo l'eliminazione dell'agente patogeno, in molti casi per settimane o mesi/anni, con ampie variazioni individuali e specifiche dell'agente patogeno. È importante considerare gli anticorpi che derivano da fonti diverse dall'infezione, come una precedente vaccinazione (ad esempio contro *Leishmania* o *Babesia*) o gli anticorpi materni negli animali molto giovani. La reattività incrociata con altri organismi o le reazioni aspecifiche possono limitare la specificità dei test sierologici.

Per ridurre i falsi risultati, i test sierologici possono essere ripetuti dopo un certo periodo di tempo (di solito 2-3 settimane) per vedere se i valori sono cambiati. Se un animale con valori precedentemente negativi o bassi presenta un valore crescente o positivo, questo può essere interpretato come un'infezione attiva/continua; se il valore è calante o si converte in negativo, l'infezione è terminata. Esistono tuttavia delle eccezioni a questa regola.

Per verificare le variazioni del titolo anticorpale, si possono usare ELISA quantitativi (con valori di unità, punteggio o concentrazione) o test IFA semiquantitativi (titoli). I test rapidi in clinica sono di natura qualitativa e consentono solo di stabilire se un animale è sierologicamente positivo o negativo.

Le tecniche per la rilevazione degli anticorpi sono simili a quelli della rilevazione degli antigeni, tranne per il substrato per la rilevazione, che è invertito. Poiché la maggior parte dei metodi è riservata a laboratori specializzati e sono necessarie attrezzature specifiche per l'esecuzione dei test, in questo documento i metodi non sono descritti in dettaglio, ma sono elencati solo i diversi formati e i test disponibili nella pratica clinica.

In genere, si ricorre alla rilevazione degli anticorpi per valutare lo stato di infezione dei protozoi extraintestinali che causano infezioni croniche, come *T. gondii, E. cuniculi* (cani e gatti), *Neospora caninum* (cani), *Sarcocystis neurona* (cavalli) e molti patogeni trasmessi da vettori, tra cui *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (gatti), *Angiostrongylus vasorum* (cani), *Babesia caballi* e *Theileria equi* (cavalli). Per i cani, la ricerca di anticorpi contro i metacestodi nell'echinococcosi alveolare può essere effettuata in laboratori specializzati.

Inoltre, l'infezione da *Anoplocephala perfoliata* nei cavalli può essere diagnosticata attraverso la rilevazione di anticorpi nel siero o nella saliva. Per i cani, l'individuazione diretta della rogna sarcoptica può essere supportata da un test sierologico degli anticorpi.

Alcuni laboratori offrono "kit viaggio" per i cani, combinando diversi test (sierologico, PCR, rilevamento dell'antigene, test di Knott e altri) per una varietà di agenti patogeni "esotici". Tuttavia, bisogna considerare le differenze nei tempi di incubazione e nella comparsa dei segni clinici della malattia. In alcuni casi può essere consigliabile ripetere il test.

Alcuni Paesi impongono normative nazionali sui test per la piroplasmosi equina.

Garanzia di qualità nei sistemi di test sierologici

Come tutti gli esami diagnostici, i test sierologici hanno livelli variabili di sensibilità e specificità. È buona pratica clinica includere sempre, in un test sierologico, controlli positivi e negativi. Molti laboratori offrono informazioni di base sulla qualità tecnica dei loro test e degli ausili per l'interpretazione, in particolare per quanto riguarda l'interferenza, ad es., con i titoli vaccinali, la reattività incrociata con agenti patogeni strettamente correlati e altri fattori che devono essere considerati per l'interpretazione dei test.

A seconda della presentazione clinica e dei requisiti del test, potrebbe essere consigliabile combinare un test sierologico con altri metodi di rilevamento diretto o, se ciò non fosse possibile, con un altro sistema di test indiretto per il rilevamento degli anticorpi. Il Western blotting è spesso utilizzato come test di riferimento per le infezioni umane, ma a causa delle restrizioni di costo e di tempo, la sua applicazione nella diagnostica veterinaria è solitamente limitata alla ricerca, con poche eccezioni.

Ove applicabile, le immunoglobuline prodotte durante le infezioni attive e subacute (IgM) sono differenziate da quelle che dominano le infezioni croniche (IgG).

Per valutare il successo del trattamento nel caso della leishmaniosi canina, la sierologia potrebbe non essere sufficiente, dato che gli anticorpi possono permanere per diversi mesi o anni dopo la guarigione clinica, perché il parassita non può essere eliminato. Pertanto, si raccomandano ulteriori analisi di laboratorio per valutare lo stato immunologico e di salute del paziente. La PCR quantitativa consente di stimare la carica parassitaria in tessuti simili, il che potrebbe essere utile per il follow-up durante il trattamento della leishmaniosi canina, sebbene questo approccio debba essere valutato in modo approfondito.

2.2. Metodi quantitativi per il rilevamento degli anticorpi

2.2.1. Test di immunofluorescenza indiretta (IFAT) per la ricerca degli anticorpi

Il test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca degli anticorpi si basa sulla rilevazione di anticorpi specifici, che si legano ad antigeni (cioè parassiti interi inattivati) immobilizzati su vetrini e vengono successivamente rilevati da un anticorpo secondario. Questo anticorpo si lega alla regione invariabile dell'anticorpo primario (siero) che è legato a un fluoroforo con un legame covalente. Con la microscopia a luce fluorescente, il fluoroforo dell'anticorpo legato viene rilevato alla lunghezza d'onda appropriata. La tecnica è molto accurata se eseguita correttamente, ma richiede tempo e un certo livello di formazione e competenza. Tuttavia, per i piccoli animali è ancora ampiamente utilizzata perché meno soggetta a reazioni aspecifiche. Lo svantaggio dell'IFAT è che non tutti gli antigeni sono ugualmente accessibili agli anticorpi, quindi rispetto ad altri test la sensibilità può essere bassa. Poiché i risultati sono espressi in titoli, forniscono un risultato semiquantitativo che può essere utile per gli studi di follow-up.

2.2.2. Test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA)

Il test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) rileva antigeni o anticorpi specifici che si legano a un antigene processato (ad esempio, un lisato intero di antigeni nativi o ricombinanti) o ad anticorpi, assorbiti da una superficie di plastica (ELISA indiretto). L'anticorpo secondario è, in questo caso, marcato con un enzima che induce un cambiamento di colore di un substrato cromoforo che può essere misurato e quantificato attraverso la misurazione della densità ottica. Una forma più elaborata è il test ELISA diretto (sandwich), che non lega l'antigene direttamente alla superficie di plastica, ma utilizza anticorpi legati a questa superficie per "catturare" antigeni specifici. Questo metodo è utile quando il legame diretto delle miscele di antigeni alla fase solida porta a una diminuzione della specificità del test. Sono possibili anche altri formati ELISA.

L'ELISA è un formato di test più standardizzato, in quanto viene fornito in piastre da 96 pozzetti ed è spesso personalizzato con controlli inclusi, per cui per eseguire il test non è necessaria una competenza specifica sul patogeno. I risultati del test sono solitamente espressi come valori di assorbanza, punteggi del test, concentrazioni o unità di anticorpi e nella maggior parte dei casi viene utilizzata una sola diluizione del materiale diagnostico per la rilevazione di anticorpi specifici e vengono utilizzate diluizioni basse per la rilevazione dell'antigene. Pertanto, l'intensità della reazione non è sempre correlata alla quantità di anticorpi presenti (nelle reazioni fortemente positive il sistema può essere saturo).

Poiché i formati ELISA sono più standardizzati rispetto agli IFAT e la lettura ottica è meno soggettiva rispetto alla microscopia, gli ELISA quantitativi sono preferibili agli IFAT per la rilevazione delle variazioni dei titoli anticorpali nel tempo.

In casi particolari, possono essere analizzati substrati diversi dal sangue, come nel caso dell'*Anoplocephala perfoliata* nella saliva dei cavalli (EquiSal®).

2.3. Metodi qualitativi

2.3.1. Sistemi di test rapidi

Sono disponibili test rapidi enzimatici (che utilizzano anticorpi legati covalentemente a un enzima e prevedono una fase di lavaggio) o immunocromatografici (che utilizzano anticorpi legati all'oro colloidale e non prevedono una fase di lavaggio) per la diagnosi rapida al punto di cura di varie malattie infettive. Sono forniti da aziende specializzate che garantiscono la qualità dei loro test e forniscono tutti i materiali, compresi i controlli positivi e negativi, che sono inclusi nel test. I test sono facili e veloci da eseguire e non richiedono una formazione specifica. Tuttavia, non devono essere utilizzati per casi e ospiti diversi da quelli specificati nei documenti di test. Il livello valutato di anticorpi o antigeni non è di solito sufficientemente preciso per determinare un aumento o una diminuzione dei titoli.

3. ESAME DELLA CUTE

3.1. Informazioni generali

Questa sezione è dedicata all'identificazione dei parassiti esterni che causano malattie direttamente dovute alla loro presenza sulla pelle di cani, gatti, cavalli e piccoli mammiferi da compagnia.

Pulci, pidocchi, acari e zecche sono tutti causa di malattie parassitarie, per azione diretta e/o attraverso la trasmissione di agenti patogeni.

La diagnosi di infestazione cutanea da piccoli ectoparassiti come gli acari e la differenziazione di esemplari isolati richiedono solitamente l'identificazione al microscopio di uno o più stadi vitali del parassita. Il successo diagnostico dipende dalla corretta raccolta del materiale e, dopo la necessaria lavorazione, dall'esame al microscopio ottico, preferibilmente con il condensatore abbassato e la sorgente luminosa attenuata.

La sezione seguente descrive i metodi di isolamento degli ectoparassiti più comunemente utilizzati.

3.2. Pettinatura per la rimozione delle pulci

Il "pettine antipulci" è un pettine a denti fini utilizzato per raccogliere i residui dal pelo dell'animale.

In apparente assenza di pulci altamente mobili, le feci delle pulci possono essere individuate pettinando l'animale e ponendo il materiale raccolto su carta bianca umida, tessuto o cotone idrofilo: le macchie nere delle feci delle pulci vengono circondate da un anello rosso di sangue non digerito.

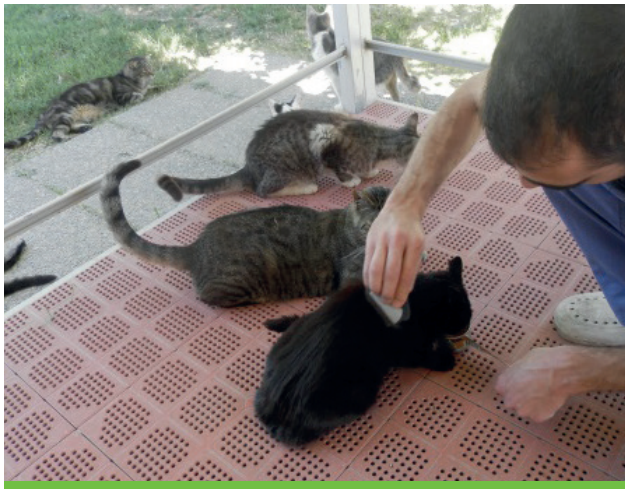


Figura 2: Pettinatura per la rimozione delle pulci



Figura 3: Feci di pulci contenenti sangue evidenziate dall'aggiunta di acqua

La pettinatura può essere utile anche per diagnosticare l'infestazione da *Cheyletiella* e pidocchi. I detriti raccolti possono essere messi in una piastra di Petri ed esaminati con uno stereomicroscopio: gli acari possono essere visti camminare tra i detriti ("forfora che cammina"). Un altro modo per identificare i pidocchi o gli acari di *Cheyletiella* è quello di raccogliere la forfora dal pettine con un nastro adesivo (vedere 1.2.12). La microscopia nativa permette di identificare questi parassiti o le loro uova.

3.3. Raschiati cutanei

I raschiati cutanei consentono di eseguire il campionamento dei primi strati (strati superficiali) o di tutti gli strati (strati profondi) dell'epidermide per individuare gli ectoparassiti che rimangono sulla superficie della pelle o che si inseriscono o risiedono in strutture più profonde, come i follicoli piliferi. Il campionamento viene eseguito sul bordo delle lesioni cutanee o nei siti preferiti dagli ectoparassiti.

I raschiamenti vengono eseguiti con una lama di bisturi. È necessario utilizzare olio minerale sulla lama del bisturi e sulla pelle per consentire a detriti e parassiti di aderire alla lama. Se è necessario tosare, si devono usare solo forbici ed è preferibile raschiare una zona di pelle che non è stata danneggiata da un eccessivo grattamento.

Il campione deve essere trasferito in una provetta di plastica trasparente con un'ampia apertura che possa essere chiusa ermeticamente.

Inizialmente, il materiale cutaneo e le pareti del contenitore di plastica possono essere esaminati con uno stereomicroscopio o una lente d'ingrandimento, perché gli acari e altri artropodi tendono a migrare fuori dal materiale cutaneo. Il materiale raccolto può essere spalmato su un vetrino, coperto con un vetrino coprioggetto ed esaminato al microscopio con un ingrandimento di 40-100x. Sul vetrino va posto anche dell'olio minerale (o una goccia di glicerolo).

I **raschiati cutanei, sia superficiali che profondi**, dovrebbero essere idealmente prelevati da parti relativamente ampie del corpo, confinanti con le aree sospette.

Per **cani e gatti**, si raccomanda di effettuare raschiature per formulare la diagnosi di rogna (ad esempio *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), demodicosi (*Demodex* spp.), cheyletiellosi (*Cheyletiella* spp.) o di infestazione da cocciniglia (larve di *Trombicula autumnalis*). In particolare:

- Nei casi di sospetta infezione da *Demodex canis*, è consigliabile iniziare con un tricogramma (vedere 3.5.): se gli acari *Demodex* sono presenti e attaccati ai peli, non è più necessario eseguire un raschiamento della pelle.
- Per la *S. scabie*i nei cani, si devono prelevare raschiati cutanei profondi dai gomiti, dai margini delle orecchie e dai garretti laterali. È stato riportato che oltre il 50% dei raschiamenti nei cani affetti da rogna sarcoptica è negativo; pertanto, per aumentare la sensibilità, è necessario prelevare diversi campioni (6-10) da varie macchie sospette dell'animale. In alternativa, alcuni laboratori offrono test ELISA che rilevano gli anticorpi contro *S. scabiei*, contribuendo a migliorare la diagnosi (vedere Tabella 4).
- Per *Demodex gatoi* nei gatti, si può adottare la stessa procedura utilizzata per i raschiati di *S. scabiei* nei cani.
- Per l'individuazione dell'acaro *Cheyletiella*, possono essere raschiati il dorso e i lembi auricolari; tuttavia, la tecnica raccomandata è il metodo del nastro adesivo (vedere 3.4.).
- I raschiati cutanei possono anche rilevare la presenza di endoparassiti nella pelle, ad esempio larve di nematodi *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* o stadi promastigoti di *Leishmania*. Talvolta si possono trovare anche microfilarie di *Dirofilaria*. Per la conferma della specie è necessario effettuare un'ulteriore differenziazione biomolecolare.

Anche i raschiati cutanei possono essere adottati per individuare gli acari presenti sui **piccoli mammiferi da compagnia**.

I **raschiati cutanei profondi** sono raccomandati per individuare gli acari *Demodex* follicolari, che vivono in profondità nei follicoli piliferi. Per individuare tali acari *Demodex*, le aree di alopecia devono essere raschiate con una lama o una curette ricoperta di olio minerale nella direzione della crescita del pelo fino alla comparsa di sangue capillare. La pelle deve essere strizzata prima o durante il raschiamento per favorire l'estrusione degli acari *Demodex* dai follicoli piliferi.

La valutazione del numero e della vitalità dei diversi stadi vitali è utile per valutare la risposta al trattamento. Mentre i cani sani sono spesso segnalati come portatori di un basso numero di *Demodex*, gli animali clinicamente affetti hanno di solito un'elevata carica di acari e in questi ultimi casi la diagnosi diretta ha un'elevata sensibilità. Tuttavia, è stato segnalato che i raschiamenti profondi possono dare falsi negativi per *Demodex*, in particolare da aree difficili da raschiare (occhi, spazi interdigitali) e in alcune razze (Bobtail, Scottish Terrier, Shar Pei). In questi casi, i tricogrammi (vedere 3.5.) possono essere più utili per ottenere materiale diagnostico sufficiente. Recentemente è stato dimostrato che l'adozione del metodo del nastro adesivo (vedere 3.4.) e la spremitura della pelle hanno un tasso di successo diagnostico maggiore rispetto al raschiamento profondo per il *Demodex*; questa procedura è anche meno dolorosa per cani e gatti.

Negli **equini**, i raschiati cutanei profondi possono essere utilizzati per individuare *Demodex* e stadi di nematodi (*Pelodera*, *Strongyloides* e *Habronema*).

Raschiati cutanei superficiali

Nei **cani**, per gli acari *Demodex* più superficiali e a corpo corto, si possono eseguire raschiati cutanei superficiali, in alternativa al metodo del nastro adesivo (vedere 3.4.) e al tricogramma (vedere 3.5.).

Negli **equini**, i raschiati cutanei superficiali possono essere utilizzati per l'identificazione di acari *Chorioptes*, *Psoroptes*, *Sarcoptes*, larve di *Trombicula* e acari del foraggio (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*).

I raschiati cutanei superficiali (così come il metodo del nastro adesivo) sono utili anche per individuare i pidocchi.

Trattamento del materiale cutaneo con soluzione di idrossido di potassio (KOH) o lattofenolo

Il materiale raschiato può essere lavorato aggiungendo una soluzione di KOH al 10% o di lattofenolo per almeno 2-3 ore, spesso per tutta la notte, a temperatura ambiente. In alternativa, il riscaldamento della soluzione di KOH in un contenitore adatto abbrevia la procedura. La soluzione di KOH e il lattofenolo macerano le sostanze cheratiniche della pelle lasciando intatti gli esoscheletri chitinosi degli artropodi. La sospensione può essere esaminata in una piastra di Petri sotto uno stereomicroscopio o su un vetrino al microscopio (ingrandimento 40-100x). Per un'identificazione accurata, gli artropodi devono essere trasferiti su un vetrino e differenziati. Potenziali artropodi da identificare: pidocchi, acari (*Cheyletiella*, *Trombicula*, *Demodex*, *Sarcoptes*, *Notoedres*).

3.4. Metodo del nastro adesivo

La tecnica dell'impronta diretta (detta anche metodo dell'impronta con nastro di acetato) utilizza un nastro adesivo trasparente (largo circa 1 cm e lungo 4 cm) per raccogliere i detriti dalla superficie della pelle e del pelo, come descritto in 1.2.12. Il lato appiccicoso del nastro viene premuto più volte sulla pelle. Successivamente, viene premuto (sempre con il lato adesivo rivolto verso il basso) su un vetrino. Il nastro funge da coprioggetto (ingrandimento: 40-100x).

Di solito, vengono prelevati diversi campioni da più aree della pelle. Questa tecnica è particolarmente utile per gli acari *Cheyletiella* e *Demodex* a corpo corto, in quanto è possibile campionare molto rapidamente una superficie più ampia.

Negli **equini**, il metodo dell'impronta del nastro di acetato può essere utilizzato per individuare *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* e pidocchi. Per il *Demodex* follicolare, il nastro può essere posizionato sulla lesione selezionata come alternativa ai raschiati cutanei profondi. La pelle deve quindi essere schiacciata sotto il nastro di acetato e poi il nastro deve essere applicato su un vetrino.

3.5. Tricogramma

Il tricogramma è l'esame al microscopio dei peli prelevati. I prelievi di pelo positivi possono sostituire i raschiati cutanei in aree difficili da raschiare come le palpebre, l'area perioculare, il muso o le zampe, o quando le lesioni sono molto dolorose. Le pinze vengono utilizzate per strappare con forza i peli nella direzione della loro crescita. Se possibile, la pelle viene strizzata prima e durante il campionamento. Almeno 40 (idealmente 50-100) peli vengono quindi posizionati su un vetrino con olio minerale e un vetrino coprioggetto e valutati con un ingrandimento a bassa potenza. Nei casi di sospetta infezione da *Demodex*, è consigliabile iniziare con un tricogramma: se gli acari *Demodex* sono presenti e attaccati ai peli, non è più necessario eseguire un raschiamento della pelle.

3.6. Rilevamento degli acari nel cerume

Il prelievo di cerume da **cani e gatti** dà spesso ottimi risultati negli animali affetti da *Otodectes cynotis*. Gli acari dell'orecchio possono essere osservati frequentemente con l'esame otoscopico e i detriti di fondo, abbondanti e di colore marrone scuro, sono tipici. Questi detriti possono essere raccolti con un tampone di cotone (quando sono cerosi) o con una curette (quando sono secchi e crostosi) e valutati al microscopio dopo essere stati tritati con una lama di bisturi e mescolati con olio minerale.

Lo stesso approccio può essere utilizzato per individuare *Psoroptes cuniculi* nelle orecchie **dei conigli**, anche se la quantità di detriti prodotti in un'infestazione di questo tipo può richiedere la digestione con idrossido di potassio (KOH) o lattofenolo per liberare gli acari.

3.7. Tecniche biomolecolari

Per quanto riguarda gli endoparassiti, nei casi in cui la morfologia degli artropodi non ne consenta l'identificazione, si può ricorre alle tecniche basate sul DNA (vedere 4.5.). Per questa procedura, gli artropodi vivi possono essere conservati in alcol al 70% o congelati.

4. VARIE

4.1. Strisci di sangue

4.1.1. Informazioni generali

Gli strisci appena preparati da campioni di sangue raccolti in anticoagulante possono essere utilizzati per diagnosticare una serie di infezioni parassitarie. Anche se la presenza di parassiti nel sangue può essere rara, soprattutto nelle forme croniche della malattia, la facilità e la rapidità di uno striscio di sangue possono offrire un approccio diagnostico rapido ed economico.

Materiali necessari:

- due vetrini puliti con alcol
- campione di sangue in anticoagulante

Procedura:

1. Posizionare una piccolissima goccia di sangue all'estremità di un vetrino.
2. Posizionare l'estremità dell'altro vetrino sul primo in modo che il bordo corto del vetrino si trovi appena sotto la goccia di sangue.
3. Tenere il secondo vetrino con un angolo di 30°.
4. Spingere il secondo vetrino in modo che il bordo tocchi appena la goccia di sangue; per azione capillare, una sottile linea di sangue si diffonderà lungo il bordo del vetrino.
5. Trascinare rapidamente il vetrino spalmatore lungo tutta la lunghezza del vetrino del campione con un unico movimento fluido (lo striscio deve terminare con un "bordo piumato").
6. Asciugare all'aria e colorare (Diff Quick).

I vetrini essiccati all'aria vengono fissati in metanolo per 5-10 minuti e colorati con Giemsa, Diff-Quick, Hemacolor o altre soluzioni preconfezionate disponibili in commercio per consentire il riconoscimento delle caratteristiche dei protozoi. Va notato che gli artefatti di colorazione dovuti a colorazioni mal conservate possono portare a risultati falsi positivi.

4.1.2. Patogeni rilevabili negli strisci di sangue

Piroplasmi

I protozoi si trovano all'interno dei globuli rossi. Il sangue capillare periferico, prelevato dal padiglione auricolare o dalla punta della coda o da una preparazione di buffy coat (vedere 4.2.), può produrre un numero più elevato di cellule parassitate ed è quindi possibile giungere a una diagnosi rapida della malattia acuta alla prima presentazione di un animale malato. Nei casi cronici, la parassitemia è generalmente bassa. In base alle dimensioni dei merozoiti all'interno degli eritrociti, si possono distinguere le specie *Babesia* o *Theileria* di grandi dimensioni (>3 µm) e quelle di piccole dimensioni (<3 µm) (vedere Tabella 5), ma è necessario un approccio molecolare per una differenziazione affidabile, poiché le *Babesia* di grandi dimensioni possono presentarsi come forme atipiche di piccole dimensioni. Le diverse specie di *Babesia* possono essere differenziate morfologicamente in base al numero di merozoiti, all'angolo tra di essi e alla loro posizione all'interno dell'eritrocita (vedere Tabella 5). L'anamnesi (tempo trascorso in aree endemiche, infestazione da zecche), i segni clinici e altre procedure diagnostiche come la sieroconversione e la rilevazione del DNA (vedere 4.5.) possono supportare la diagnosi.

Alcuni Paesi impongono normative nazionali per l'importazione di cavalli e i test per la piroplasmosi equina.

Tabella 5: Caratteristiche diagnostiche per l'identificazione morfometrica dei piroplasmidi in cani, gatti e cavalli.

Per i dettagli sulla patogenicità, i vettori e la presenza si veda la linea guida 5 dell'ESCCAP: Controllo delle malattie trasmesse da vettori nel cane e nel gatto.

Piroplasmi dei cani			
	Dimensioni (merozoiti)	**Posizione nell'eritrocita**	**Angolo/altro**
Babesia canis	grande	centrale	acuto
B. vogeli	grande	centrale	acuto
B. rossi	grande	centrale	acuto
B. gibsoni e *gibsoni*-like	piccolo	centrale	-
B. conradae	piccolo	centrale	-
*B. vulpes**	piccolo	centrale	-
Piroplasmi dei gatti			
B. felis	piccolo	centrale	croce maltese
Babesia spp.	grande	centrale	-
Cytauxzoon spp.	piccolo	variabile	a forma di bastoncino o di virgola
Piroplasmi dei cavalli			
B. caballi	grande	centrale	acuto
Theileria equi	piccolo	variabile	pleomorfo (1-4 merozoiti, inclusa la croce maltese)

* *Babesia vulpes* comprende i termini precedentemente utilizzati *Theileria*/*Babesia* annae e *Babesia* microti-like.

Hepatozoon spp.

Gli *Hepatozoon* spp. sono agenti protozoari trasmessi da vettori (tramite ingestione orale di zecche infette). Nelle regioni europee a clima caldo, *Hepatozoon canis* è un parassita comune nei canidi, mentre *Hepatozoon americanum* è presente nei canidi degli Stati Uniti. *Hepatozoon felis* e *H. silvestris* sono parassiti rari del gatto. In rare occasioni, *H. canis* si può trovare anche nei gatti. I gamonti si trovano principalmente nei granulociti neutrofili come tipiche strutture a forma di mattone negli strisci di sangue.

Larve (microfilarie) di *Dirofilaria* e altri nematodi

Le microfilarie delle filaria propriamente dette (*D. immitis*, *D. repens*) patogene e zoonotiche e i nematodi delle altre filarie sottocutanee si possono trovare negli strisci di sangue e quindi devono essere differenziate tra di loro (vedere 4.4.).

Rickettsiae (Anaplasmataceae)

Ehrlichia spp. è un batterio Gram-negativo intracellulare obbligato, trasmesso da vettori. In Europa, *Ehrlichia canis* è l'agente eziologico dell'ehrlichiosi monocitica canina (ECM). Questo patogeno infetta principalmente i monociti, dove si sviluppano le tipiche microcolonie (morule), osservate solo raramente. Il *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* è l'agente eziologico della neo-ehrlichiosi nei cani. Altre specie di *Ehrlichia* (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*) sono endemiche nei neotropici e raramente identificate in Europa. *Ehrlichia canis* o una specie strettamente correlata è stata descritta nei gatti, ma non ha rilevanza veterinaria.

Anaplasma spp. è un batterio intracellulare obbligato, Gram-negativo, trasmesso da vettori. In Europa, *A. platys* è stata segnalata nei cani domestici e *A. phagocytophilum* in cani, gatti, cavalli e altri animali. Infettano rispettivamente le piastrine (*A. platys*) o i granulociti prevalentemente neutrofili (*A. phagocytophilum*) e si sviluppano in tipiche microcolonie (morule) osservabili al microscopio ottico nella fase acuta.

Mycoplasma spp. (syn. *Haemobartonella* spp.) sono piccoli batteri Gram-negativi che si attaccano alla superficie dei globuli rossi, ad esempio *Mycoplasma haemocanis* e *M. haemofelis*, rispettivamente nei cani e nei gatti. Sono state descritte altre specie meno patogene per lo più nei gatti: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*, ma anche nei cani: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. I metodi di rilevamento del DNA ne supportano l'individuazione e ne consentono la differenziazione.

4.2. Metodo del buffy coat

Per questa procedura, una provetta per microematocrito viene riempita con sangue EDTA, sigillata a un'estremità e centrifugata in una centrifuga per ematocrito per 5 minuti. I tripanosomi e le microfilarie si accumulano nella zona tra lo strato di buffy coat e il plasma. I leucociti sono concentrati per *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. o *Hepatozoon* spp. Poiché *Babesia* spp. infetta i reticolociti piuttosto che gli eritrociti maturi, la loro individuazione nel buffy coat è più sensibile che nel sangue intero. Per l'esame al microscopio, la provetta di ematocrito viene graffiata con un piccolo tagliavetro a livello del buffy coat e rotta in modo da trasferire lo strato di buffy coat e il plasma su un vetrino. Si aggiunge una goccia di soluzione fisiologica o si può eseguire uno striscio colorato per visualizzare i parassiti.

4.3. Agoaspirato con ago sottile

4.3.1. Informazioni generali

Alcuni protozoi e agenti patogeni trasmessi da vettori sono obbligati intracellulari dei linfociti/monociti/macrofagi. Pertanto, l'aspirazione di tessuti ematopoietici (ad esempio linfonodi, midollo osseo, milza) può essere importante per la loro identificazione morfologica attraverso strisci e/o per la raccolta di materiale per l'analisi biomolecolare (vedere 4.5.). Per la diagnosi di infezioni da metacestodi di *Echinococcus* spp. (echinococcosi alveolare e cistica) possono essere utilizzati anche agoaspirati con ago sottile da organi interni, ad esempio il fegato. Se si utilizza la milza a questo scopo, l'aspirazione deve essere eseguita senza pressione negativa per evitare emorragie.

Materiali necessari:

- siringa da 15 ml
- ago calibro 22-20
- vetrini in vetro

Procedura:

1. Inserire l'ago nel tessuto e creare una pressione negativa all'interno della siringa tirando indietro lo stantuffo fino a 5-10 ml.
2. Mantenendo questa pressione negativa, reindirizzare l'ago in diverse direzioni senza rimuovere la punta dell'ago dal tessuto.
3. Rilasciare lo stantuffo della siringa e rimuovere l'ago dal tessuto (non rimuovere l'ago dal tessuto senza rilasciare lo stantuffo, altrimenti tutto il materiale raccolto verrà risucchiato nella siringa).
4. Scollegare la siringa dall'ago e riempirla d'aria.
5. Ricollegare la siringa all'ago e usare l'aria per far uscire il campione dall'ago su uno o più vetrini.
6. Strisciare, asciugare e colorare come per lo striscio di sangue (vedere 4.1.).

4.3.2. Patogeni rilevabili nei campioni ottenuti tramite agoaspirato con ago sottile

Leishmania infantum

Gli agoaspirati linfonodali, specialmente da animali con linfoadenopatia, sono i più pratici, mentre il campionamento del midollo osseo e della milza è più invasivo ma può essere indicato nei cani infetti clinicamente sani.

Gli amastigoti, con la tipica struttura nucleo/cinetoplasto a forma di "T", possono essere osservati all'interno del citoplasma dei monociti/macrofagi e anche liberi all'interno del materiale spalmato.

Nei casi in cui è presente la zoppia, gli amastigoti possono essere osservati negli agoaspirati con ago sottile del liquido sinoviale.

Gli agoaspirati da lesioni cutanee sono anche un modo fattibile per rilevare l'infezione da amastigoti nei macrofagi di *Leishmania* mediante citologia.

Ehrlichia canis

La sensibilità della rilevazione microscopica può essere maggiore negli agoaspirati con ago sottile di linfonodi, midollo osseo o milza o nei preparati di buffy coat rispetto allo striscio di sangue, ma attualmente la rilevazione del DNA mediante PCR è il metodo raccomandato per la diagnosi.

4.4. Rilevamento e identificazione delle microfilarie

4.4.1. Informazioni generali

La diagnosi di infezione da nematodi della filaria negli animali da compagnia può essere effettuata attraverso l'isolamento e l'identificazione morfologica delle microfilarie circolanti. I campioni di sangue devono essere esaminati dopo la concentrazione con il test di Knott o con un metodo a filtro (kit di analisi disponibile in commercio: Difil-Test®). Gli strisci di sangue fresco non consentono l'identificazione delle specie e hanno una sensibilità molto bassa.

È importante sottolineare che il numero di microfilarie circolanti non è necessariamente correlato alla carica di vermi adulti, ovvero cani altamente microfilaremici possono ospitare pochi vermi adulti. Inoltre, l'orario in cui avviene il prelievo di sangue può influenzare la sensibilità per la rilevazione delle microfilarie: sia per *D. repens* che per *D. immitis* è stata descritta una tendenza a una maggiore microfilariemia durante le ore notturne.

Le microfilarie possono essere differenziate mediante misure morfometriche, colorazione con fosfatasi acida o, soprattutto nei casi dubbi, mediante metodi biomolecolari che consentono la diagnosi di specie attraverso l'isolamento del DNA dal sangue intero e la concentrazione delle microfilarie mediante centrifugazione. Esistono alcune limitazioni nell'identificazione morfologica delle microfilarie circolanti, tra cui l'influenza delle diverse tecniche di fissazione sulle dimensioni delle larve, la scarsa colorazione con la tecnica acid-fast in un'aliquota di larve in un campione e le co-infezioni con un numero sproporzionato di larve di specie diverse. La PCR specie-specifica (quantitativa, o real-time) è il metodo di elezione per la differenziazione delle specie.

Infine, anche se l'infezione da filaria (*D. immitis*) può essere diagnosticata in modo affidabile con l'esame sierologico, si raccomanda sempre di effettuare il test per le microfilarie circolanti.

Nei gatti amicrofilaraemici o negativi alla ricerca dell'antigene ma con un quadro clinico compatibile con la dirofilariosi, la ricerca degli anticorpi è un'alternativa per dimostrare la presenza di infezione.

4.4.2. Test di Knott

Questo metodo concentra tutte le microfilarie presenti in 1 ml di sangue EDTA mediante centrifugazione, che vengono poi sottoposte a colorazione con blu di metilene.

In breve, 1 ml di sangue EDTA viene diluito in 9 ml di formalina al 2% e la soluzione viene agitata per diversi minuti. Viene quindi centrifugato a 390 x *g* per 5 minuti. Il surnatante viene rimosso e una goccia di blu di metilene all'1% viene aggiunta al sedimento per le analisi morfometriche o per l'esame dell'attività della fosfatasi acida, sebbene la procedura comune per l'identificazione delle microfilarie sia attualmente quella biomolecolare (vedere 4.4.1.). I vetrini vengono esaminati con un ingrandimento di 40x per verificare la presenza di larve e con un ingrandimento di 100x per le caratteristiche morfologiche. Per ottenere la massima sensibilità, è necessario analizzare l'intero sedimento.

4.4.3. Test di Knott modificato

In alternativa, le microfilarie vive possono essere individuate più rapidamente grazie al loro movimento quando tramite un test di Knott modificato. Per eseguire il test, quattro gocce di soluzione di saponina al 2% e 5 ml di acqua distillata vengono aggiunte a 1 ml di sangue EDTA per distruggere gli eritrociti. La sospensione può essere esaminata al microscopio, come sopra. Le larve vive sono mobili e possono essere facilmente individuate al microscopio (ingrandimento 40x).

4.4.4. Metodo di filtrazione (Difil-Test®)

Questo kit commerciale concentra le microfilarie da 1 ml di sangue EDTA su un filtro che ha un'area delle dimensioni di un piccolo coprioggetto. Con questa tecnica, le microfilarie tendono ad avere una forma diritta piuttosto che arrotolata o ondulata.

Il kit comprende soluzione lisante, colorante, filtri e una cartuccia. In breve, la procedura è la seguente:

- Il filtro viene posizionato sulla base della cartuccia filtrante e la cartuccia viene assemblata.
- 1 ml di sangue viene aggiunto a 9 ml di soluzione lisante in una siringa grande e miscelato. La soluzione ematica emolizzata viene fatta passare attraverso il filtro collegandolo alla porta della cartuccia filtrante.
- Il filtro viene risciacquato facendo passare un volume uguale di acqua attraverso la porta della cartuccia filtrante.
- La cartuccia filtrante viene aperta, il filtro viene rimosso e posto su un vetrino da microscopio.
- Una goccia di colorante, fornita nel kit, viene posta sul filtro.
- Si posiziona un vetrino coprioggetto sul filtro per disperdere la colorazione e il vetrino è pronto per la visualizzazione.

4.4.5. Colorazione con fosfatasi acida

Esistono diverse caratteristiche che possono differenziare le microfilarie di *D. immitis* da quelle di *D. repens* (e dai nematodi della filaria apatogeni). Ciò è particolarmente importante nelle aree in cui sono presenti sia *D. immitis* che *D. repens* (si veda la linea guida 5 dell'ESCCAP: Controllo delle malattie trasmesse da vettori nel cane e nel gatto).

Le microfilarie di diversi nematodi della filaria possono essere distinte in base al loro pattern di colorazione della fosfatasi acida (vedere Tabella 6):

- La microfilaria di *D. immitis* presenta due punti (pori escretori e anali);
- La microfilaria di *D. repens* ha un solo punto (poro anale);
- La microfilaria di *Acanthocheilonema dracunculoides* mostra tre aree di attività enzimatica (poro anale, corpo interno, poro escretore); e
- La microfilaria di *A. reconditum* mostra un disegno diffuso di colore rosso chiaro.

Sono disponibili kit commerciali che possono essere eseguiti in laboratorio. Tuttavia, i metodi di colorazione stanno venendo gradualmente sostituiti dall'isolamento del DNA da microfilarie concentrate.

4.4.6. Misurazione delle microfilarie

In alternativa, può aiutare a distinguere le microfilarie anche la loro misurazione: per questo, la lunghezza media dovrebbe essere basata sulle dimensioni di 10 larve (si veda anche la linea guida 5 dell'ESCCAP: Controllo delle malattie trasmesse da vettori nel cane e nel gatto). Va notato che la preparazione (soprattutto la tecnica di fissazione) può alterare notevolmente la lunghezza e le caratteristiche delle microfilarie.

Tabella 6: Differenziazione morfologica delle microfilarie[1] in base a lunghezza, larghezza e forma

Specie	Lunghezza (µ)	Larghezza (µ)	Caratteristiche
Dirofilaria immitis	301,77 ± 6,29 290-330	5-7	Senza guaina, estremità cefalica appuntita, coda dritta con l'estremità appuntita. APh-S: due punti di attività situati intorno ai pori anali ed escretori.
D. repens	369,44 ± 10,76 300-370	6-8	Assenza di guaina, estremità cefalica ottusa, coda appuntita e filiforme spesso terminante come un manico d'ombrello. APh-S: un punto intorno al poro anale.
Acanthocheilonema reconditum	264,83 ± 5,47 260-283	4	Assenza di guaina, estremità cefalica ottusa con un uncino cefalico prominente, bottone caudale uncinato e ricurvo. APh-S: attività in tutto il corpo.
A. dracunculoides	259,43 ± 6,69 190-247	4-6,5	Guaina, estremità cefalica ottusa, estremità caudale affilata ed estesa. APh-S: tre macchie che includono un'ulteriore macchia nel corpo medio.

[1] Microfilarie (n=10) misurate dopo la concentrazione con il test di Knott; quando si usa il test Difil®, le lunghezze sono inferiori. APh-S: macchia di fosfatasi acida.

4.5. Metodi di rilevazione e differenziazione biomolecolare: reazione a catena della polimerasi (PCR) e amplificazione isotermica (LAMP)

4.5.1. Informazioni generali

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è un metodo di laboratorio sempre più popolare e potente per la diagnosi di molte condizioni. È specifico e, a seconda del substrato del test e dello stadio dell'infezione, è anche altamente sensibile e può aiutare il medico a diagnosticare le infezioni attive in presenza di segni clinici sospetti. È indicato per gli agenti patogeni e i parassiti trasmessi da vettori che richiedono una rilevazione sensibile e/o una differenziazione che vada oltre la gamma della morfologia.

Se la PCR viene utilizzata a scopo diagnostico e non di differenziazione, la sensibilità dipenderà, tra gli altri fattori, dal numero di copie del gene target.

La PCR viene eseguita solo in laboratori specializzati. L'accuratezza dei risultati dipende quindi dalla corretta raccolta, conservazione e dal corretto invio dei campioni. L'utilizzo di due diversi protocolli di PCR può aumentare la sensibilità e la specificità.

Le indicazioni generali comprendono quanto segue:

- Poiché la PCR è molto sensibile, è necessario evitare la contaminazione incrociata dei campioni. I campioni devono essere prelevati e conservati in strumenti monouso, ove possibile.
- I campioni devono essere conservati in frigorifero (4 °C) e inviati con impacchi di ghiaccio o congelati in modo continuo ad almeno -20 °C.
- I campioni devono arrivare in laboratorio entro 3 giorni dal prelievo.

L'amplificazione isotermica (LAMP) è una tecnica a provetta singola per l'amplificazione del DNA. Grazie alla sua semplicità e ai costi contenuti, la LAMP è già utilizzata dai medici per individuare alcuni agenti patogeni, come semplice test di screening sul campo o presso il punto di cura. I reagenti/kit sono disponibili in commercio presso alcune aziende. A differenza della tecnologia PCR, in cui la reazione viene eseguita con una serie di fasi o cicli a temperatura alternata, l'amplificazione isotermica viene eseguita a temperatura costante e non richiede un termociclatore. È stato osservato che la LAMP è più resistente della PCR agli inibitori in campioni complessi come sangue o feci, forse a causa dell'uso di una diversa DNA polimerasi (tipicamente la Bst - *Bacillus stearothermophilus* - DNA polimerasi piuttosto che la Taq polimerasi come nella PCR).

L'estrazione del DNA può essere effettuata praticamente su qualsiasi substrato, ma gli aspirati di sangue e tessuto sono i campioni analizzati più frequentemente.

Sangue:
Diversi agenti patogeni trasmessi da vettori, come *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* e *Babesia*, possono essere diagnosticati identificando il loro DNA nel sangue periferico. La PCR è stata utilizzata anche per individuare e differenziare le specie filarioidi che rilasciano le microfilarie nel flusso sanguigno.

Esistono molti protocolli di PCR per il sangue e ogni laboratorio ha i propri, compreso il miglior anticoagulante da utilizzare. La maggior parte preferisce l'EDTA, ma è meglio verificare con il proprio laboratorio di fiducia. Di solito è sufficiente un massimo di 0,5-1 ml di sangue.

Aspirati di tessuto:
Leishmania infantum ed *Ehrlichia* spp. sono presenti negli organi linfoidi e gli agoaspirati con ago sottile possono essere utilizzati per il test PCR. Si possono anche prelevare biopsie cutanee per la PCR per la *Leishmania*. Dopo l'aspirazione, l'aspirato può essere spruzzato su un foglio di carta da filtro o su un tampone di cotone che può essere conservato in una provetta sterile a 4 °C. È stato dimostrato che il materiale da spalmare su vetrini ha una sensibilità inferiore.

Parassiti:
In alcuni casi può essere necessaria l'identificazione molecolare di singoli parassiti (elminti, artropodi). Questi devono essere conservati in etanolo al 70% e spediti in contenitori ermetici.

Feci:
I campioni fecali sono anche utilizzati direttamente per la rilevazione degli stadi parassitari del DNA. Ad esempio, l'individuazione di *Tritrichomonas foetus* nelle feci dei gatti è di fatto raccomandata rispetto all'accumulo tramite coltura fecale (vedere 1.2.13.). Attualmente la copro-PCR è utilizzata per *E. multilocularis*, diversi coccidi (es. *Toxoplasma*/*Hammondia*), *Cryptosporidium* e *Giardia*.

Per i parassiti che richiedono una differenziazione di specie o genotipi che non può essere ottenuta morfologicamente, ad esempio per *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp, oocisti di *Toxoplasma*/*Hammondia*, uova di ascaridi o *Taeniidae*, la genotipizzazione (su feci o parassiti isolati) può essere utile per determinare le specie o i genotipi zoonotici ecc. In alcuni casi in cui il numero di stadi parassitari è basso o l'estrazione del DNA è difficile (ad esempio, per le uova di *Taeniidae* o ascaride, vedere sotto), gli stadi parassitari nelle feci dovrebbero essere concentrati in precedenza. A titolo di esempio, si può adottare il metodo della flottazione e setacciatura sequenziale (vedere sotto).

Flottazione e setacciatura sequenziale:
Le uova di elminti possono essere accumulate dai campioni fecali combinando la flottazione in una soluzione di cloruro di zinco seguita da una setacciatura sequenziale con setacci a maglie di dimensioni decrescenti (21-200 µm). Pertanto, utilizzando le maglie appropriate dell'ultimo setaccio, le uova (in particolare quelle di *Taeniidae* e di *Toxocara* per la differenziazione) possono essere concentrate per consentire l'isolamento del DNA.

4.5.2. Informazioni specifiche

In linea di principio, tutti i parassiti rilevanti possono essere individuati o confermati mediante PCR o altri metodi genetici. Sono già presenti sul mercato diverse macchine che offrono il rilevamento automatico contemporaneo di agenti infettivi, che tuttavia non sono state convalidate in medicina veterinaria.

In letteratura, a seconda del parassita, possono essere disponibili le seguenti opzioni:

- primer specifici per specie di parassiti distinte che replicano solo il genere e/o la specie in questione;
- la PCR multipla che combina diversi primer (specifici);
- PCR tradizionale vs. PCR real-time; e
- LAMP.

Quando dalla PCR si ottiene un prodotto, esso può essere identificato in base alle sue dimensioni mediante elettroforesi su gel (con o senza precedente frammentazione mediante enzimi di restrizione), oppure sequenziando le sequenze nucleotidiche e confrontandole con le sequenze geniche disponibili.

Interpretazione:
Tutti i risultati della PCR devono essere interpretati come parte di una combinazione di criteri clinici e altri test diagnostici.

Di seguito riportiamo alcuni esempi, senza pretese di completezza:

Protozoi

Leishmania infantum

La PCR può essere utilizzata sia per la diagnosi dell'infezione sia per il monitoraggio dei cani in trattamento per la leishmaniosi canina. Diversi laboratori offrono anche PCR quantitative (real-time, ecc.), che possono indicare la quantità di parassiti e l'aumento/diminuzione della carica parassitaria e sono utili anche per monitorare la risposta al trattamento.

Anche se gli agoaspirati di tessuto (linfonodi, milza, midollo osseo) o i campioni di pelle (in caso di lesioni cutanee) sono i campioni di scelta per *L. infantum*, i laboratori effettuano analisi anche sul sangue. Ci sono alcune preoccupazioni riguardo ai falsi negativi (assenza di globuli bianchi nel sangue che ospitano il parassita) a causa della bassa sensibilità, anche se la sensibilità delle PCR real-time che ricercano geni presenti in più copie sembra essere soddisfacente. Attualmente si usano anche campioni non invasivi come i tamponi congiuntivali. A tal fine, è necessario campionare entrambi gli occhi e i tamponi devono contenere un numero sufficiente di cellule.

Babesia

La sensibilità della PCR si è dimostrata superiore a quella dell'esame dello striscio di sangue, soprattutto per la diagnosi di cani cronicamente infetti. Tuttavia, non è possibile escludere completamente i risultati falsi negativi. L'identificazione di specie e sottospecie può essere importante in termini di opzioni terapeutiche (*Babesia* grande o piccola) e prognosi.

Toxoplasma gondii

Nella diagnostica di routine le oocisti di *Toxoplasma gondii* escrete dai gatti possono essere a fatica differenziate morfologicamente da quelle di *Hammondia hammondi*, apatogeno. Insieme alle procedure sierologiche che differenziano gli anticorpi specifici nei sieri dei gatti e degli ospiti intermedi, è possibile eseguire la PCR dalle oocisti o per l'identificazione delle cisti di bradizoiti di *T. gondii* nella carne. Nei cani e/o gatti con disturbi neurologici compatibili con la toxoplasmosi, è possibile effettuare la PCR dal liquido cerebrospinale o dall'umor acqueo.

Neospora caninum

Le oocisti di *N. caninum* sono escrete per periodi molto brevi e a bassa densità nelle feci dei cani. Come nel caso di *T. gondii*/*H. hammondi*, le oocisti di *N. caninum* sono difficilmente distinguibili da *Hammondia heydorni* (presente nelle feci di cani o volpi) nella diagnostica di routine e da *T. gondii*/*H. hammondi* (in caso di coprofagia di feci di gatto). Pertanto, per la loro identificazione è indicata un'analisi PCR.

Nei cani clinicamente sospetti, un'analisi sierologica insieme a biopsie muscolari, liquor e/o liquido cerebrospinale analizzate mediante PCR sono utili opzioni diagnostiche.

Giardia

I test classici per le infezioni da *Giardia* di solito non sono specie-specifici. Se, per chiarire il potenziale zoonotico, è necessario determinare l'assemblaggio, è possibile eseguire la PCR multilocus e il sequenziamento.

Tritrichomonas

La PCR, che distingue il *T. foetus* nelle feci di gatto da altri Trichomonadidi, supera la rilevazione del parassita in coltura (InPouch™, vedere 1.2.13.) e i suoi inconvenienti (sensibilità alla temperatura, tempo).

Batteri trasmessi da artropodi vettori

Bartonella

Anche se il gold standard per la diagnosi di bartonellosi è l'emocoltura, questa può richiedere tempo e denaro. È anche possibile rilevare il DNA di *Bartonella* in campioni di sangue, tessuto, liquido cerebrospinale o umor acqueo. Una combinazione di coltura di arricchimento seguita da amplificazione PCR risulta in una maggiore sensibilità.

Ehrlichia/*Anaplasma*

Un risultato positivo della PCR conferma generalmente la presenza di un'infezione da questi batteri trasmessi dalle zecche. Tuttavia, un risultato negativo della PCR non esclude la presenza di un'infezione.

Come per la citologia del sangue, la sensibilità sembra essere maggiore per la PCR per *Ehrlichia* quando viene eseguita su linfonodi, milza, agoaspirati di midollo osseo o buffy coat.

Elminti

Uova di *Taeniidae*

Nelle aree endemiche per l'*Echinococcus* si raccomanda di differenziare le uova di *Echinococcus* spp. da quelle di altre *Taeniidae* per chiarire il potenziale di trasmissione zoonotica. Le uova possono essere isolate per flottazione, con la tecnica del nastro adesivo nell'area perianale o per flottazione e setacciatura sequenziale delle feci, nel rispetto delle norme di biosicurezza (attrezzature in laboratori specializzati). La PCR viene eseguita con primer specifici, con una PCR multipla mirata a diverse specie di *Taeniidae* o con un'ampia PCR per elminti seguita da sequenziamento.

Toxocara

È stato dimostrato che circa un terzo dei cani positivi alla presenza di *Toxocara* espellono uova di *Toxocara cati* (in seguito a coprofagia). Queste uova possono essere differenziate da quelle di *T. canis* mediante la misurazione delle uova o, in modo più affidabile, mediante PCR.

Vermi polmonari

L'*Aelurostrongylus abstrusus* è il verme polmonare del gatto più diffuso. In alcuni Paesi, tuttavia, possono essere presenti altri vermi polmonari come *Troglostrongylus* spp. e *Oslerus rostratus* e sono necessarie competenze per la differenziazione morfologica di L1. In alternativa, la PCR può essere eseguita a partire da L1 isolata dalle feci, o mediante analisi di tamponi tracheali o lavaggi broncoalveolari (sensibilità inferiore).

La L1 dei vermi polmonari più frequenti nei cani, *A. vasorum* e *C. vulpis*, può essere facilmente differenziata morfologicamente. Tuttavia, in singole occasioni può essere utile utilizzare metodi biomolecolari per la conferma.

Capillaria

Cani, gatti e altri mammiferi possono ospitare diverse specie di *Capillaria*, che hanno cicli di vita differenti. Non tutte sono state attribuite in modo definitivo dal punto di vista tassonomico. La PCR può aiutare a identificare la specie.

Nematodi della filaria

La PCR specie-specifica (real-time) da sangue EDTA è il metodo di elezione per la differenziazione delle specie di microfilarie (vedere 4.4.1.), anche se l'analisi morfologica e la colorazione con fosfatasi acida possono essere ancora utilizzate.

Elminti aberranti

Quando gli elminti aberranti sono morfologicamente indistinguibili o devono essere estratti da campioni fissati istologicamente, è possibile eseguire la PCR, anche a partire da colorazioni istologiche o raschiati cutanei.

Artropodi

Nei casi in cui la morfologia degli artropodi ne preclude l'identificazione, si possono adottare tecniche basate sul DNA.

Dermatofiti

Un pannello disponibile in commercio comprende i test *Microsporum* spp., *M. canis* e *Trichophyton* spp. in PCR in real-time ed è caratterizzato da un'elevata sensibilità e specificità. I raschiati cutanei e/o i peli devono essere raccolti e inviati al laboratorio. I risultati sono disponibili nel giro di qualche giorno.

4.6. RILEVAMENTO DEI DERMATOFITI

4.6.1. Informazioni generali

La dermatofitosi viene diagnosticata mediante una combinazione di test diversi e complementari, tra cui la lampada di Wood (solo per cani e gatti) e l'esame diretto per documentare l'infezione attiva del pelo, la coltura micologica per identificare le specie fungine coinvolte e monitorare la risposta alla terapia, e talvolta la biopsia cutanea per le presentazioni nodulari o atipiche. La rilevazione dei dermatofiti mediante PCR è ora possibile per cani e gatti in Europa (vedere 4.5.2.).

4.6.2. Esame diretto del pelo

Le dermatofitosi possono essere rilevate dall'esame microscopico dei peli. Tuttavia, la tecnica di campionamento e la competenza dell'esaminatore influenzano fortemente la sensibilità di questa procedura. Inoltre, anche con un campionamento e un esame eseguiti in modo ottimale, non si possono escludere tricogrammi falsi negativi (vedere 3.5.). Pertanto, solo un tricogramma positivo è significativo. L'idrossido di potassio (KOH) o l'olio minerale, con o senza l'aggiunta di coloranti (ad esempio il lattofenolo cotton blu), possono essere utilizzati per individuare meglio gli elementi fungini. I peli infettati da funghi dermatofiti si presentano solitamente come strutture ingrossate e gonfie, con una superficie ruvida e irregolare. La superficie dei peli mostra tipicamente ammassi o catene di spore fungine (artroconidi) (2-4 µm per *Microsporum canis*).

4.6.3. Esame con lampada di Wood

L'esame del pelo con una lampada a raggi ultravioletti (lampada di Wood) è un buon metodo di screening per la dermatofitosi nei cani e nei gatti. Se esposti alla luce, i peli invasi da alcune specie di dermatofiti, tra cui *M. canis*, si illuminano di verde. I peli infettati da altre specie di dermatofiti non sono mai fluorescenti e alcuni farmaci topici possono mascherare la fluorescenza. Pertanto, i risultati negativi dell'esame alla lampada di Wood non escludono la dermatofitosi. L'osservazione della fluorescenza deve essere confermata dall'esame microscopico dei peli (anche se il riconoscimento dei peli infetti non è sempre facile e può richiedere un occhio esperto) (vedere 4.6.2.).

4.6.4. Coltura micologica

La coltura micologica rimane la tecnica più affidabile per confermare la dermatofitosi nei cani e nei gatti. La raccolta dei campioni può essere ottenuta mediante raschiati cutanei, strappando i peli (sotto la lampada di Wood) o spazzolando il pelo con uno spazzolino da denti sterile, un pezzetto di tappeto sterile o un panno cattura polvere. Diversi terreni (come il Sabouraud Dextrose Agar) sono adatti alle colture micologiche. Le colonie di specie dermatofite come *M. canis* possono svilupparsi in pochi giorni. I terreni per l'isolamento dei dermatofiti (DTM) sono regolarmente utilizzati in medicina veterinaria. Tuttavia, solo pochissimi tentativi sono stati fatti per valutare le prestazioni di questi mezzi con campioni raccolti da animali e l'uso del solo DTM senza l'identificazione microscopica dei macroconidi non è raccomandato per la diagnosi delle dermatofitosi animali. Idealmente, il materiale raccolto dagli animali dovrebbe essere inviato a un laboratorio specializzato in micologia veterinaria. In laboratorio, l'identificazione specifica avviene attraverso l'esame microscopico delle colonie fungine. Il numero di colonie può aiutare a distinguere tra portatori meccanici e animali infetti. Il trasporto meccanico è dovuto alla contaminazione dell'ambiente e di solito è associato a un numero limitato di colonie di dermatofiti in coltura. L'infezione porta a una massiccia produzione di spore fungine (artroconidi) ed è solitamente associata a un numero molto elevato di colonie di dermatofiti in coltura.

APPENDICE 1 – INFORMAZIONI SU ESCCAP

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) è un'organizzazione non-profit indipendente il cui fine è quello di sviluppare linee guida e di promuovere le buone prassi per il controllo e il trattamento dei parassiti negli animali da compagnia. Grazie all'applicazione di misure adeguate, infatti, il rischio di patologie e trasmissioni parassitarie tra gli animali e l'uomo può essere ridotto al minimo. ESCCAP ambisce a estirpare dal territorio europeo le minacce per la salute e il benessere degli animali e dell'uomo correlate ai parassiti degli animali da compagnia.

Le tipologie di parassiti e la loro prevalenza nelle varie parti del continente sono molto diversificate; le linee guida ESCCAP mirano a riassumere ed evidenziare le criticità più importanti relative alle diverse parti d'Europa, specificando laddove necessario le misure di controllo raccomandate.

ESCCAP ritiene che:

- I veterinari e i proprietari di animali da compagnia debbano adottare misure adeguate a proteggere gli animali dalle infezioni parassitarie.
- I veterinari e i proprietari di animali da compagnia debbano adottare misure adeguate a proteggere la popolazione animale dai rischi associati ai viaggi e alle potenziali variazioni delle situazioni epidemiologiche parassitarie locali dovute all'esportazione o all'importazione di specie di parassiti non endemiche.
- I veterinari, i proprietari e i medici devono lavorare insieme per ridurre i rischi associati alla trasmissione zoonosica delle parassitosi.
- I veterinari devono essere in grado di guidare i proprietari in relazione ai rischi di infestazione parassitaria, alle patologie correlate e alle misure che possono essere adottate per minimizzare tali rischi.
- I veterinari devono fare il possibile per informare i proprietari di animali da compagnia in relazione ai parassiti, mettendoli in condizione di agire responsabilmente per tutelare non solo la salute dei loro animali, ma anche quella degli altri animali e delle persone della comunità di appartenenza.
- Laddove appropriato, i veterinari devono adottare i test diagnostici disponibili per stabilire lo stato delle infestazioni parassitarie, con lo scopo di fornire la migliore consulenza possibile.

Per raggiungere questi obiettivi, ESCCAP produce:

- Linee guida dettagliate per i medici veterinari e i parassitologi veterinari
- Traduzioni, estratti, adattamenti e versioni riassuntive delle linee guida, per rispondere ai vari requisiti dei Paesi e delle regioni europee

Le linee guida ESCCAP nelle diverse versioni sono disponibili sul sito www.esccap.org

Disclaimer:

Nella redazione delle presenti linee guida sono stati adottati tutti gli accorgimenti possibili per garantire l'accuratezza delle informazioni, basate sull'esperienza degli autori. Tuttavia, gli autori e l'editore non si assumono nessuna responsabilità in relazione a eventuali conseguenze derivanti dall'errata interpretazione delle informazioni riportate nel testo, nonché in riferimento a condizioni o garanzie implicite. ESCCAP sottolinea la necessità di considerare sempre tutte le normative nazionali, regionali e locali prima dell'applicazione delle misure raccomandate in questo testo.

APPENDICE 2 - GLOSSARIO, ABBREVIAZIONI E LINK UTILI

GLOSSARIO

Sensibilità	Il tasso di campioni veri positivi (valutati tramite test “Gold Standard”) o la probabilità che un animale infetto possa essere rilevato come positivo dal test.
Sensibilità [%]	Campioni veri positivi/(campioni veri positivi + campioni falsi negativi)*100.
Specificità	Il tasso di campioni veri negativi (valutati tramite test “Gold Standard”) o la probabilità che un animale non infetto possa essere rilevato come negativo dal test.
Specificità [%]	Campioni veri negativi/(campioni veri negativi + campioni falsi positivi)*100.
Metodi di rilevamento diretto	Rilevare la presenza dell’agente patogeno stesso, attraverso la visualizzazione (ad esempio con la microscopia), la rilevazione di materiale genetico (ad esempio tramite PCR o LAMP) o la rilevazione di molecole specifiche del parassita in questione (ad esempio l’antigene, solitamente composto da proteine in diverse varianti).
Metodi di rilevamento indiretto	Metodi sierologici che determinano un precedente contatto con i parassiti attraverso la rilevazione di anticorpi specifici indotti dall’infezione. Poiché gli anticorpi vengono solitamente prodotti qualche tempo dopo l’infezione iniziale e permangono dopo l’eliminazione del parassita, non indicano necessariamente la presenza di infezioni in atto. La rilevazione degli anticorpi può essere eseguita in diversi formati, ad esempio Western blotting, test di immunofluorescenza diretta o indiretta, ELISA, test a flusso laterale e altri. La rilevazione avviene mediante l’uso di anticorpi secondari marcati. Molti di questi test, anche se non tutti, consentono di quantificare i livelli di anticorpi (titoli), ad esempio per studi di follow-up nel corso dell’infezione o del trattamento.

ABBREVIAZIONI

ECM	Ehrlichiosi monocitica canina
DFA	Test di immunofluorescenza diretta
DTM	Terreno per l'isolamento dei dermatofiti
EIA	Test immunoenzimatico
ELISA	Test di immunoassorbimento enzimatico
EPG	Conta delle uova per grammo
FECRT	Test di riduzione della conta delle uova nelle feci
TIC	Test immunocromatografico dipstick
IFAT	Test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca degli anticorpi
KOH	Soluzione di idrossido di potassio
L1	Primo stadio larvale
L3	Terzo stadio larvale
LAMP	Amplificazione isotermica
LPG	Larve per grammo
MIFC	Concentrazione mertiolato-iodio-formaldeide
OPG	Conta delle oocisti per grammo
PCR	Reazione a catena della polimerasi
SAF	Sodio acetato-acido acetico-formalina
SAFC	Concentrazione di sodio acetato-acido acetico-formalina

LINK UTILI

Come misurare con il microscopio:
www.youtube.com/watch?v=_CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=_eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parasitology.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

La tecnica di conta delle uova McMaster modificata:
youtu.be/rkSGe-L4Sec

Le immagini degli stadi parassitari sono riportate alle pagine seguenti:
www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html
www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/august2019/common-intestinal-parasites-pt1.html
www.ncvetp.org/parasite-image-database.html
quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/

ESCCAP
EUROPEAN SCIENTIFIC COUNSEL COMPANION ANIMAL PARASITES®

ISBN: 978-1-913757-54-0

Segreteria ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

0044 (0) 1684 585135
info@esccap.org
www.esccap.org
www.esccap.it

Elanco
IDEXX
MSD Animal Health
vetoquinol ACHIEVE MORE TOGETHER
zoetis
Boehringer Ingelheim

4 Diagnosi parassitologica in gatti, cani ed equini

Linee guida ESCCAP 04 Prima edizione – Novembre 2022