Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

Servizio Sanitario della Toscana

FAD sincrona
DIAGNOSI DIRETTA MORFOLOGICA DELLE PARASSITOSI UMANE
Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi
11, 13, 18 ottobre 2023

Diagnosi delle infezioni da Filarie

FRANCESCO BERNIERI

Consulente CRRVEQ, Milano, Italia

Comitato di Studio per la Parassitologia – AMCLI-CoSP

Conflitto di interessi

Dichiaro di non avere alcun conflitto di interesse riguardo all'argomento trattato né di aver ricevuto alcun compenso per questa presentazione.

Filariosi di interesse umano
Classificazione in base alla localizzazione dei vermi adulti

- **Filariosi linfatiche**
  - ***Wuchereria bancrofti*** **Patogena (Microfilarie nel sangue)**
  - ***Brugia malayi*** **Patogena (Microfilarie nel sangue)**
  - ***Brugia timori*** **Patogena (Microfilarie nel sangue)**
- **Filariosi sottocutanee**
  - ***Loa loa*** **Patogena (Microfilarie nel sangue)**
  - ***Onchocerca volvulus*** **Patogena (Microfilarie nella cute)**
  - ***Mansonella streptocerca*** **Non patogena (Microfilarie nella cute)**
  - ***Dracunculus medinensis*** **Patogeno (Microfilarie emesse all'esterno)**
- **Filariosi delle cavità sierose**
  - ***Mansonella perstans*** **Non patogena (Microfilarie nel sangue)**
  - ***Mansonella ozzardi*** **Non patogena (Microfilarie nel sangue)**

Filariosi ematiche

Si definiscono come “Filariosi ematiche” le infezioni nelle quali gli stadi larvali dei nematodi filariformi, le microfilarie, circolano nel sangue periferico.

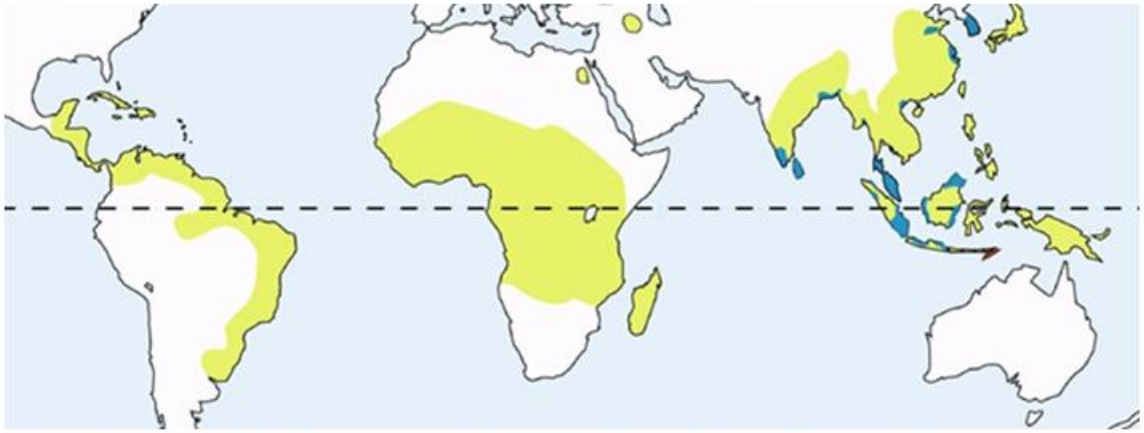
- Filariosi linfatiche: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*. Gli adulti vivono nei vasi linfatici.
- Filariosi sottocutanee: *Loa loa*. Gli adulti vivono nel sottocute.
- Filariosi degli organi profondi: *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*. Gli adulti vivono nelle cavità corporee quali le cavità peritoneale, pleurica, toracica o, più raramente, in altri parti profonde come mesentere, spazi perirenali, pericardio. Possono vivere anche nel sottocutaneo.

Filariosi linfatiche - Epidemiologia

- Secondo dati aggiornati al 2020 si stima che 863 milioni di persone, in circa 50 Paesi, vivono in aree a rischio di infezione e necessitano di chemioterapia preventiva.
- Al 2018 risultavano circa 51 milioni di persone con manifestazioni clinicamente significative causate dalla filariosi linfatica, principalmente idrocele, linfedema e elefantiasi (con una diminuzione del 74% rispetto al 2000, anno dell'inizio della campagna di eradicazione dell'OMS).
- Gli esseri umani sono l'ospite esclusivo di *W. bancrofti*. Sebbene alcuni ceppi di *B. malayi* possano infettare anche alcune specie animali (scimmie, felini), si ritiene che il ciclo vitale in questi animali sia epidemiologicamente distinto da quello umano.

Filariosi linfatiche - Epidemiologia

- Il 90% delle infezioni è causato da *W. bancrofti*, il restante 10%, quasi completamente, da *B. malayi*. Molto minore il numero di infezioni da *B. timori*.
- *W. bancrofti* è endemica in tutta la fascia tropicale e sub tropicale, *B. malayi* in Asia Sud Orientale e nel subcontinente indiano, *B. timori* in alcune delle Piccole Isole della Sonda (Flores, Sumba, Roti, Alor, Timor).

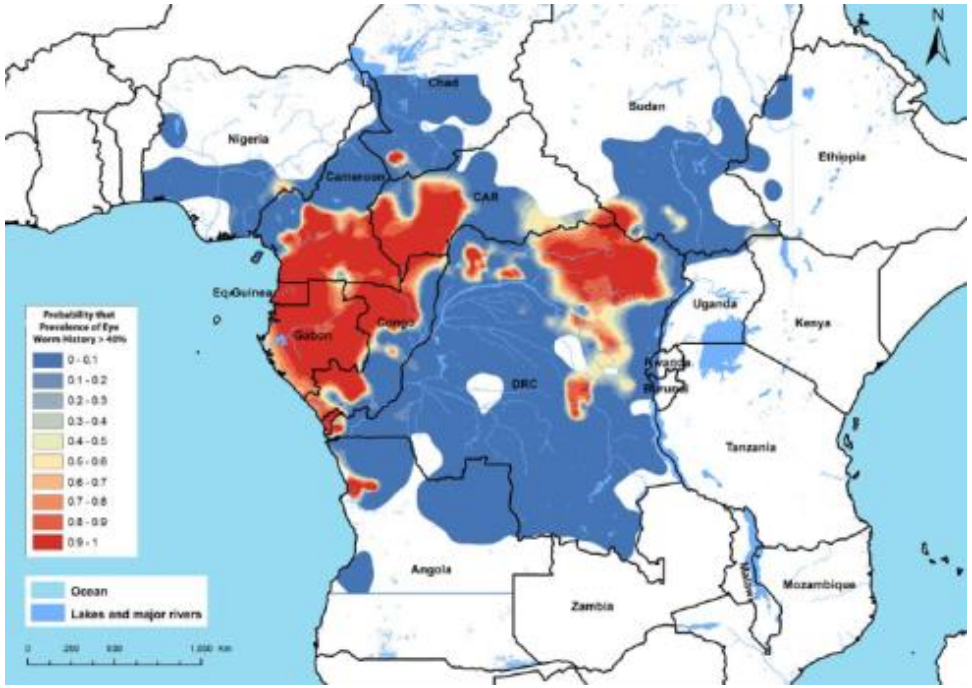


Da: https://wuchereriabancroftiamj.weebly.com/epidemiology.html

Filariosi sottocutanee: *Loa loa* - Epidemiologia

L. loa è circoscritta all'Africa Occidentale e Centrale, dove un'analisi geostatistica della storia dell'infezione ha mappato come ad alto rischio di loiasi 10 Paesi in cui vivono circa 14,4 milioni di persone.

Anche per *L. loa* sembra che l'unico serbatoio sia l'uomo.



Da: Zoure HGM et al. *The Geographic Distribution of Loa loa in Africa*. PLoS Negl Trop Dis.2011

Filariosi degli organi profondi: *Mansonella* spp Epidemiologia

M. perstans è presente in Africa Occidentale e Centrale e in limitate aree del Sud America, *M. ozzardi* in Sud America e nei Caraibi.

M. perstans

M. ozzardi

Da: Ta-Tang *et al*. *Mansonellosis: current perspectives*. Curr Trop Med Rep. 2018

Filariosi ematiche - Trasmissione

Le filarie linfatiche sono trasmesse dalla puntura di zanzare femmina dei generi *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Mansonia*.

Culex spp

Anopheles spp

Aedes spp

Mansonia spp

L. loa è trasmessa da tafani del genere *Chrysops*.

Chrysops spp

M. perstans e *M. ozzardi* sono trasmesse da moscerini del genere *Culicoides*. In alcune zone del Sud America *M. ozzardi* è trasmessa anche da mosche (mosche nere) del genere *Simulium*.

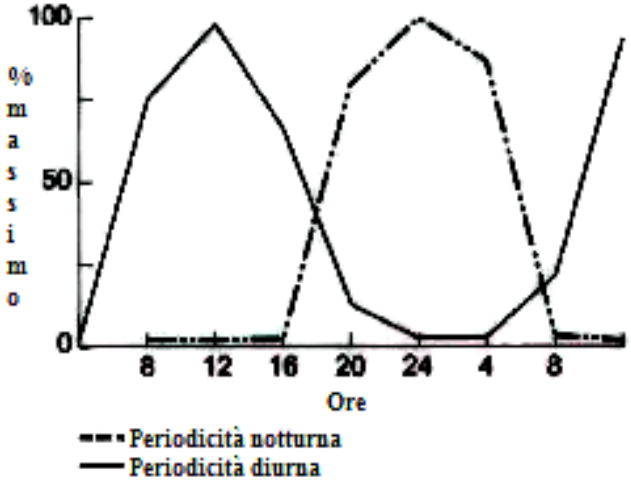
Culicoides spp

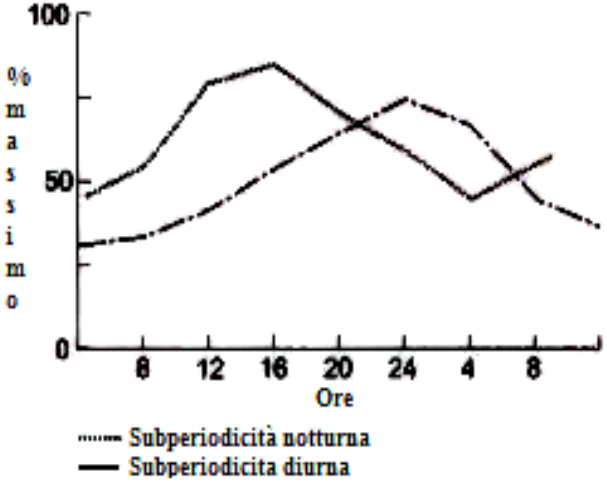
Simulium spp

Periodicità

- La periodicità è la variazione del numero di microfilarie presenti in circolo durante le 24 ore.
- Alcune specie di microfilarie circolano nel sangue periferico a tutte le ore del giorno e della notte, mentre altre sono presenti solo durante alcuni periodi.
- Le microfilarie a periodicità notturna rimangono confinate nelle arteriole polmonari durante il giorno e si trovano nel sangue periferico in pratica solo durante le ore notturne quando hanno maggiori possibilità di essere ingerite dagli insetti vettori, il contrario avviene per le microfilarie a periodicità diurna.
- Le microfilarie che sono presenti nel sangue a tutte le ore ma la cui concentrazione aumenta significativamente durante le ore notturne o diurne sono dette a subperiodicità notturna o diurna rispettivamente.
- Le microfilarie che circolano senza cambiamenti significativi nel corso delle 24 ore sono dette aperiodiche.

Periodicità





La conoscenza della periodicità delle microfilarie ha la sua importanza pratica nel decidere qual è il periodo migliore per effettuare il prelievo di sangue per la loro ricerca.

Specie	Periodicità	Ore raccomandate per il prelievo
W. bancrofti	Notturna [(a)]	22:00-01:00 (picco 24:00)
B. malayi	Notturna [(b)]	22:00-01:00 (picco 24:00)
B. timori	Notturna	22:00-01:00 (picco 24:00)
L. loa	Diurna	12:00-14:00 (picco 13:00)
Mansonella spp.	Aperiodiche	Qualunque ora

(a) Subperiodicità notturna (picco ore 21:00) in Indonesia, Malesia, e parti delle Filippine e Tailandia
(b) Subperiodicità diurna (picco ore 16:00) in Nuova Caledonia e Polinesia; subperiodicità notturna nelle zone rurali della Tailandia

Filariosi ematiche – Tecniche diagnostiche

- Tecniche dirette
  - Striscio sottile e Goccia spessa
  - Filtrazione su membrana
  - Tecnica di Knott (Concentrazione per centrifugazione)
  - Citocentrifugazione
  - Test immunocromatografico per *W. Bancrofti*
  - Tecniche molecolari
- Tecniche Sierologiche

Tecniche dirette

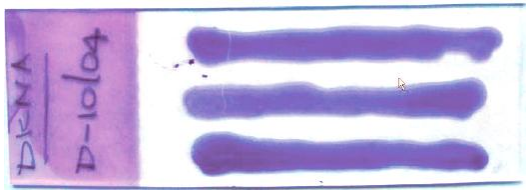
Striscio sottile

Procedere come per la malaria.

Goccia spessa

WHO consiglia di esaminare una maggior quantità di sangue (60 μL) rispetto a quanto usualmente fatto per la malaria.

- Utilizzando una micropipetta allestire tre linee parallele di sangue (20 μL ciascuna) su un vetrino porta oggetti.



- Far asciugare il preparato per 24-72 ore (se da sangue in EDTA almeno per 48 ore).
- De-emoglobinizzare per 5 minuti con acqua distillata o acqua di rubinetto posizionando il vetrino in verticale in una vaschetta per colorazioni tipo Coplin.
- Quando il preparato è asciutto fissarlo con alcool metilico per 2-5 minuti. Far asciugare e colorare.

Da: WHO. *Lymphatic Filariasis*. 2001

Tecniche dirette

Colorazione di Striscio sottile e Goccia spessa

- La colorazione più usata è la colorazione di Giemsa.
- I nuclei somatici delle microfilarie sono di colore rosso porpora o violetto, mentre la guaina si colora in rosa intenso.
- Con la colorazione di Giemsa la guaina di *L. loa* non si colora.
- Per una buona colorazione delle guaine è necessaria una colorazione all'Ematossilina Eosina (Giemsa Delafield).

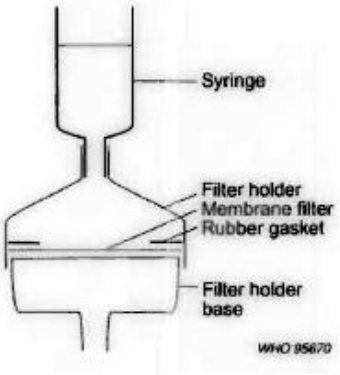
Osservazione microscopica

- I preparati vanno interamente osservati a piccolo ingrandimento (100x).
- Una volta evidenziate le microfilarie utilizzare ingrandimenti maggiori (400x e 1.000x) per studiarne le caratteristiche morfologiche.

Tecniche dirette

Filtrazione su membrana

- Si diluisce 1 mL di sangue con anticoagulante in 10 mL di acqua distillata per lisare le emazie.
- Filtrare attraverso una membrana di cellulosa o policarbonato a porosità nota (pori del diametro di 5 µm per trattenere le microfilarie più grandi come quelle di *W. Bancrofti* o *L. loa*, pori del diametro di 3 µm per trattenere tutte le microfilarie).
- Dopo la filtrazione si rimuove il filtro, lo si mette su un vetrino con la parte filtrante in alto, si aggiungono 1-2 goccie di S.F. e si osserva al microscopio a piccolo ingrandimento (100x).
- Se presenti microfilarie è possibile colorarle con Giemsa dopo fissazione con metanolo. Questa tecnica, molto sensibile permette anche il conteggio delle microfilarie per mL.



Tecniche dirette

Tecnica di Knott (Concentrazione per centrifugazione)

- Si diluisce 1 mL di sangue con anticoagulante in 10 mL di una soluzione di formalina al 2% (o di saponina al 2%) per lisare le emazie.
- Dopo una breve centrifugazione (2 minuti a 300 g) si utilizza il sedimento per allestire dei preparati a fresco da osservare a piccolo ingrandimento (100x), o per preparare degli strisci da colorare con Giemsa (o con Ematossilina Eosina).
- Questa tecnica, molto sensibile permette anche il conteggio delle microfilarie per mL.

Tecniche dirette

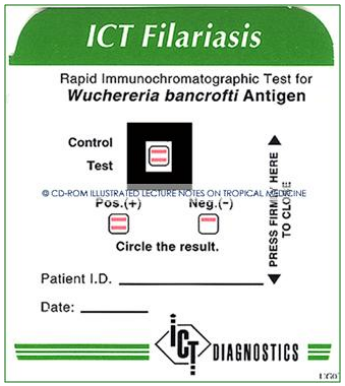
Citocentrifugazione

- Con la citocentrifuga si concentrano le microfilarie contenute in 100 µL di sangue formando uno *spot* su un vetrino che viene poi fissato e colorato.
- Utile per il conteggio delle microfilarie e per la loro identificazione in quanto la morfologia è ben conservata.
- Questa tecnica, molto sensibile permette anche il conteggio delle microfilarie per mL.

Tecniche dirette

Test immunocromatografico per *W. Bancrofti*

- Il test immunocromatografico (ICT) ricerca antigeni circolanti di *W. bancrofti* (90% delle filariosi linfatiche).
- È stato validato e promosso dall'OMS come strumento diagnostico primario per la mappatura, il monitoraggio e l'eliminazione della malattia.
- Non dipendono dalla periodicità della microfilariemia, si eseguono in qualsiasi momento della giornata.
- Possibili reazioni crociate di entrambi con *L. loa* soprattutto nelle zone ad alta endemia.



Tecniche dirette

Biologia Molecolare

- Sono state studiate e sviluppate diverse tecniche sia per le filariosi linfatiche (PCR, Rt-PCR) che per la loiasi (PCR, LAMP).
- Sono test con alta specificità e sensibilità e sono in grado di rilevare il DNA parassitario sia nell'uomo sia nei vettori e possono essere molto utili per studi epidemiologici e per il monitoraggio di programmi di controllo.
- Al momento non esistono prodotti commerciali per uso laboratoristico umano.

Tecniche dirette

In Italia che tecniche vengono utilizzate?

Indagine conoscitiva sulla diagnostica parassitologica nei laboratori in Italia (in corso)

- Al 17 febbraio 2023: 80 risposte.
- 59 laboratori (72,5 %) dichiarano di essere in grado di eseguire la ricerca diretta di microfilarie.

Colorazione diretta di Striscio sottile e/o Goccia spessa	46	80%
Tecnica di Knott	4	7%
Filtrazione su membrana	1	2%
Colorazione diretta di Striscio sottile e/o Goccia spessa + Tecnica di Knott	4	7%
Colorazione diretta di Striscio sottile e/o Goccia spessa + Citocentrifugazione	1	2%
Colorazione diretta di Striscio sottile e/o Goccia spessa + Leucoconcentrazione secondo Brumpt	1	2%
Colorazione diretta di Striscio sottile e/o Goccia spessa + Tecnica di Knott + Citocentrifugazione	1	2%
Test immunocromatografico per *W. Bancrofti*	0	0%

PCR per filarie (*home made*)	2

Identificazione di specie

Principali caratteristiche morfologiche delle microfilarie

- Dimensioni: lunghezza e larghezza.
- Presenza o meno di una guaina.
- Spazio cefalico: corto (≤ larghezza) o lungo (> larghezza).
- Disposizione dei nuclei del corpo: ben separati e distinguibili singolarmente o accavallati l'un l'altro e densamente stipati.
- Tratto terminale che può essere privo di nuclei o presentare nuclei fino al termine dell'estremità caudale.
- Forma della coda: affusolata/appuntita o smussata.

Identificazione di specie

Principali caratteristiche delle microfilarie ematiche

Specie	*Wuchereria bancrofti*	*Brugia malayi*	*Brugia timori*	*Loa loa*	*Mansonella perstans*	*Mansonella ozzardi*
Distribuzione geografica	Tropici e Sub tropici	Sud Est Asiatico, Subcontinente Indiano	Isola della Piccola Sonda	Africa Occidentale e Centrale	Africa e Sud America	Caraibi e Sud America
Periodicità	Notturna	Notturna	Notturna	Diurna	Aperiodica	Aperiodica
Lunghezza µm (media) [(a)]	244–296 (260)	177–230 (220)	265–323 (287)	231–250 (238)	190–200 (195)	163–203 (183)
Larghezza µm	7,5–10	5–6	4,4–6,8	5–7	4–5	3–5
Guaina	Presente	Presente	Presente	Presente [(b)]	Assente	Assente
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)	Lungo (>larghezza)	Lungo (>larghezza)	Corto (≤ larghezza)	Corto (≤ larghezza)	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Piccoli, ben spaziati	Piccoli, irregolari, sovrapposti	Piccoli, irregolari, sovrapposti	Grandi, irregolari, possono sovrapporsi	Irregolari, sovrapposti	Irregolari, sovrapposti
Nuclei terminali	Assenti	Due nei rigonfiamenti caudali	Due nei rigonfiamenti caudali	Fino all'estremità caudale	Fino all'estremità caudale	Fino all'estremità caudale
Estremità caudale	Lunga, affusolata, appuntita	Affusolata con due rigonfiamenti	Affusolata con due rigonfiamenti	Affusolata, leggermente smussata	Smussata	Lunga, affusolata, appuntita

[(a)] Con la colorazione diretta su sangue le microfilarie si coartano. La lunghezza delle microfilarie in formalina al 2% o saponina al 2% è maggiore (vedi tecnica di Knott)

[(b)] Con Giemsa la guaina di *L. loa* non si colora

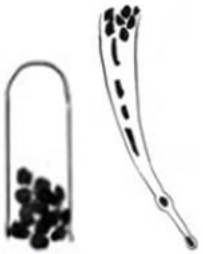
Da: WHO. *Bench Aids for the diagnosis of filarial infections*. 1997 (modificata)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

Identificazione di specie

Caratteristiche delle parti cefaliche e caudali delle microfilarie ematiche

W. bancrofti

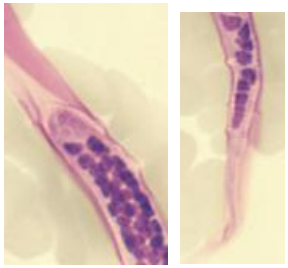


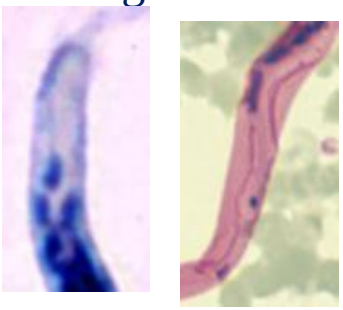
Brugia spp

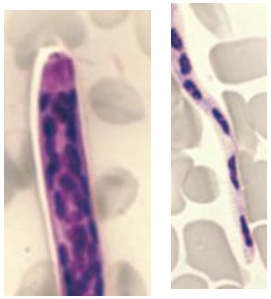
L. loa

M. perstans

Spazio cefalico:	Corto	Lungo	Corto	Corto
Estremità caudale:	Lunga appuntita	Affusolata con due rigonfiamenti	Affusolata, leggermente smussata	Smussata
Nuclei terminali:	Assenti	Due caudali nei rigofiamenti	Fino all'estremità	Fino all'estremità







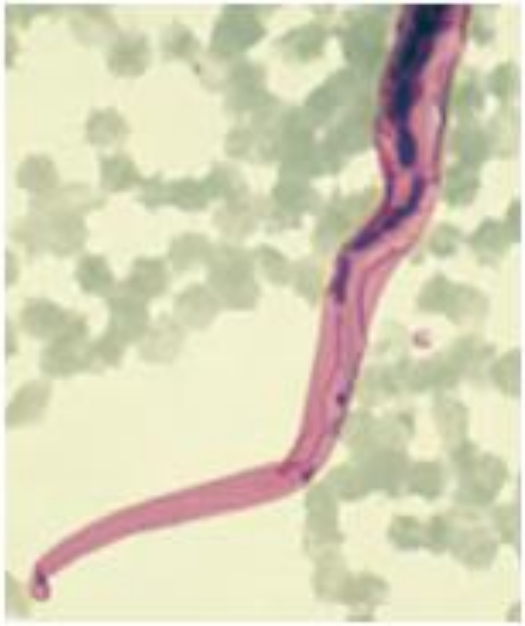
Wuchereria bancrofti

Lunghezza µm (media)	244–296 (260)
Larghezza µm	7,5–10
Guaina	Presente
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Piccoli, ben spaziati
Nuclei terminali	Assenti
Estremità caudale	Lunga, affusolata, appuntita

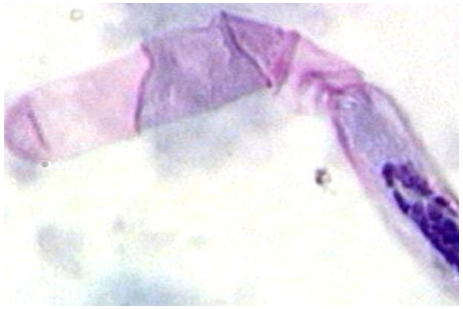
Fascia tropicale e sub tropicale

- Asia
- Africa
- Sud America

Brugia malayi

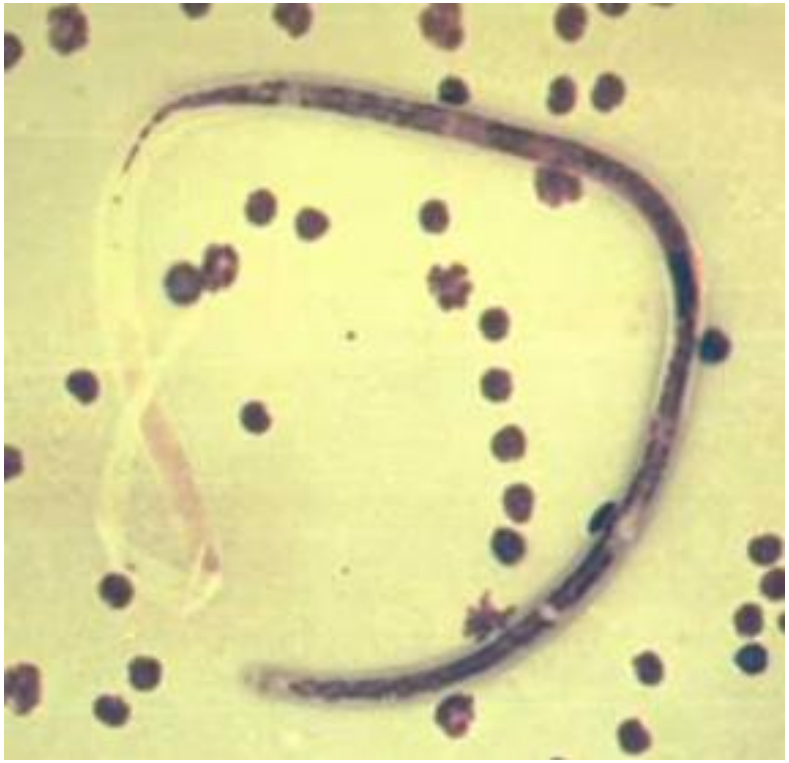


Lunghezza µm (media)	177-230 (220)
Larghezza µm	5-6
Guaina	Presente
Spazio cefalico	Lungo (> larghezza)
Nuclei somatici	Piccoli, irregolari, sovrapposti
Nuclei terminali	Due rigonfiamenti caudali
Estremità caudale	Affusolata con due rigonfiamenti



Sud Est Asiatico

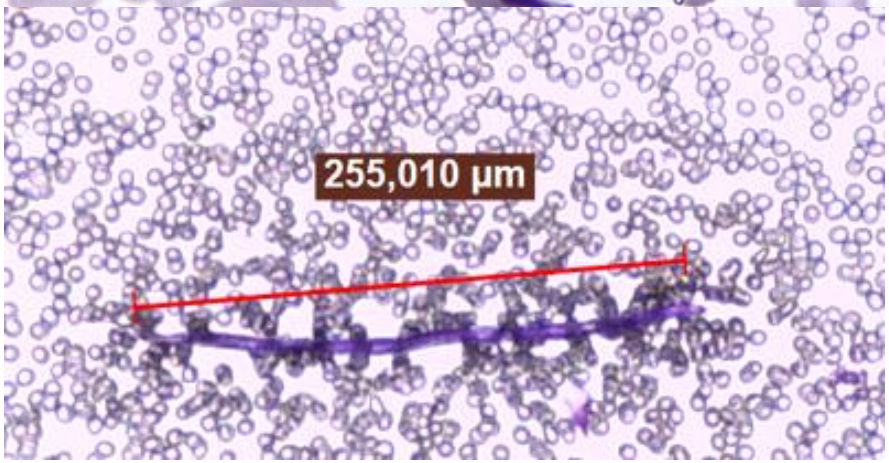
Brugia timori



Lunghezza µm (media)	265-323 (287)
Larghezza µm	4,4-6,8
Guaina	Presente
Spazio cefalico	Lungo (> larghezza)
Nuclei somatici	Piccoli, irregolari, sovrapposti
Nuclei terminali	Due rigonfiamenti caudali
Estremità caudale	Affusolata con due rigonfiamenti

Isole della Sonda

Loa loa

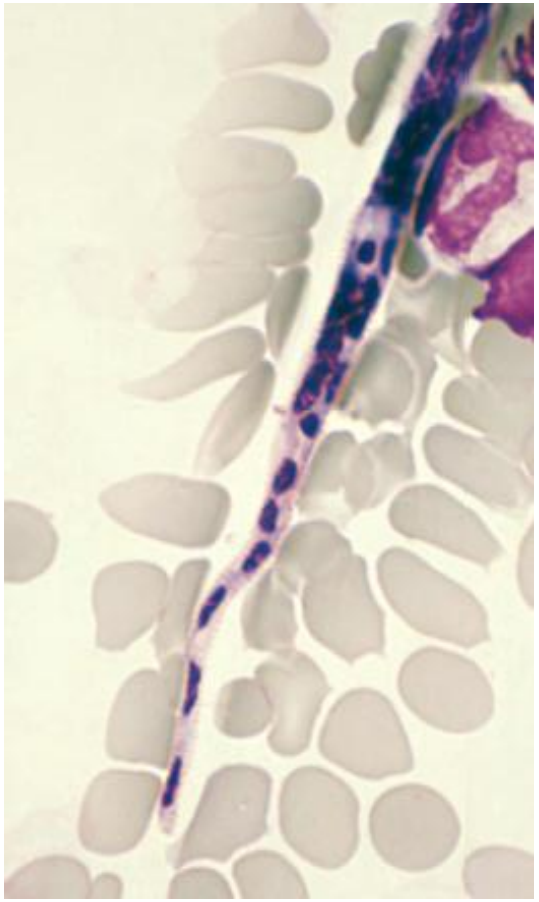


Lunghezza µm (media)	231–250 (238)
Larghezza µm	5-7
Guaina	Presente *
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Grandi, irregolari, possono sovrapporsi
Nuclei terminali	Fino all'estremità caudale
Estremità caudale	Affusolata, leggermente smussata

Africa Occidentale e Centrale

* Con la colorazione di Giemsa la guaina di *L. loa* non si colora. È possibile intuirne la presenza dallo scostamento delle emazie dal corpo della microfilaria.

Loa loa



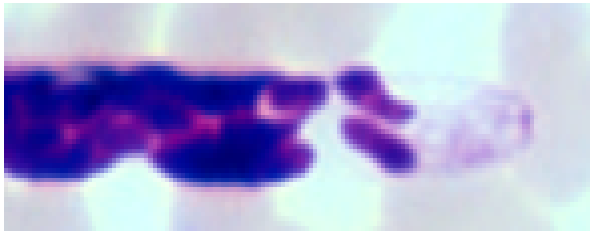
Lunghezza µm (media)	231–250 (238)
Larghezza µm	5-7
Guaina	Presente *
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Grandi, irregolari, possono sovrapporsi
Nuclei terminali	Fino all'estremità caudale
Estremità caudale	Affusolata, leggermente smussata

Africa Occidentale e Centrale

* Con la colorazione di Giemsa la guaina di *L. loa* non si colora. È possibile intuirne la presenza dallo scostamento delle emazie dal corpo della microfilaria.

Mansonella perstans

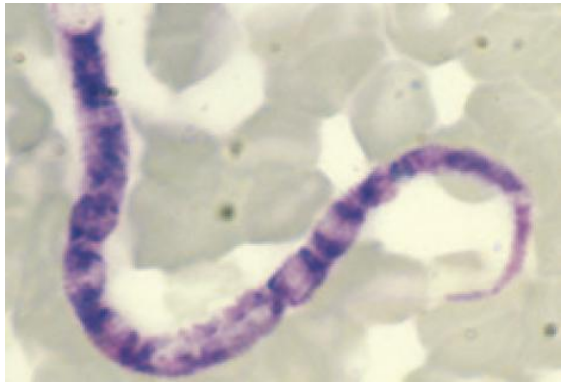
Lunghezza µm (media)	190-200 (195)
Larghezza µm	4-5
Guaina	Assente
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Irregolari, sovrapposti
Nuclei terminali	Fino all'estremità caudale
Estremità caudale	Smussata



Africa Occidentale e Centrale e in limitate aree del Sud America

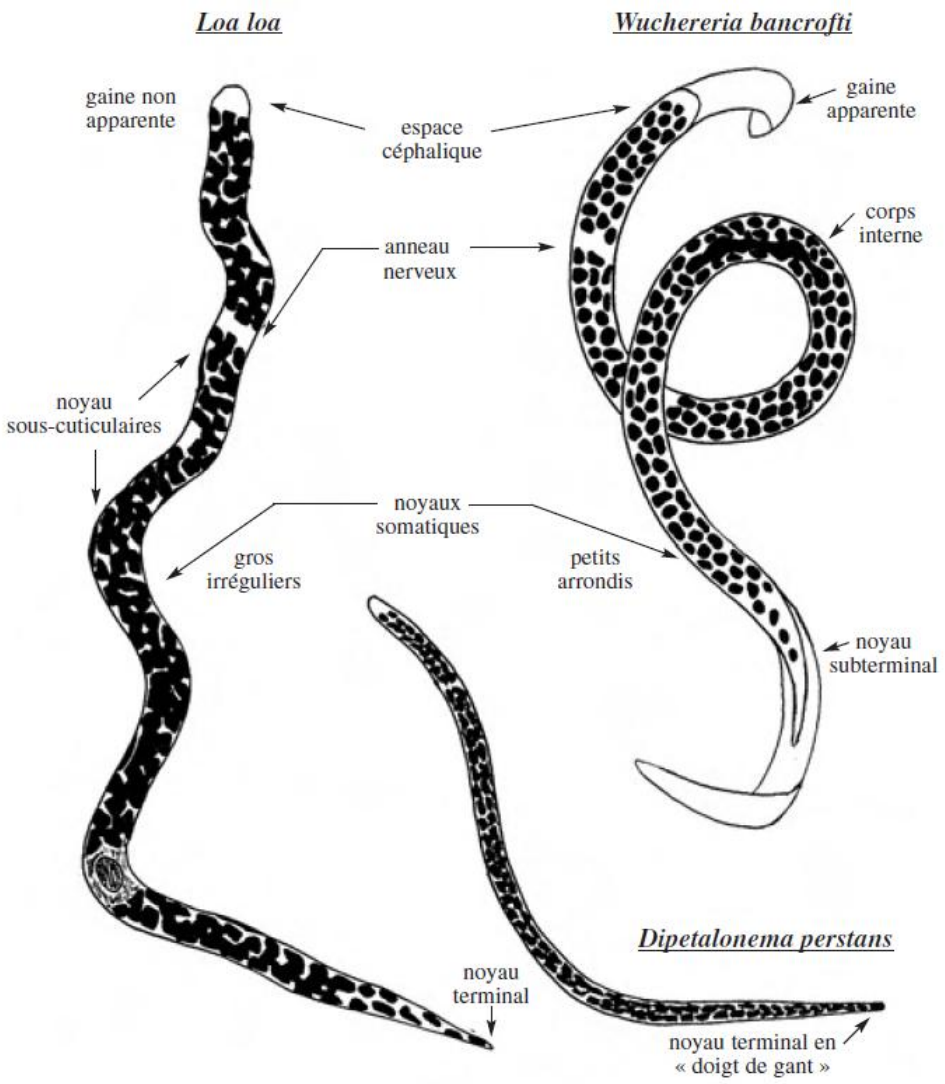
Mansonella ozzardi

Lunghezza µm (media)	163-203 (183)
Larghezza µm	3-5
Guaina	Assente
Spazio cefalico	Corto (≤ larghezza)
Nuclei somatici	Irregolari, sovrapposti
Nuclei terminali	Fino all'estremità caudale
Estremità caudale	Lunga, affusolata, appuntita



Sud America e nei Caraibi

Caratteristiche schematiche delle tre principali microfilarie ematiche



Da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001

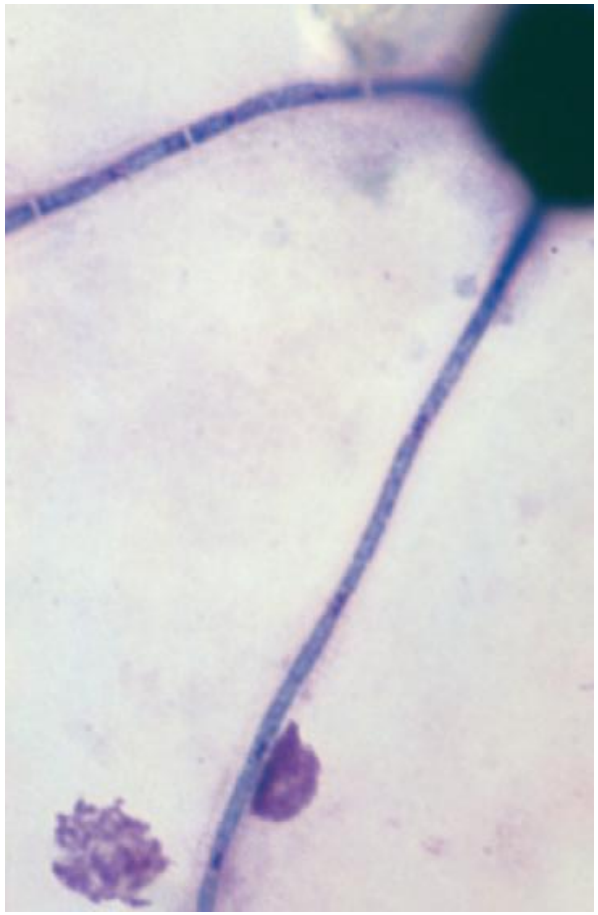
Artefatti

Nei preparati microscopici possono essere ritrovati artefatti di varia natura, in genere causati da inquinamento esogeno.

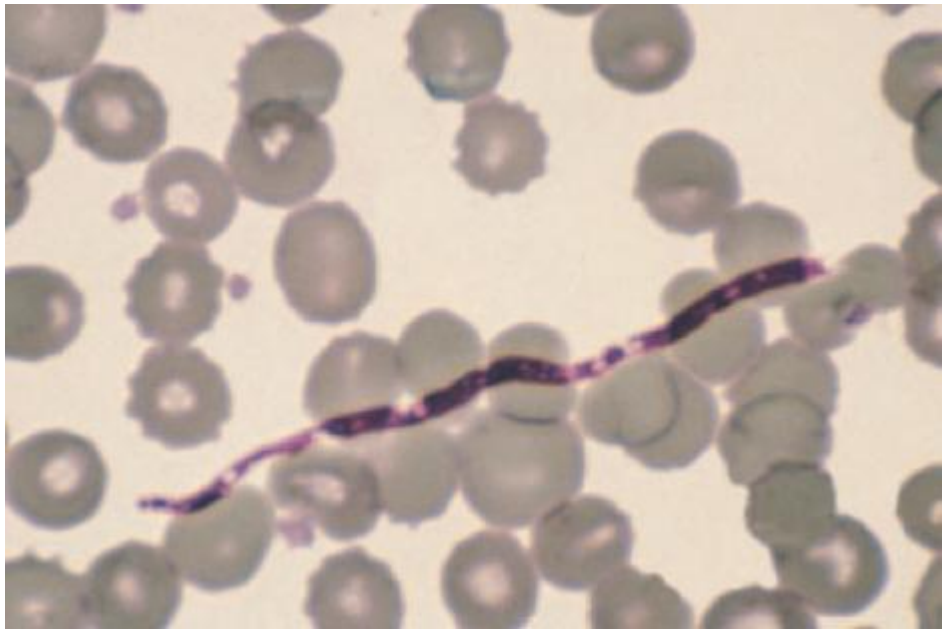
In particolare:

- miceli fungini, quando lo striscio sottile o la goccia spessa vengono mantenuti in ambiente umido prima della colorazione;
- fibre vegetali che inquinano i vetrini prima della colorazione.

Artefatti



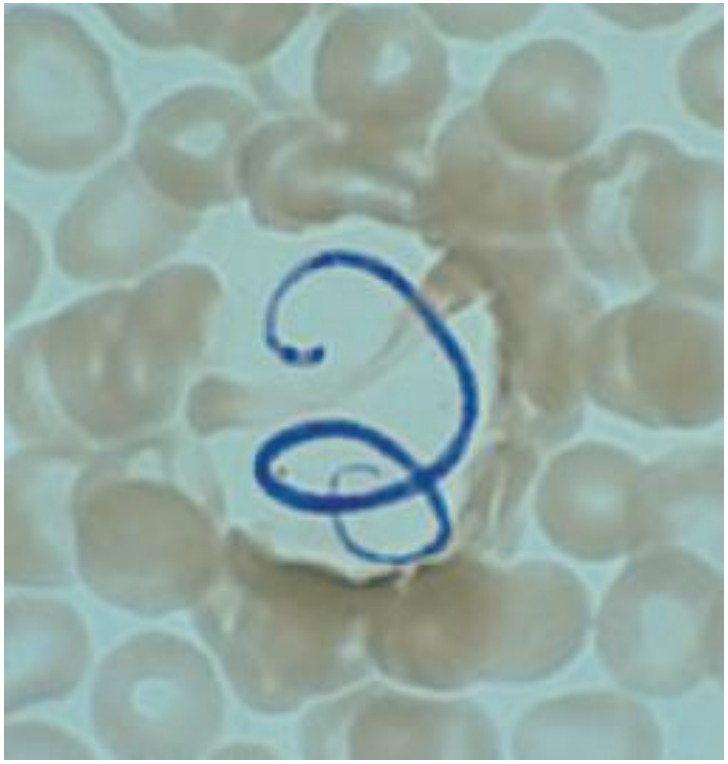
Due filamenti miceliari originati da un elemento base, facilmente distinguibilidi una microfilaria.



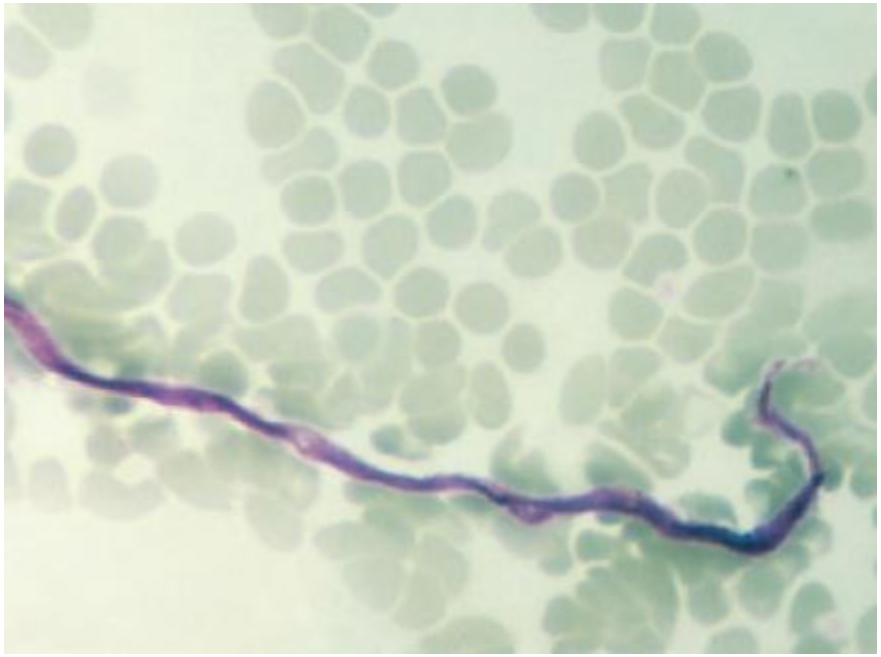
Filamento miceliale, la parte posteriore con un nucleo terminale potrebbe fgar pensare a una microfilaria, ma non sono presenti i nuclei somatici.

Da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001

Artefatti



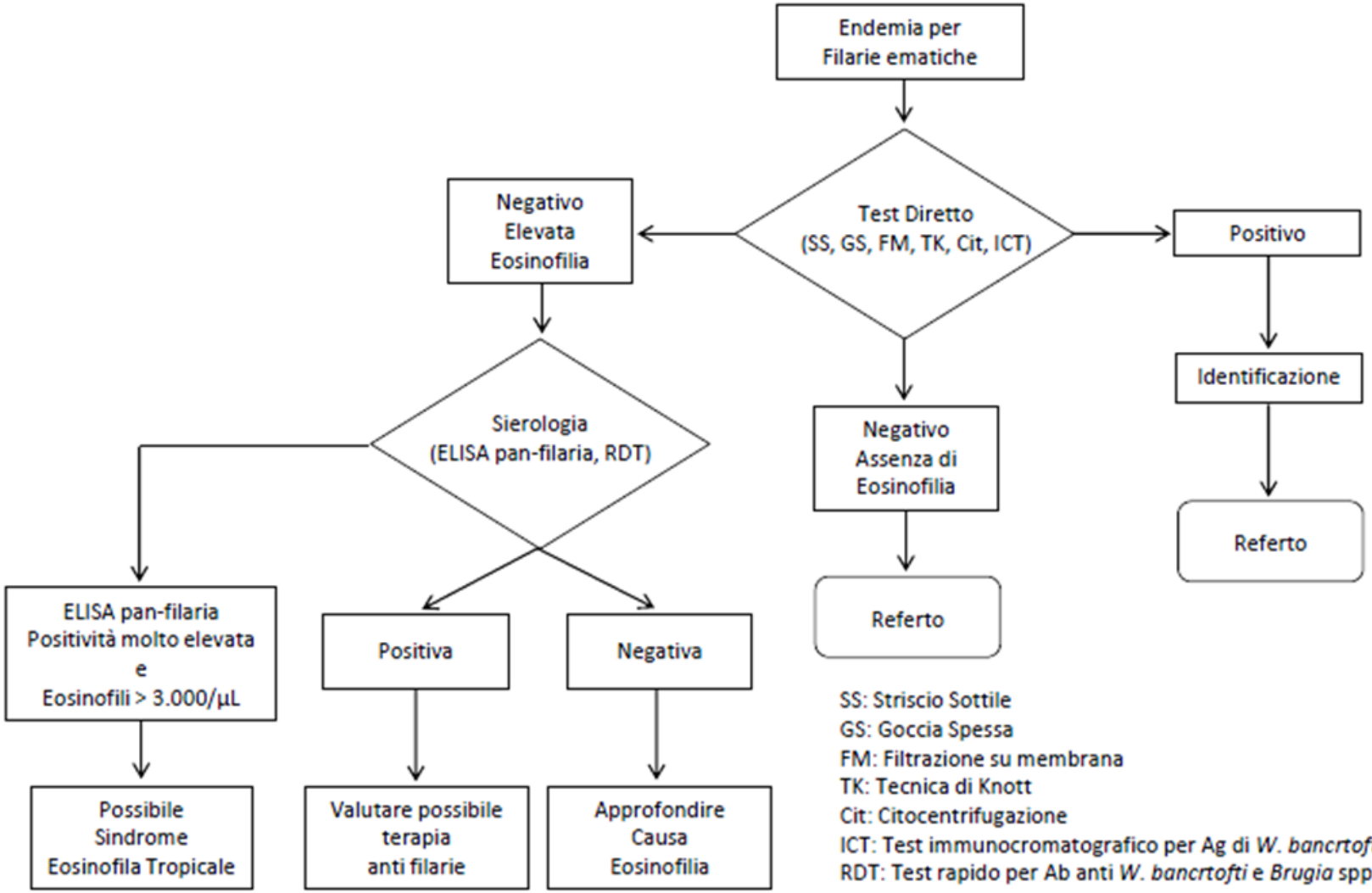
Helicosporium sp. nel suo involucro simile a un uovo, da non confondere con una microfilaria.



Fibra vegetale. Non è presente alcun nucleo, non può essere una microfilaria.

Da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001

Algoritmo diagnostico per le filariosi ematiche: approccio diretto parassitologico



SS: Striscio Sottile
GS: Goccia Spessa
FM: Filtrazione su membrana
TK: Tecnica di Knott
Cit: Citocentrifugazione
ICT: Test immunocromatografico per Ag di *W. bancrtofti*
RDT: Test rapido per Ab anti *W. bancrtofti* e *Brugia* spp

Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

Servizio Sanitario della Toscana

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Comitato di Studio per la Parassitologia