Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

M/903F/P02-D ed4 rev2

ID PROVIDER ECM 903

DIAGNOSI DIRETTA MORFOLOGICA DELLE PARASSITOSI UMANE

11 Ottobre 2023

14.30 Introduzione
Paola Pezzati

14.20 Rilevanza clinica delle parassitosi
Alessandro Bartoloni o suo collaboratore

14.50 Le malattie tropicali neglette (NTDs)
Fabrizio Bruschi

15.20 Risultati delle VEQ in Parassitologia
Francesco Bernieri

15.50 Le parassitosi quale problematica di salute globale e loro inquadramento diagnostico
Daniele Crotti

Parassitosi Fecali

16.20 Aspetti preanalitici: raccolta, conservazione ed invio dei campioni biologici per gli esami parassitologici
Francesco Bernieri

16.50 Metodologie e tecniche diagnostiche dirette per protozoi ed elminti
Francesco Bernieri

17.30 Fine della prima giornata

13 Ottobre 2023

Diagnosi diretta delle infezioni da elminti

14.30 Diagnosi delle infezioni da Nematodi
Annibale Raglio

15.00 Diagnosi delle infezioni da Trematodi
Daniele Crotti

15.30 Diagnosi delle infezioni da Cestodi
Francesco Bernieri

Diagnosi diretta delle infezioni da Protozoi

16.00 Diagnosi di *Giardia duodenalis* e altri flagellati
Daniele Crotti

16.30 Diagnosi di *Entamoeba histolytica/dispar* e altre amebe
Francesco Bernieri

17.00 Diagnosi delle infezioni da coccidi
Annibale Raglio

17.30 Fine della seconda giornata

18 Ottobre 2023

Parassitosi ematiche e del sistema reticolo endoteliale

14.30 Malaria: aspetti pre analitici, metodologie e tecniche diagnostiche
Francesco Bernieri

15.30 Babesiosi
Daniele Crotti

15.50 Leishmaniasi: tecniche e metodologie diagnostiche
Annibale Raglio

16.30 Diagnosi delle infezioni da Filarie
Francesco Bernieri

17.00 Diagnosi delle Tripanosomiasi africana e americana
Annibale Raglio

17.30 Chiusura del corso

Leishmaniasi: tecniche e metodologie diagnostiche

Lucian Petrullo, Annibale Raglio, Stefania Varani

Conflitto di interessi

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

Si ricorda il divieto di registrare, filmare o fotografare

La Leishmaniosi: Un esempio di quanto è essenziale il concetto di One Health

- **Medici** per riconoscere e trattare le forme cliniche umane (CL/VL)
- **Veterinari** per riconoscere e trattare le forme cliniche animali
- **Biologi / Tecnici di Lab.** per ottimizzare i laboratori di ricerca
- **Entomologi** per monitorare i vettori
- **Esperti di Selvatici** per individuare i serbatoi non antropizzati
- **Ecologisti** per responsabilizzare le autorità sanitarie ai principi di igiene pubblica
- **Epidemiologi** per delineare le strategie di sorveglianza
- **Media** per informare sui rischi e la prevenzione

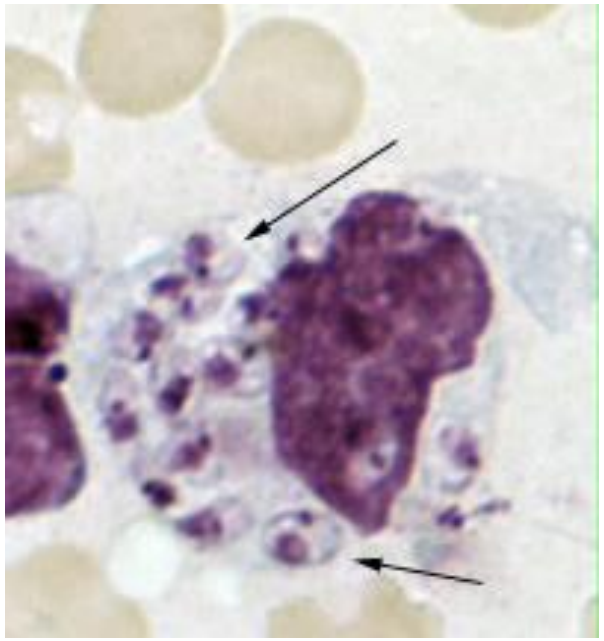
Leishmaniasi

Antropozoonosi causate da protozoi del genere *Leishmania*

Riserve animali cani e canidi

Vettore piccoli ditteri ematofagi:

flebotomi o pappataci



Leishmania spp protozoo flagellato,

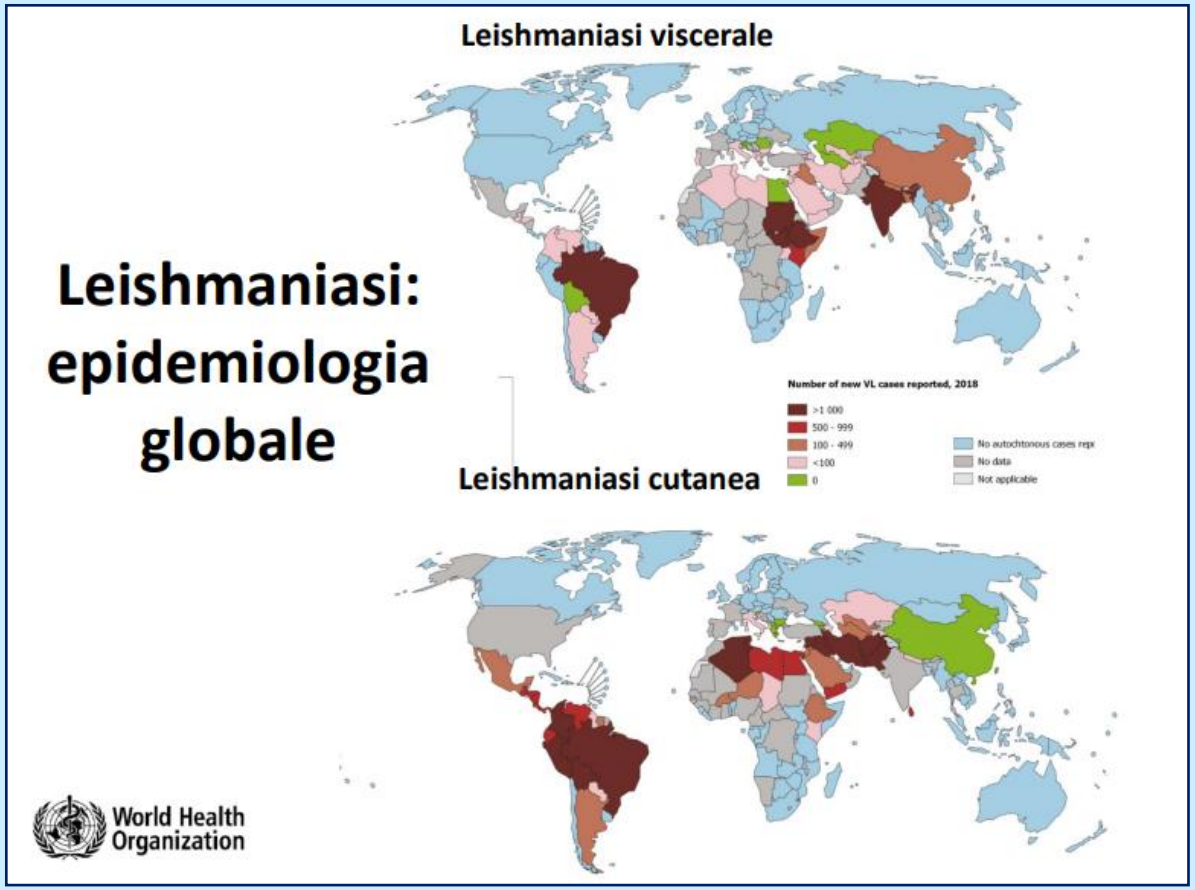
ordine Kinetoplastida,

famiglia Trypanosomatidae,

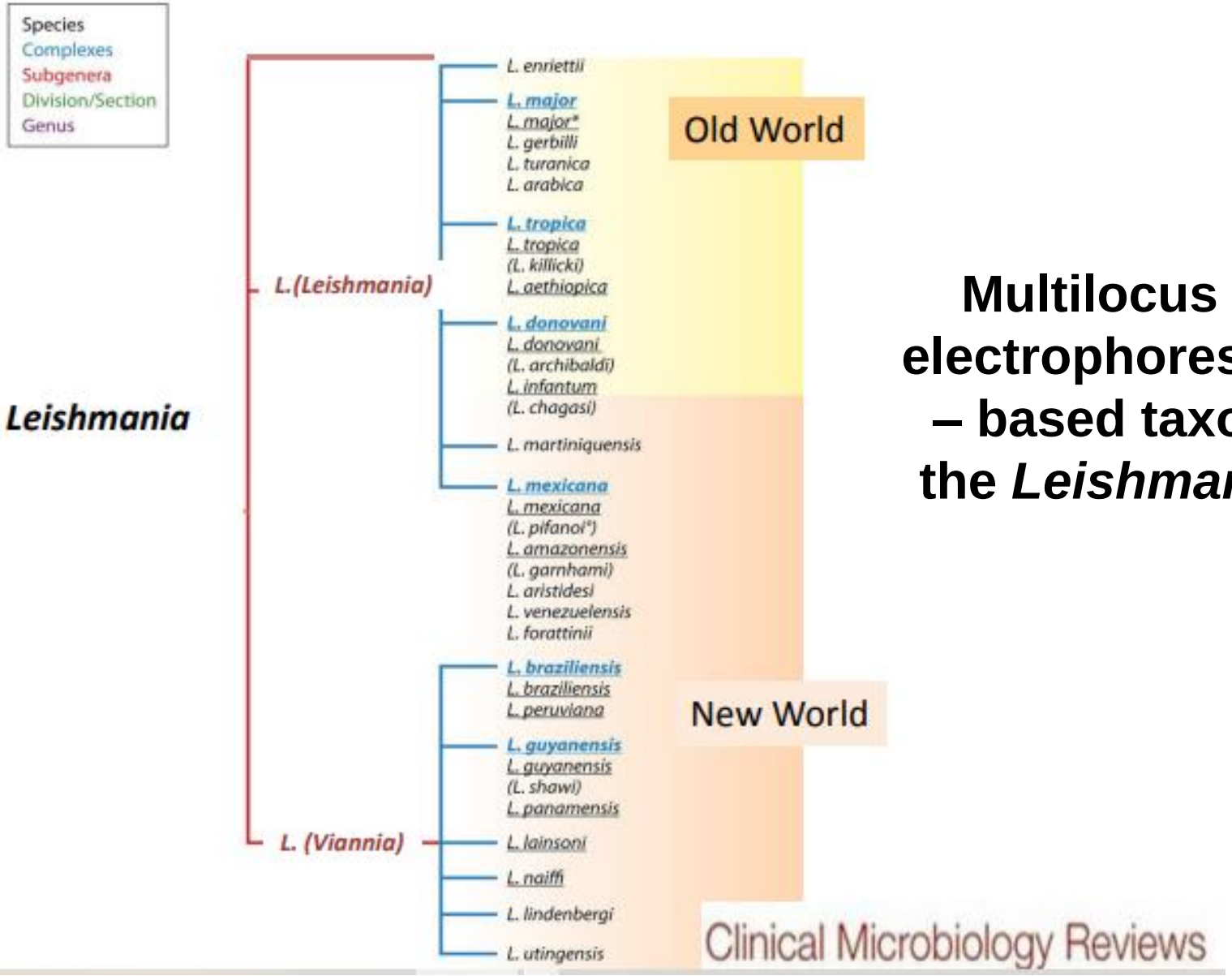
genere Leishmania,

sottogenere Leishmania (Vecchio Mondo) e Viannia (Nuovo Mondo)

Le Leishmanie: Epidemiologia

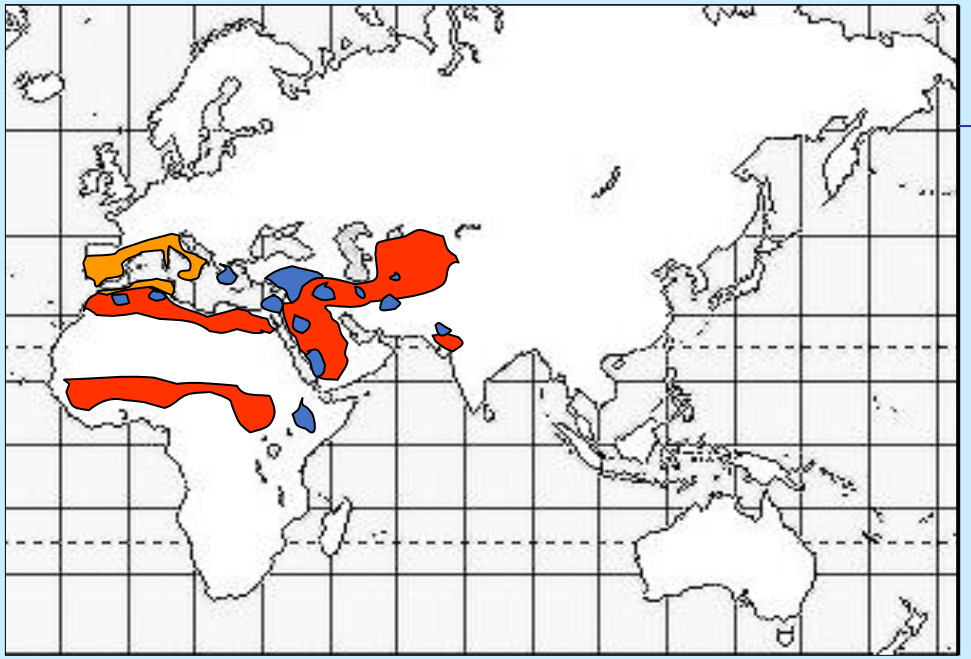


Le Leishmanie - Tassonomia



Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) – based taxonomy of the *Leishmania* genus

Entità nosogeografiche di Leishmaniosi



Entità nosogeografiche di LC nel Vecchio Mondo

- LC Antroponotica (*L.tropica*)
- LC Zoonotica (*L.major*)
- LC Sporadica (*L.infantum*)

Entità nosogeografiche di LC e LCM nel Nuovo Mondo

Agenti principali

- *L.peruviana*
- *L.mexicana*

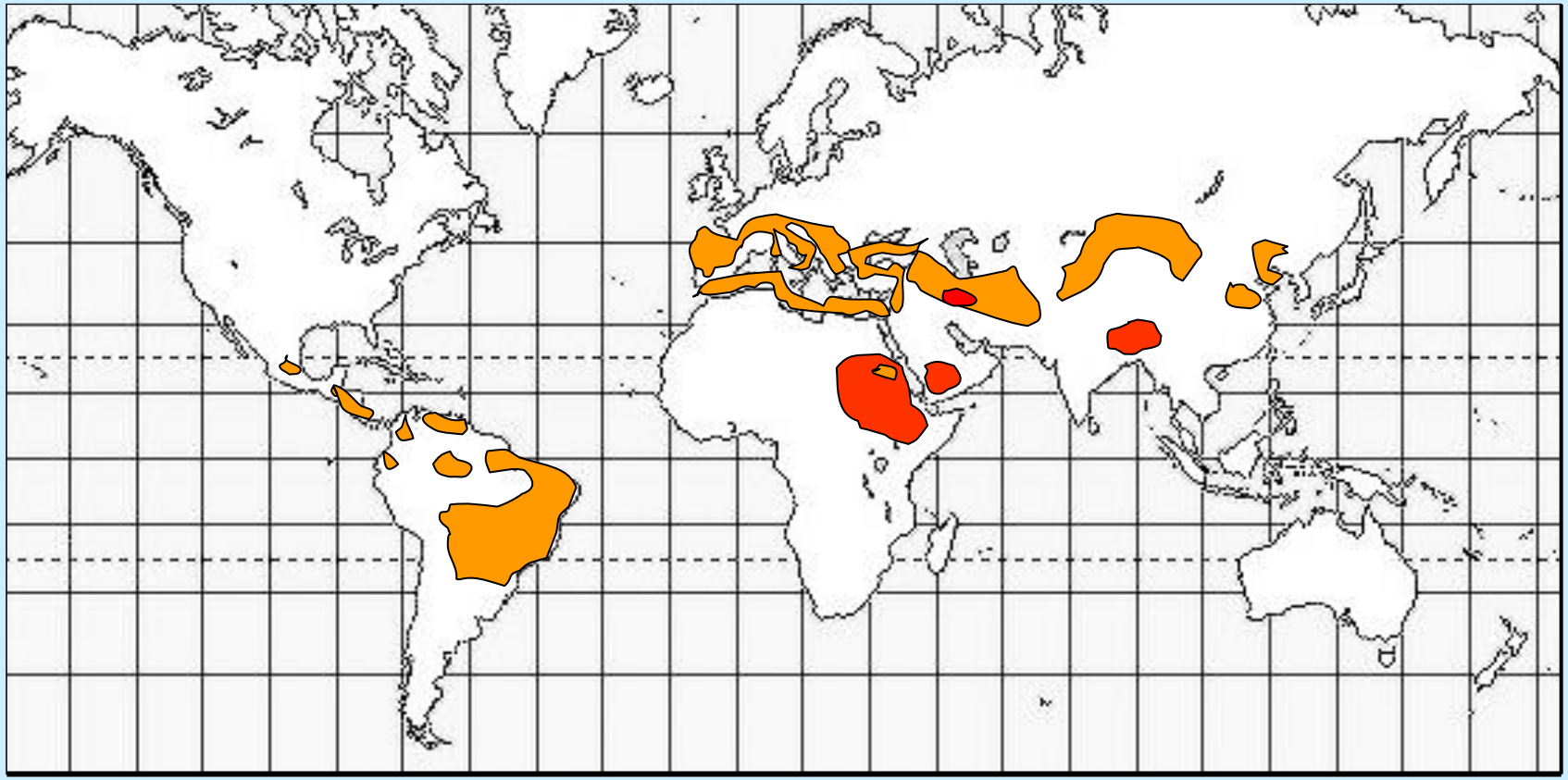
LC

- *L.guyanensis*
- *L.braziliensis*

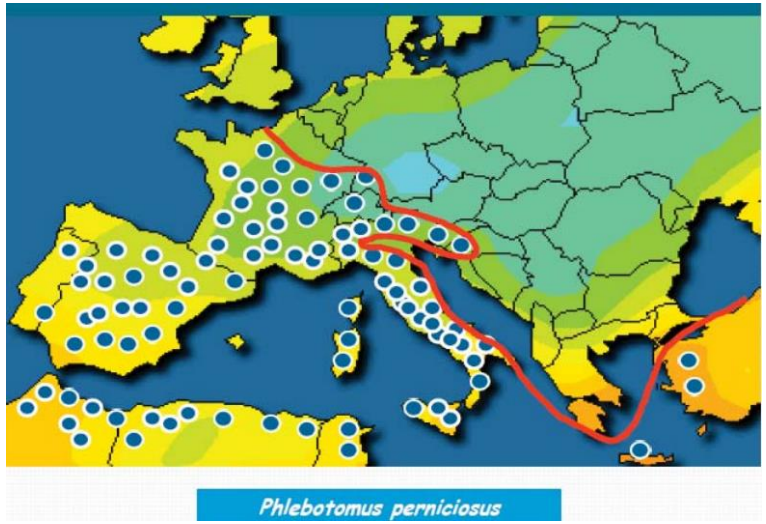
LC + LCM

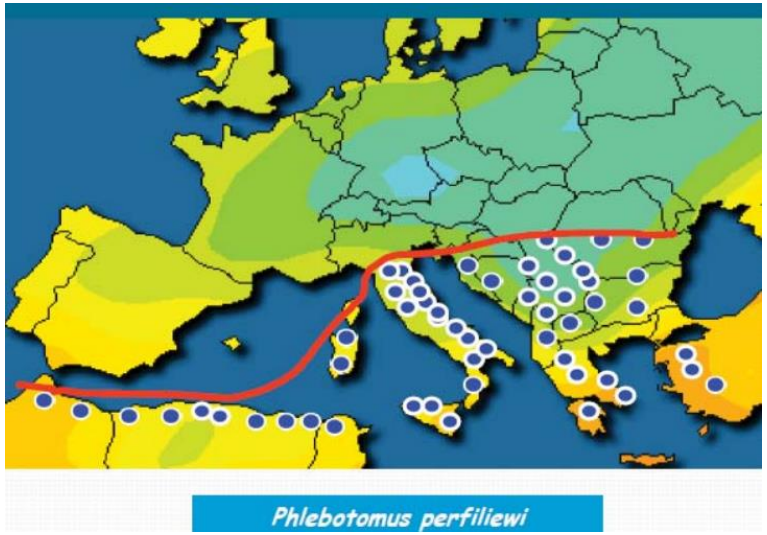
Entità nosogeografiche di Leishmaniosi Viscerale

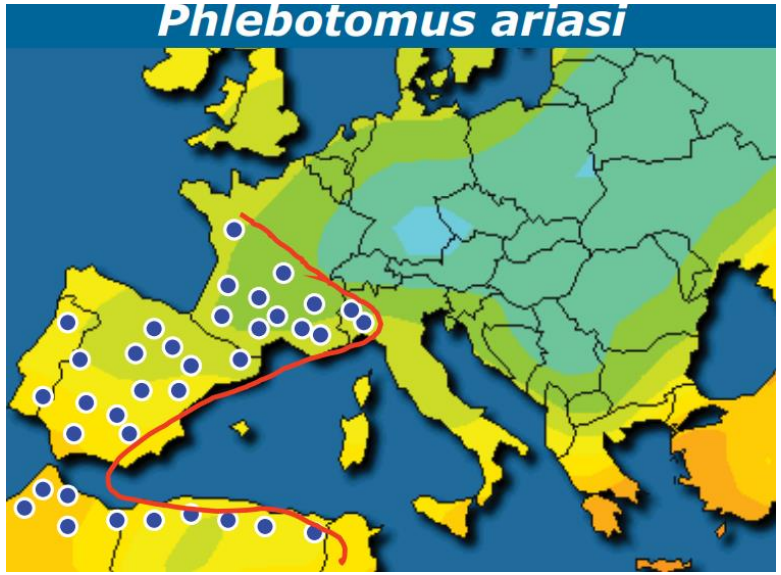
- **LV Antroponotica (*Leishmania donovani*)**
- **LV Zoonotica (*Leishmania infantum* – sin.: *L. chagasi*)**

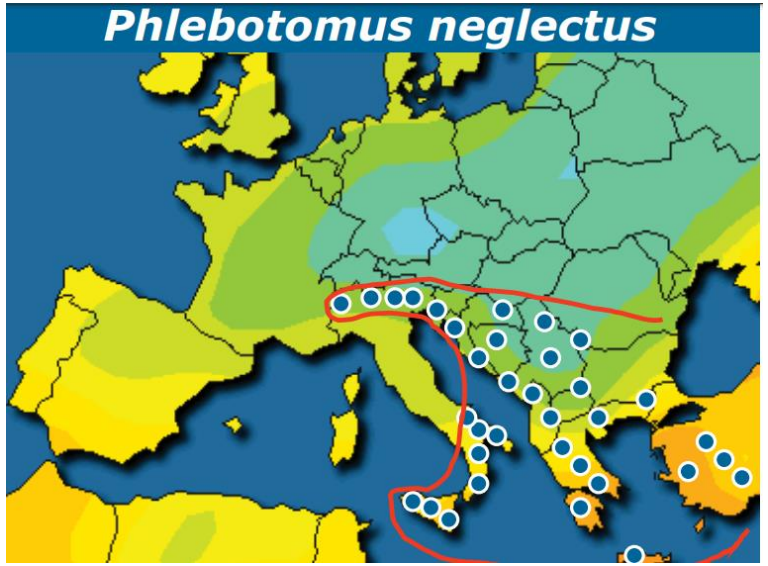


Leishmaniosi Viscerale – Vettori – Europa - Italia









1999: catturati per la prima volta 4 flebotomi (*P.mascittii*, vettore non provato di *Leishmania*)

2001: Prima cattura di *P.perniciosus*

Dal 1991 al 2008:

11 casi di leishmaniosi (uomo, cane, gatto e cavallo, alcuni reputati autoctoni e altri probabili)

Parasitol Res (2008) (Suppl 1) 103:S65–S68

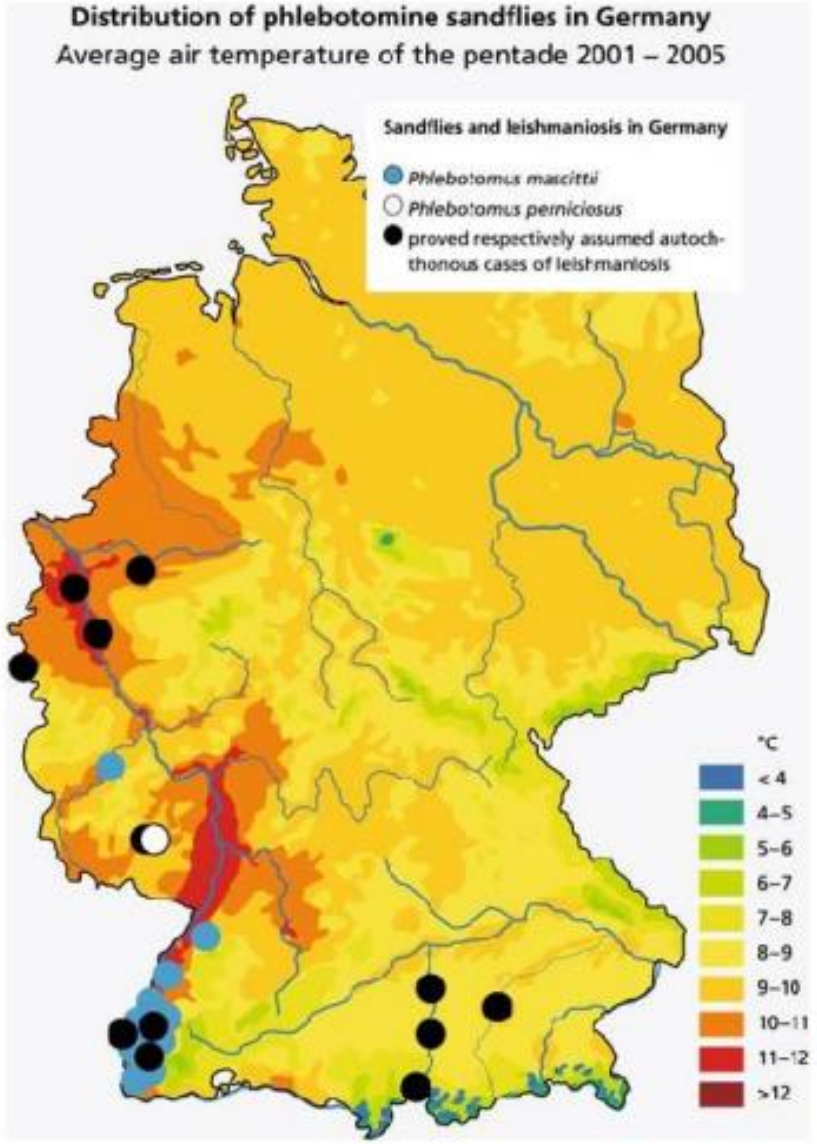
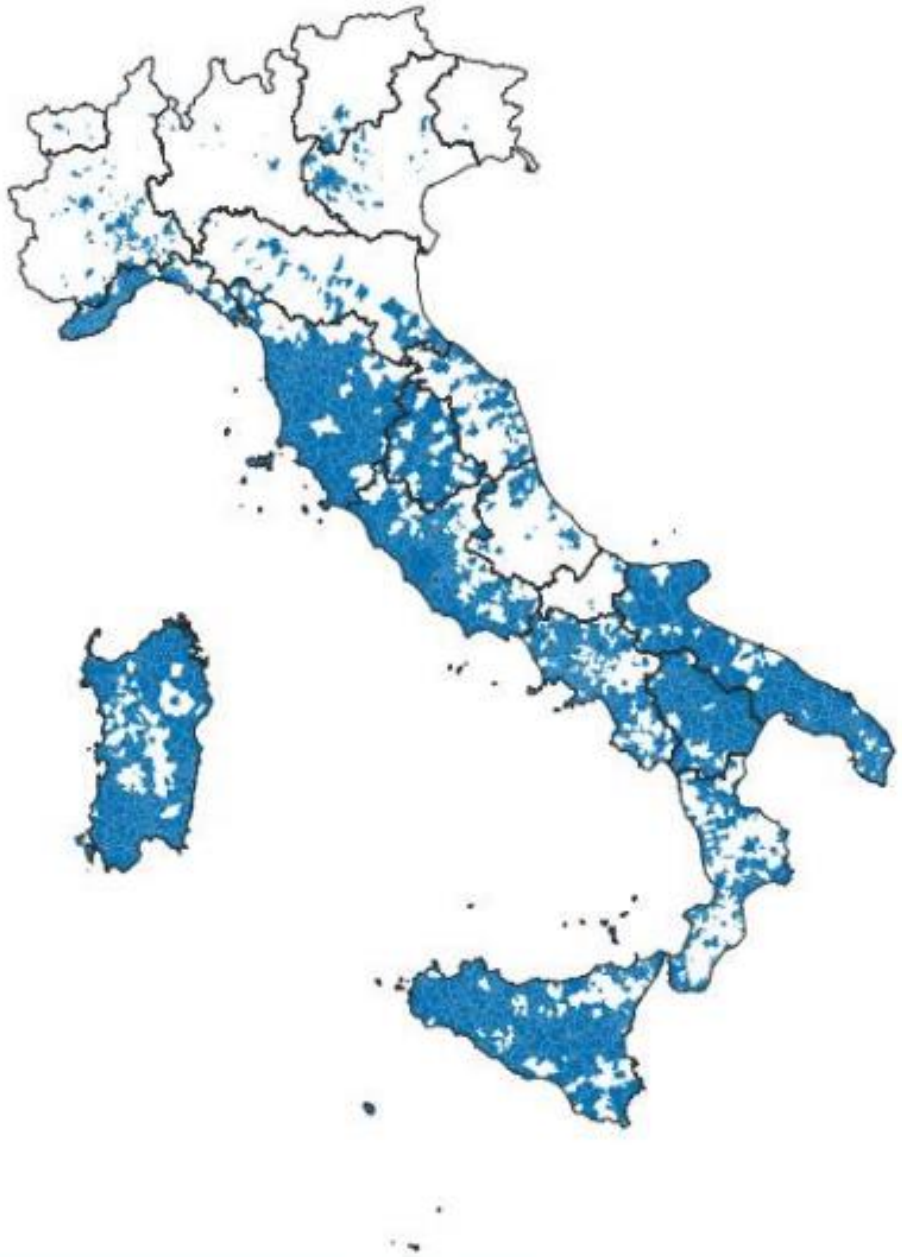


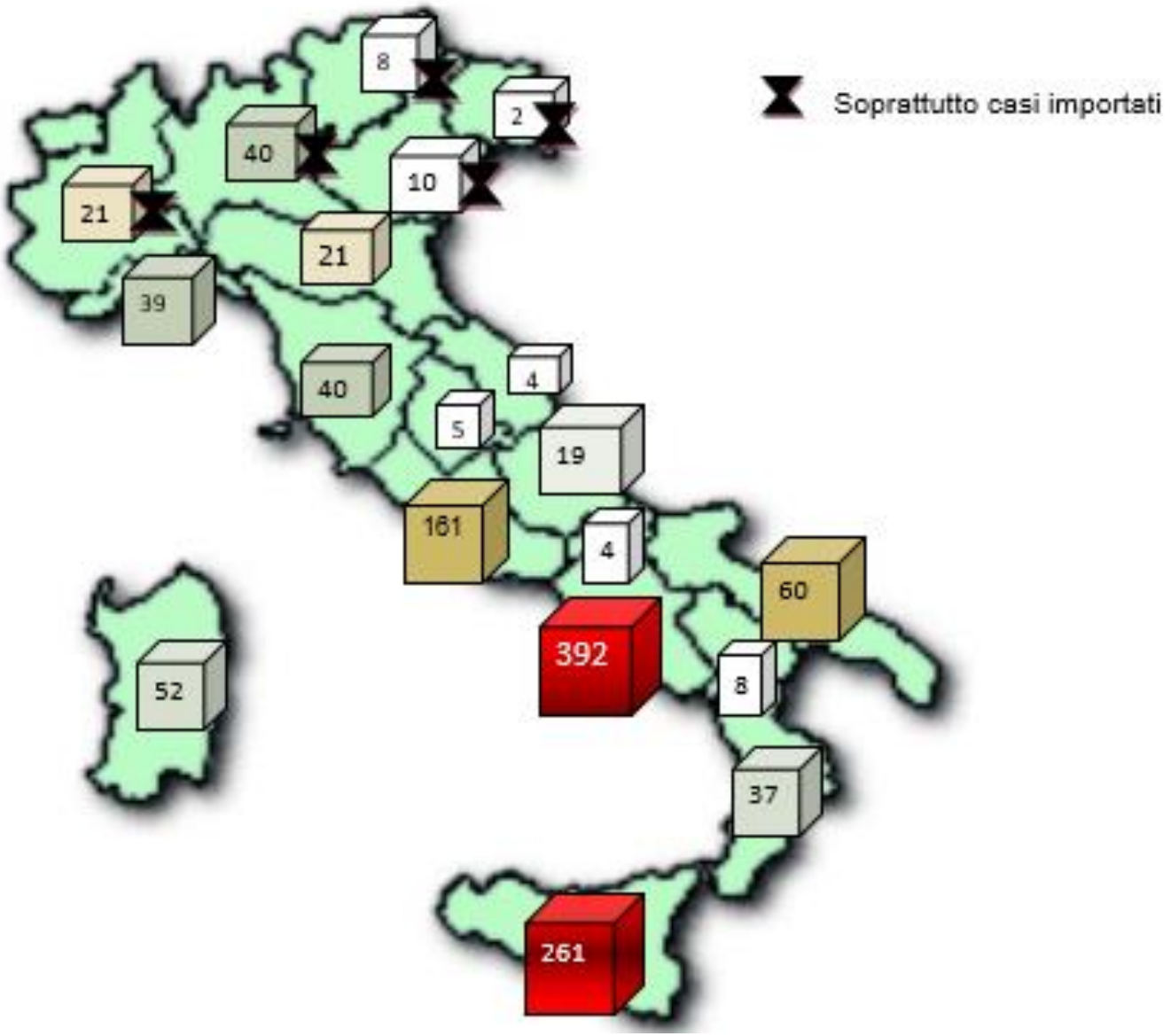
Fig. 2 Climates (German meteorological service), distribution of sandflies and of autochthonous cases of leishmaniasis in Germany

communes (in blue) where autochthonous cases of canine leishmaniasis have been recorded, Italy, 2005–2012



Mus spretus (topo algerino), *Apodemus sylvaticus* (topo europeo), *Rattus rattus* (ratto), *Rattus norvegicus* (ratto), *Meles meles* (tasso europeo), *Martes martes* (martora), *Mustela nivalis* (donnola), *Geneta geneta (genette)* e *Vulpes vulpes* (volpe)

Incidenza della Leishmaniosi Viscerale Umana - 1998-2012 tot: 1196 casi (ISS)



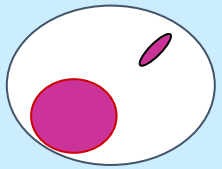
Le Leishmanie - Biologia

Le leishmanie sono parassiti asessuati, dixeni trasmessi all'uomo da insetti ematofagi.

I morfotipi descritti in Leishmania sono due:

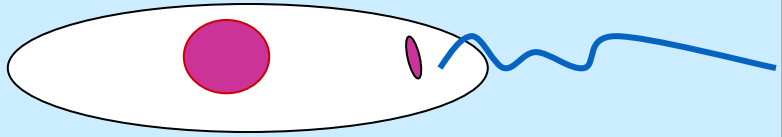
Amastigote - ospite vertebrato

Corpo rotondeggiante 2-5µ, nucleo, kinetoplasto, senza flagello esterno



Promastigote – ospite invertebrato

Corpo allungato 15µ, kinetoplasto davanti al nucleo, flagello che emerge in posizione anteriore

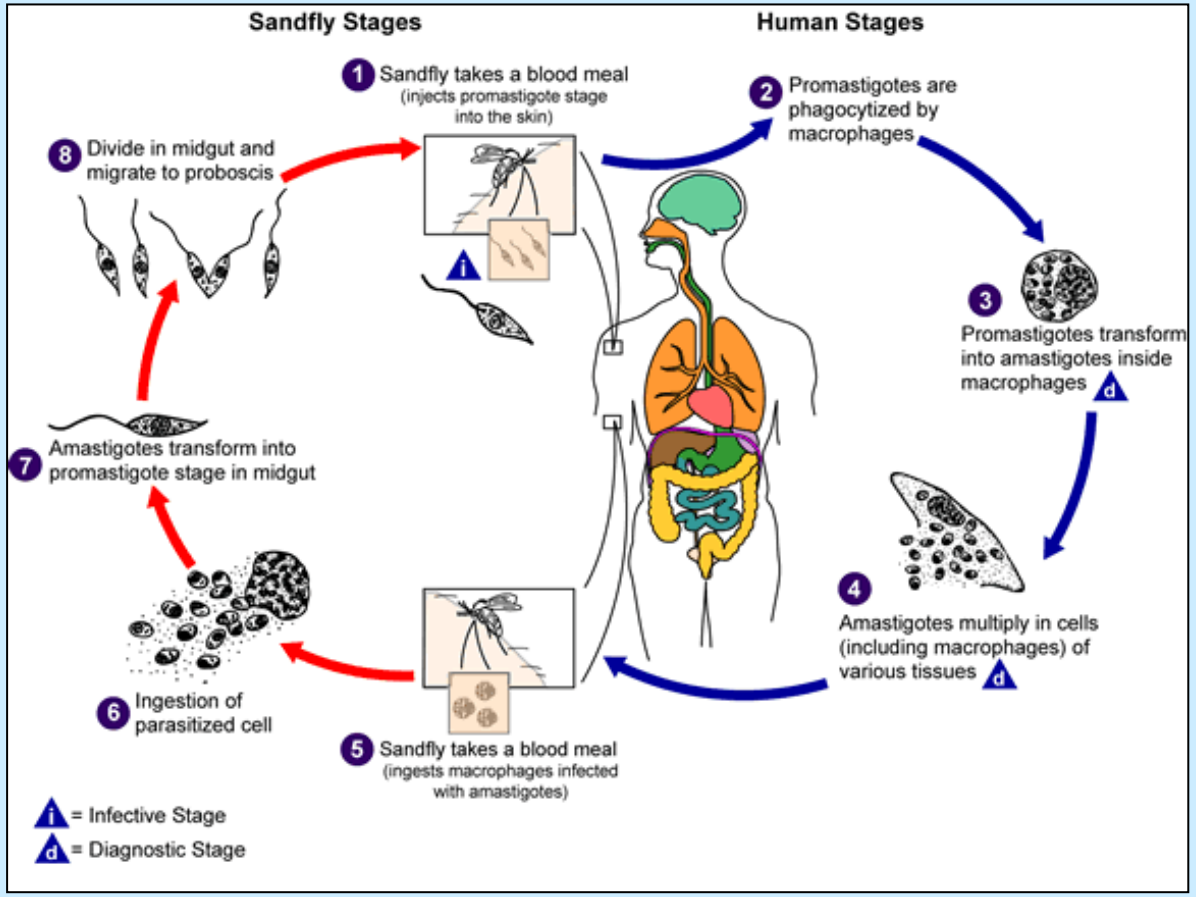


I due morfotipi posseggono antigeni di superficie diversi

Le Leishmanie - Biologia

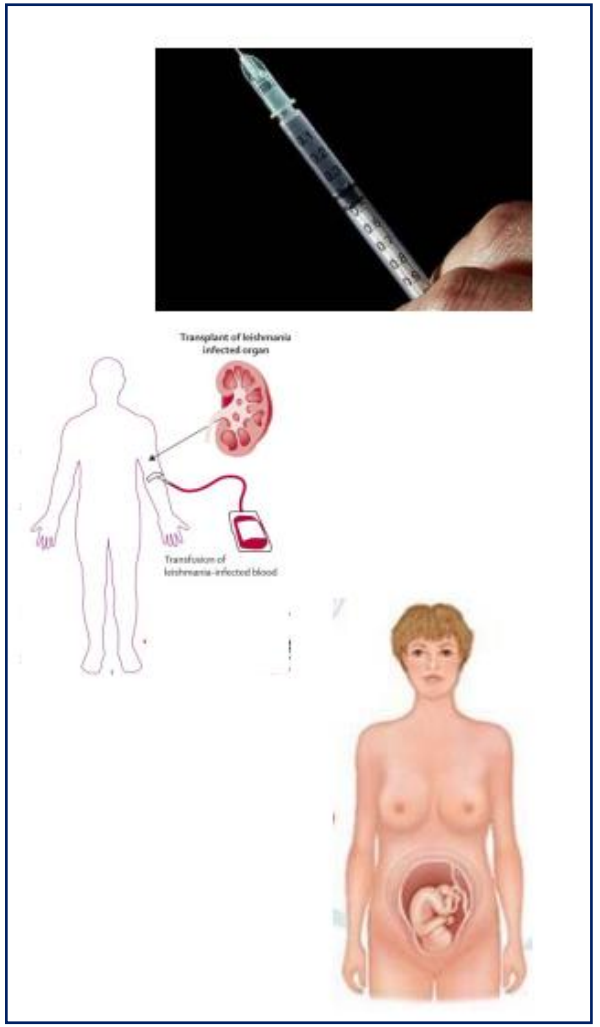
Le leishmanie compiono il loro ciclo biologico in due ospiti:

1. **Ospite invertebrato: flebotomo (promastigoti liberi nel canale alimentare)**
2. **Ospite vertebrato: mammifero (amastigoti endoparassiti delle cellule del SRE)**



La Leishmaniosi Viscerale: PATOLOGIA

- Tossicodipendenti che utilizzano droghe endovena (condivisione di aghi infetti; ciclo di trasmissione antroponotica di *L.infantum*)
- Trapianto d'organo
- Trasfusioni di sangue: trasmissione rara, utile leucodeplezione *(Cardo et al. Trasfusion 2006)*
- Trasmissione verticale (da madre con leishmaniosi viscerale/infezione asintomatica)



Diagnosi di Leishmaniasi Viscerale Zoonotica LVZ da *L. infantum*

Esami diretti	Esami indiretti
Es. microscopico	IFAT
Es. colturale	ELISA-CLIA
Tecniche molecolari (ibridazione in *situ*, PCR)	IB
	ICT-rK39Ag

Esame microscopico

Esame al m.o. a 100X di strisci sottili di:

1) **Lesione cutanea**
2) **Lesione cutaneo-mucosa**

- **Il campione biologico deve essere raccolto sotto i margini dell'ulcera, viene in parte strisciato su vetrini ed in parte raccolto in provette con EDTA per l'allestimento della coltura**
- **Almeno 4 vetrini**
- **Colorazione secondo Giemsa**
- **I test sierologici non danno risultati ottimali (IB)**

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti

Esame microscopico

Esame al m.o. a 100X di strisci sottili di:

1) **Aspirato splenico**: **sensibilità 93-99%,** rischio di emorragie spleniche o perforazione intestinale
2) **Aspirato midollare: sensibilità: 53-86%**
3) **Biopsia epatica**
4) **Linfonodo ingrossato: sensibilità 60%**
5) **Sangue periferico (buffy coat) in pazienti Hiv+**

- **Il campione biologico viene in parte strisciato su vetrini ed in parte raccolto in provette con EDTA per l'allestimento della coltura**
- **Almeno 4 vetrini**
- **Colorazione secondo Giemsa**

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti

Esame microscopico

- **La diagnosi di certezza si fonda sulla messa in evidenza del parassita nell'adatto campione biologico.**

- **Amastigoti: piccoli corpi rotondo-ovoidali di 2-4 µm, con nucleo e chinetoplasto bastoncellare colorati in porpora scuro, visibili in piccoli gruppi all'interno dei macrofagi od isolati in seguito alla rottura delle cellule.**

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti

6+	**Oltre 100 amastigoti per campo**
5+	10-100 amastigoti per campo
4+	1-10 amastigoti per campo
3+	1-10 amastigoti per 10 campi
2+	1-10 amastigoti per 100 campi
1+	1-10 amastigoti per 1.000 campi
0	Assenza di amastigoti in 1.000 campi

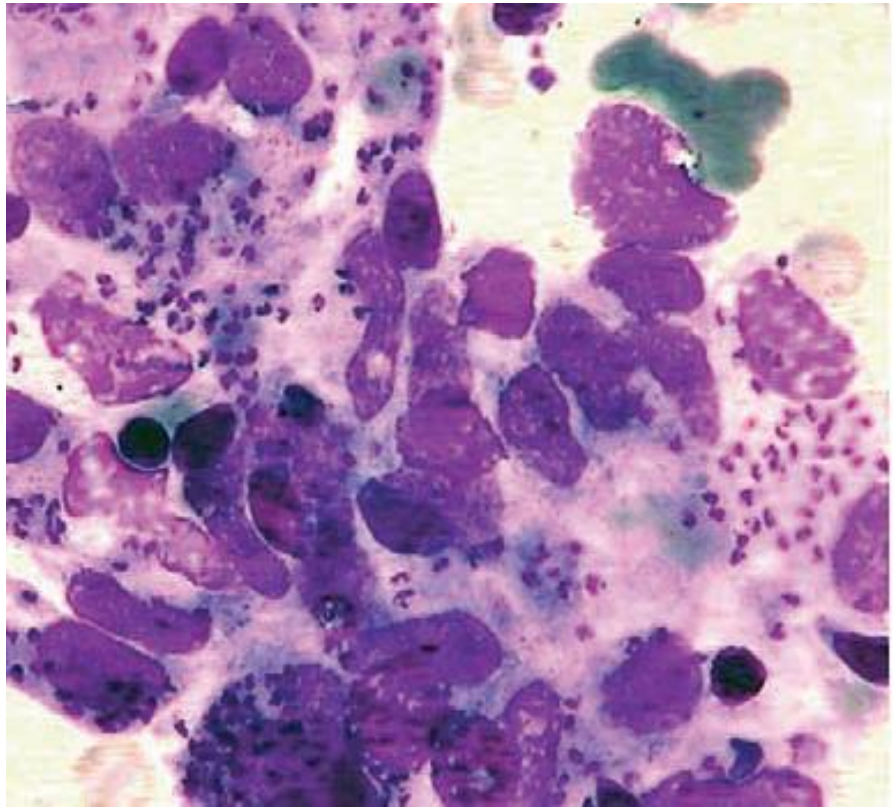
Da Gradoni L *et al*. Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European region. WHO, 2017 (tradotta)

Diagnosi diretta di leishmaniasi viscerale: microscopia/2

- esame microscopico da aspirato splenico: sensibilità 93-99%, ma rischio di emorragie spleniche o perforazione intestinale

- esame microscopico da aspirato linfonodale: sensibilità 60%

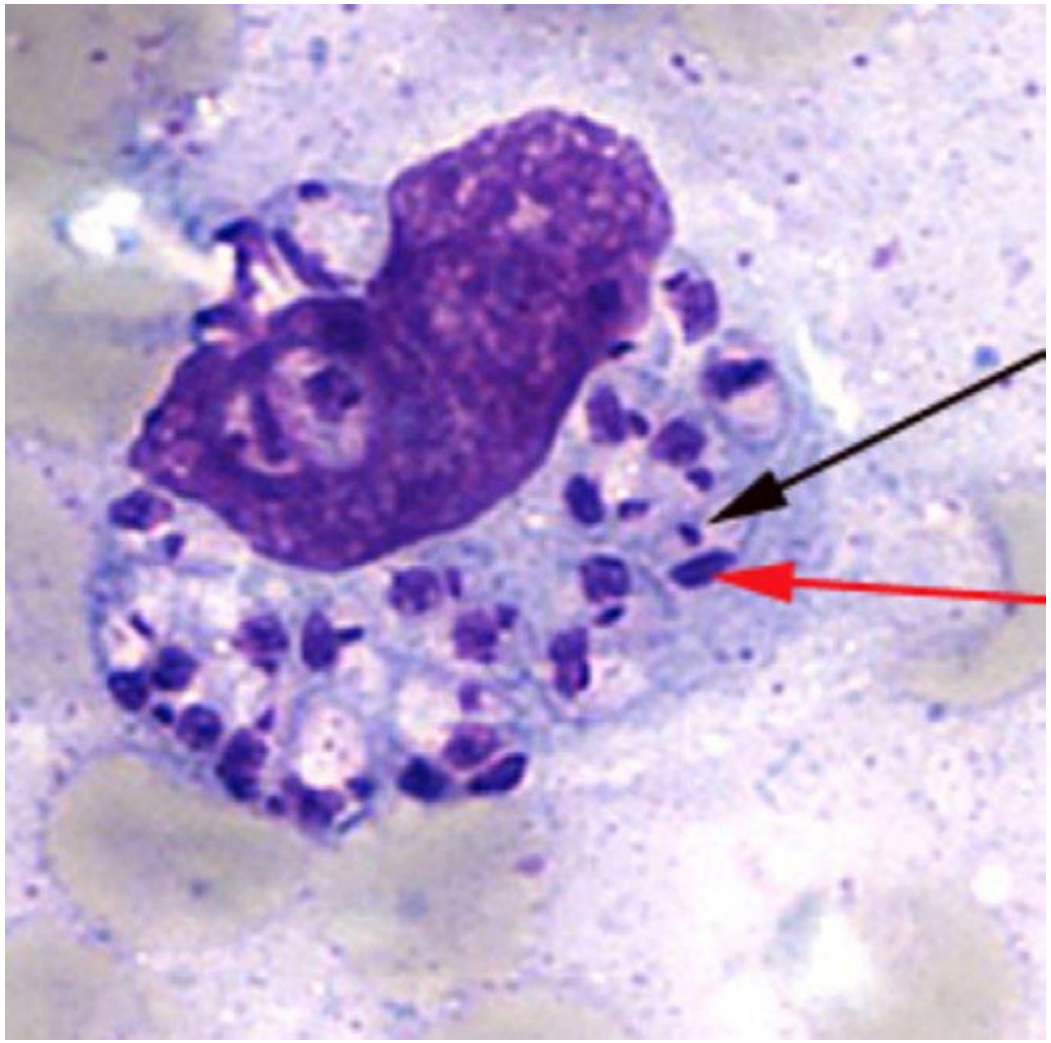
- da sangue periferico dopo leucoconcentrazione in pazienti HIV+

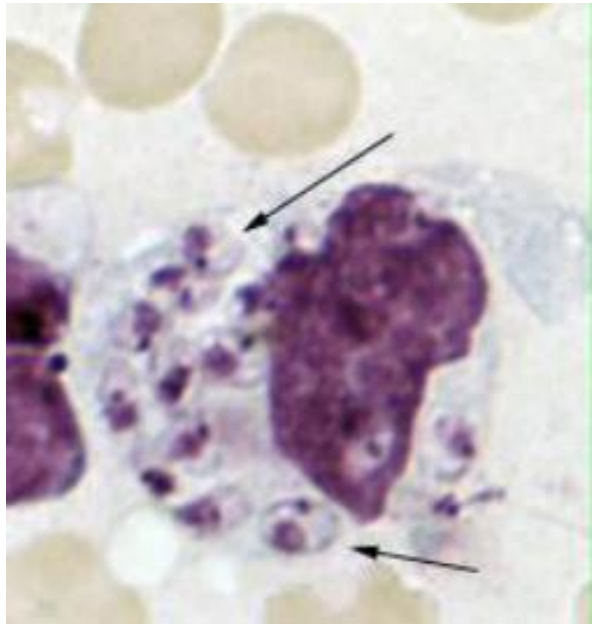


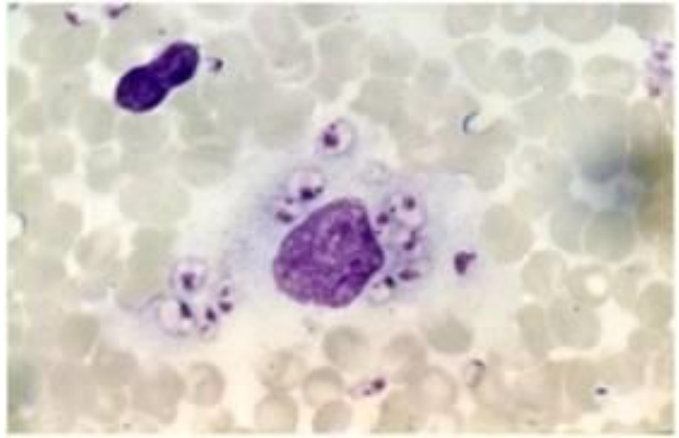
Murray et al. Lancet 2005

Esame microscopico

- Amastigoti



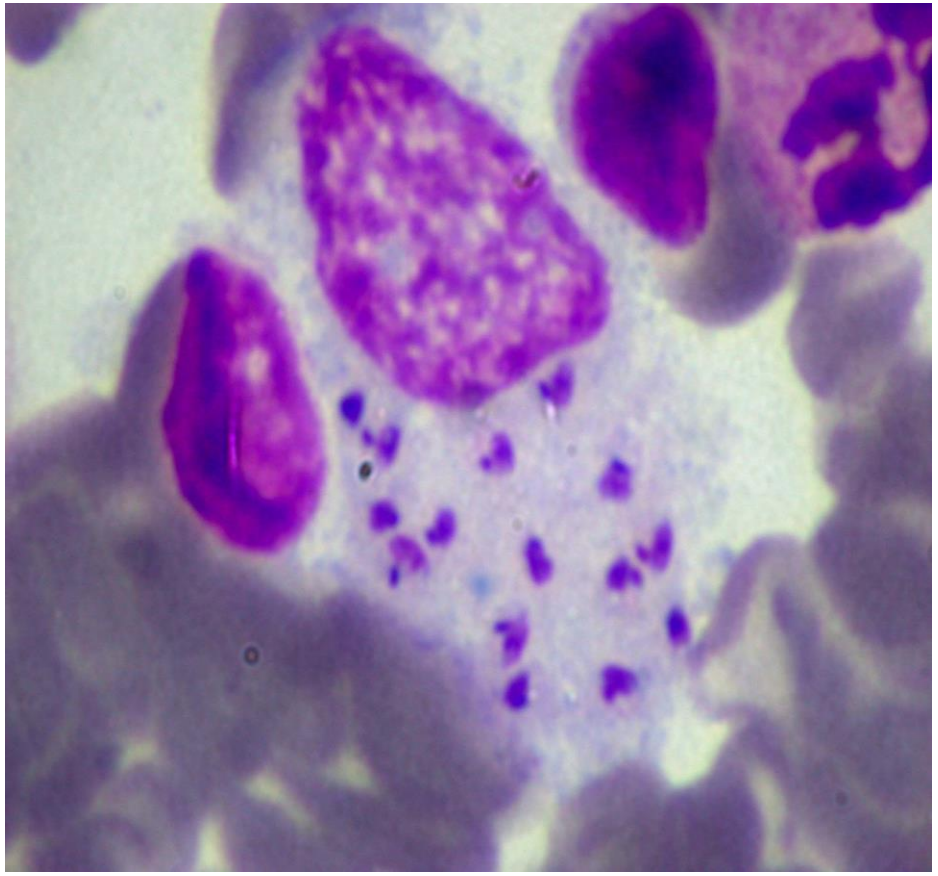




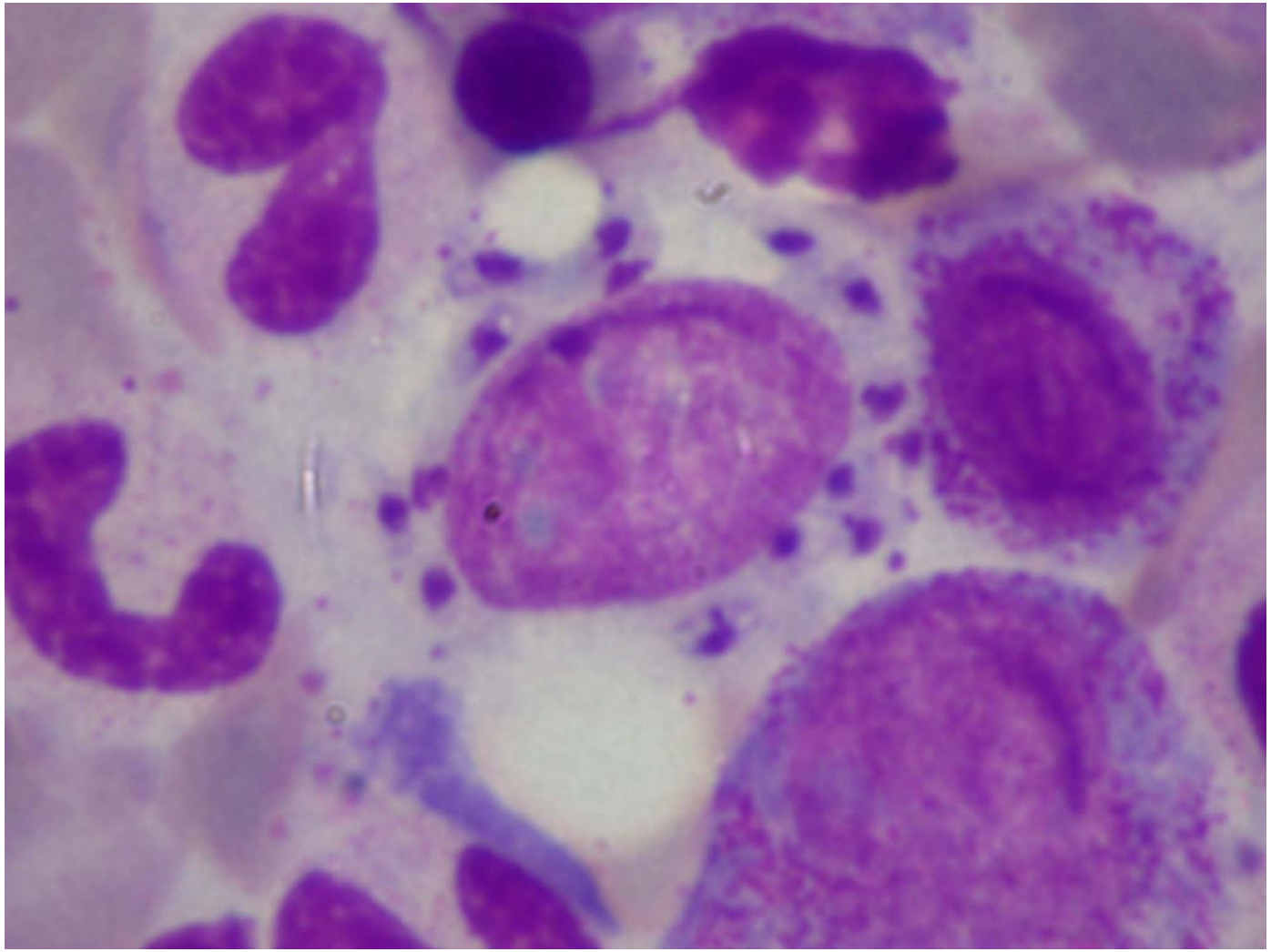
Center for Disease Control, Atlanta

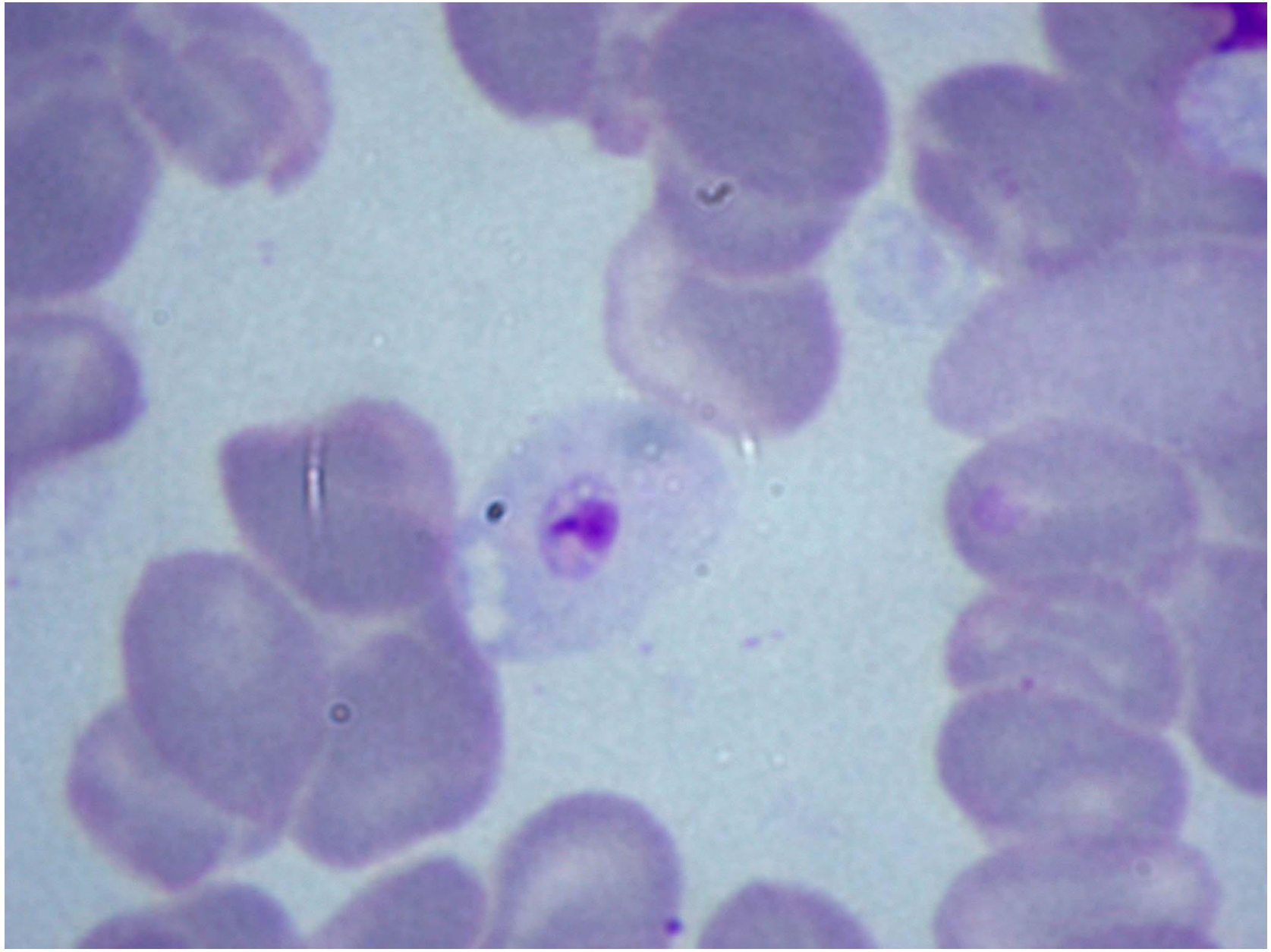
AMASTIGOTI

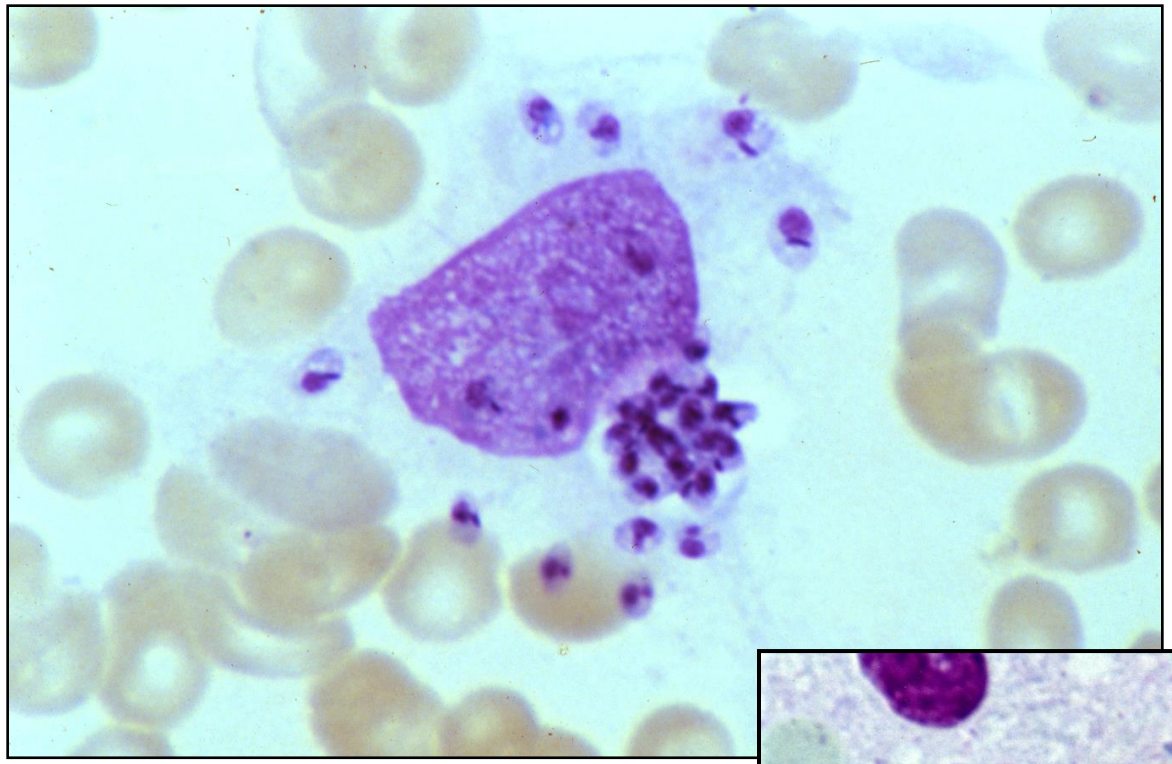
- Le Leishmanie appaiono come corpiccioli rotondeggianti od ovoidali della grandezza di 1.5-4μ con nucleo eccentrico, kinetoplasto bastoncellare affianco al nucleo, entrambi colorati in rosso violaceo e con citoplasma colorato in azzurro.

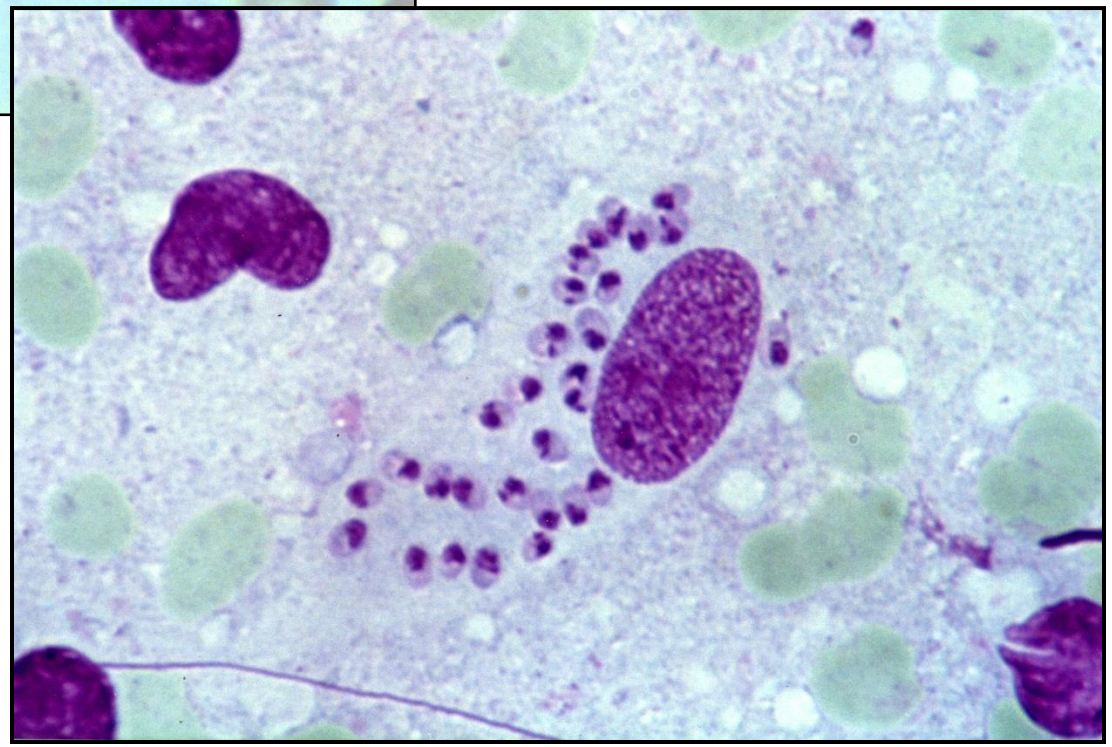


ASPIRATO MIDOLLARE

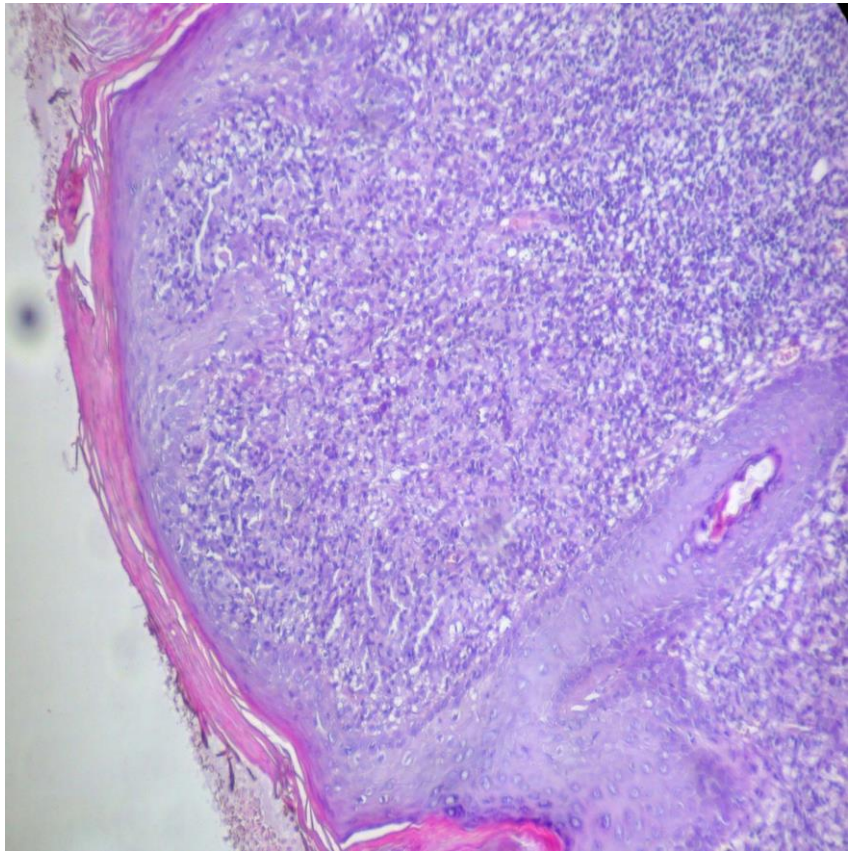






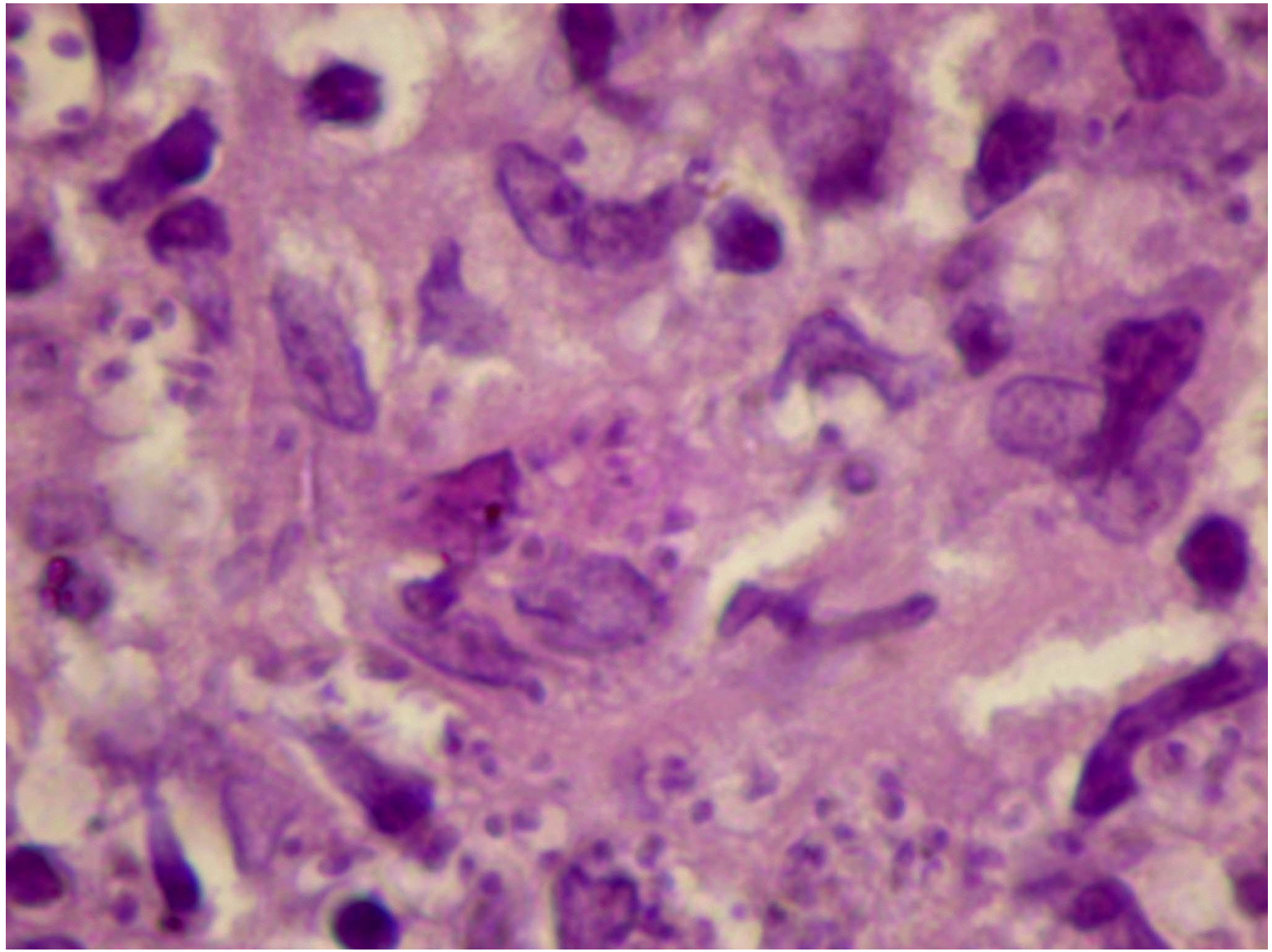


Aspirato linfonodale



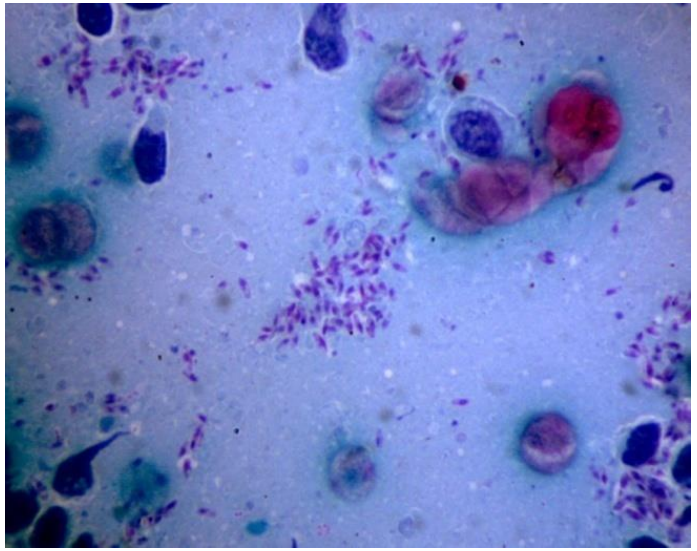
- L'aspirato linfonodale, se di consistenza poco solida, viene solo centrifugato a 2000 giri per 10'
- Il sedimento ottenuto, viene risospeso in un piccolo volume di acqua distillata sterile, e 20µl di questa sospensione vengono posti su ciascun vetrino per le colorazioni e per la coltura.
- Se, invece, è di consistenza solida, come un pezzo di tessuto, si preparano delle "impressioni" su vetrino e si procede con le colorazioni e la coltura.

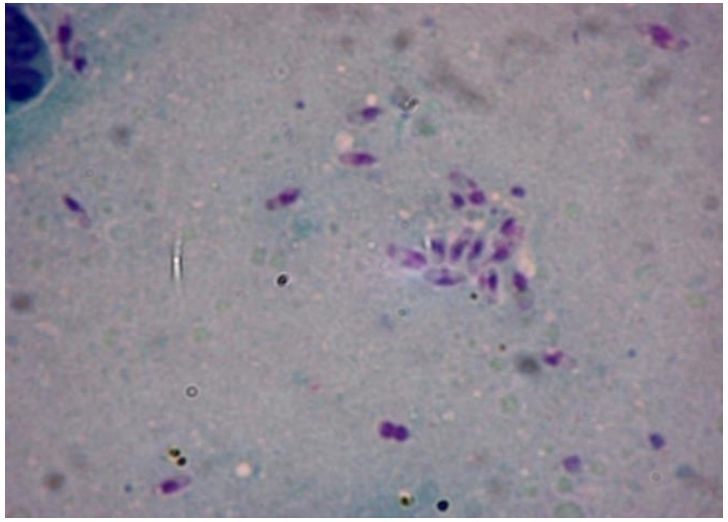
Aspirato linfonodale

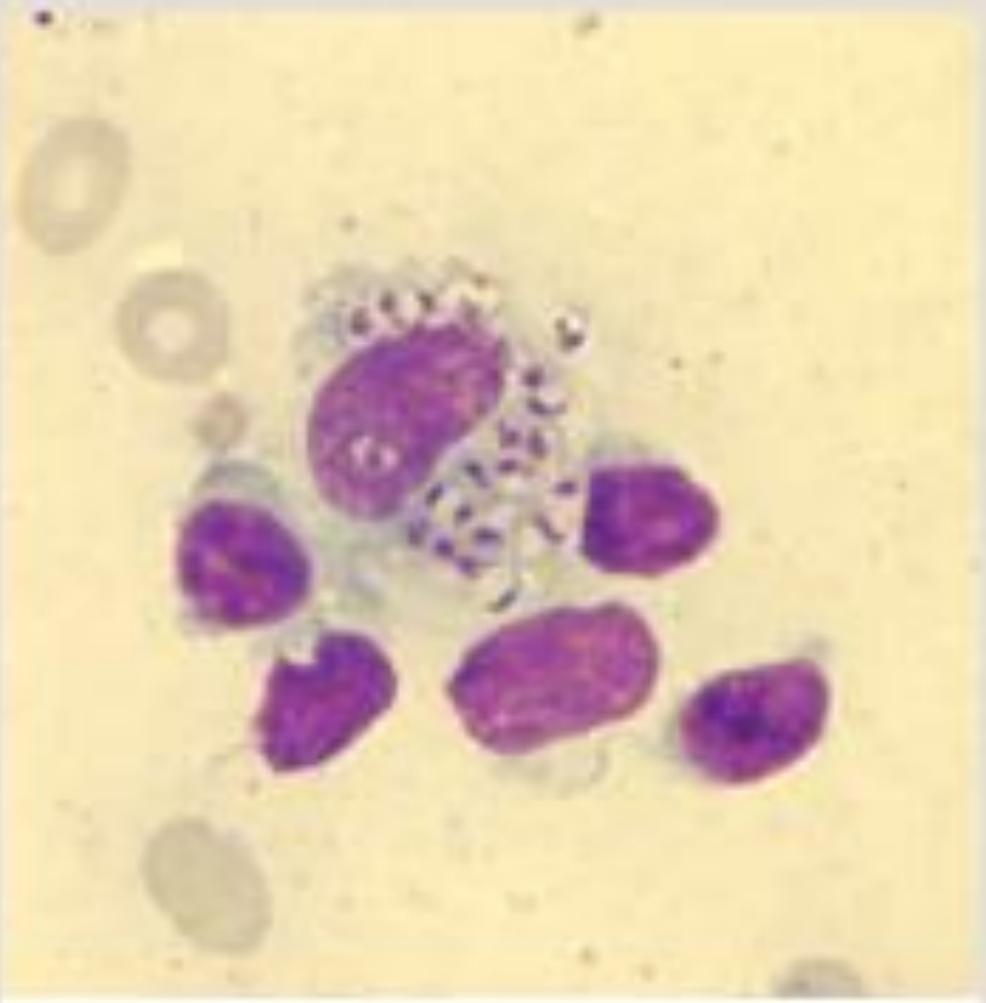


BIOPSATO DUODENALE

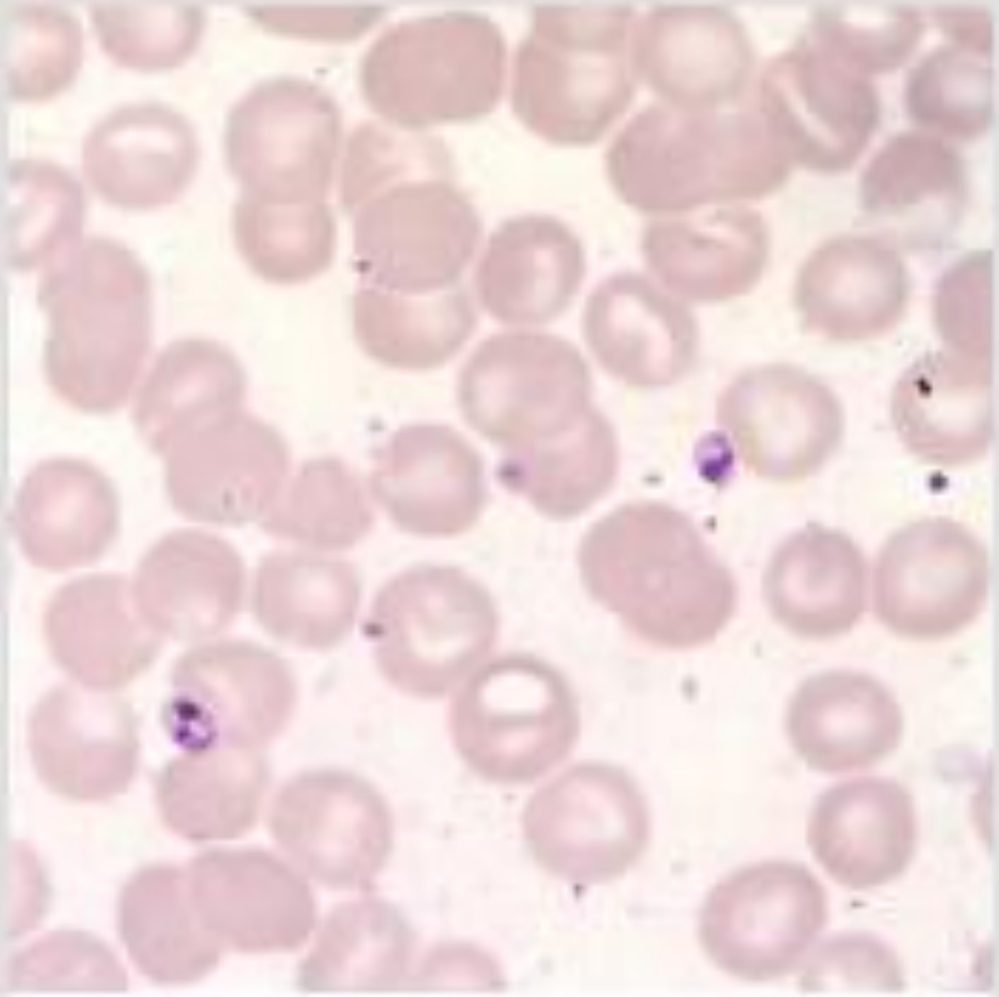
- Nel paziente HIV + la localizzazione delle leishmanie è, atipicamente, nel tratto gastroenterico.
- In questi pazienti, la cui sierologia specifica, spesso, è negativa o, al massimo, positiva a bassi titoli, la diagnosi di Leishmaniasi si fonda sulla ricerca di *Leishmania* nell'adatto campione biologico.
- Il materiale di elezione è l'aspirato duodenale o il biopsato duodenale.



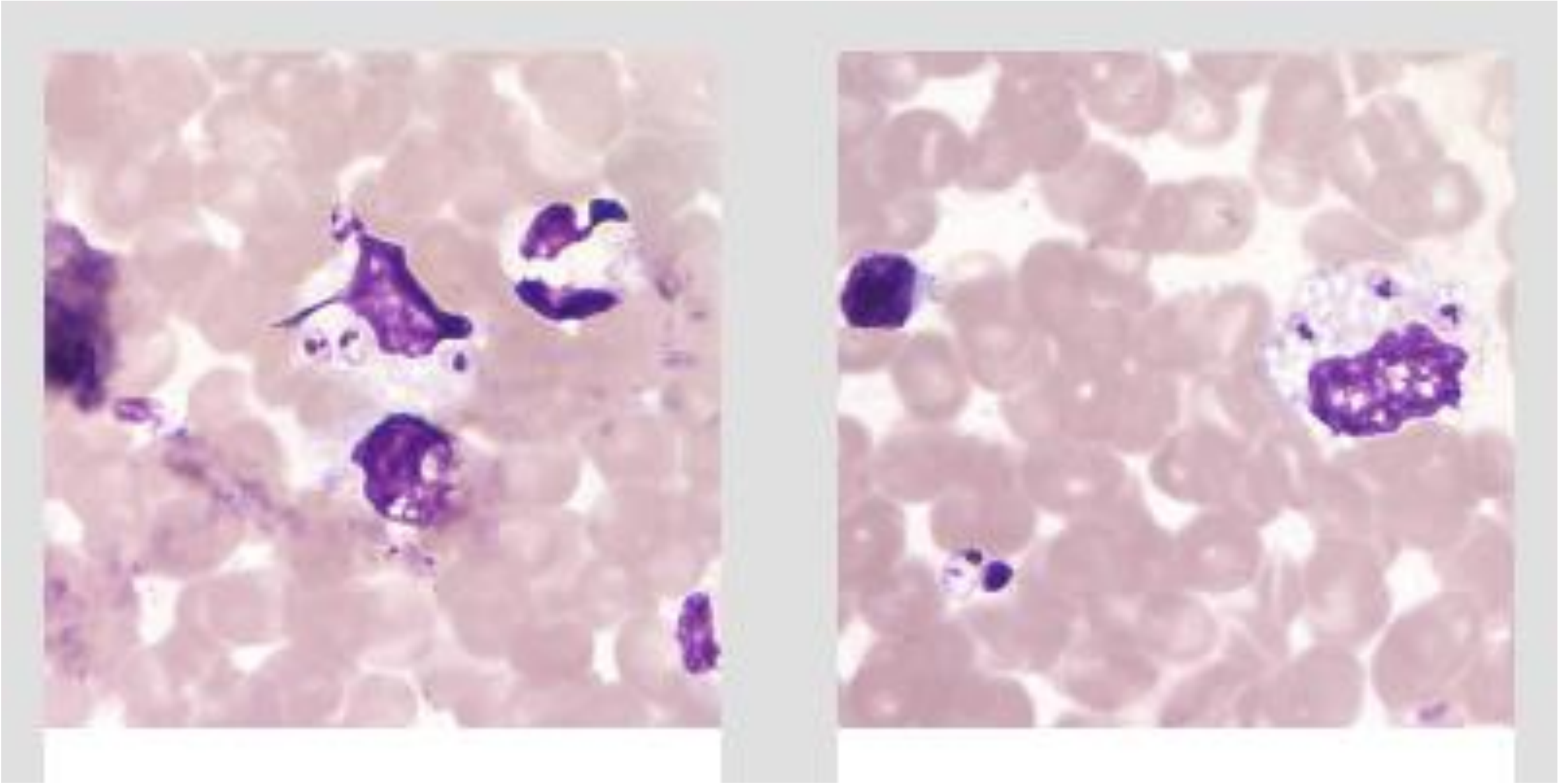




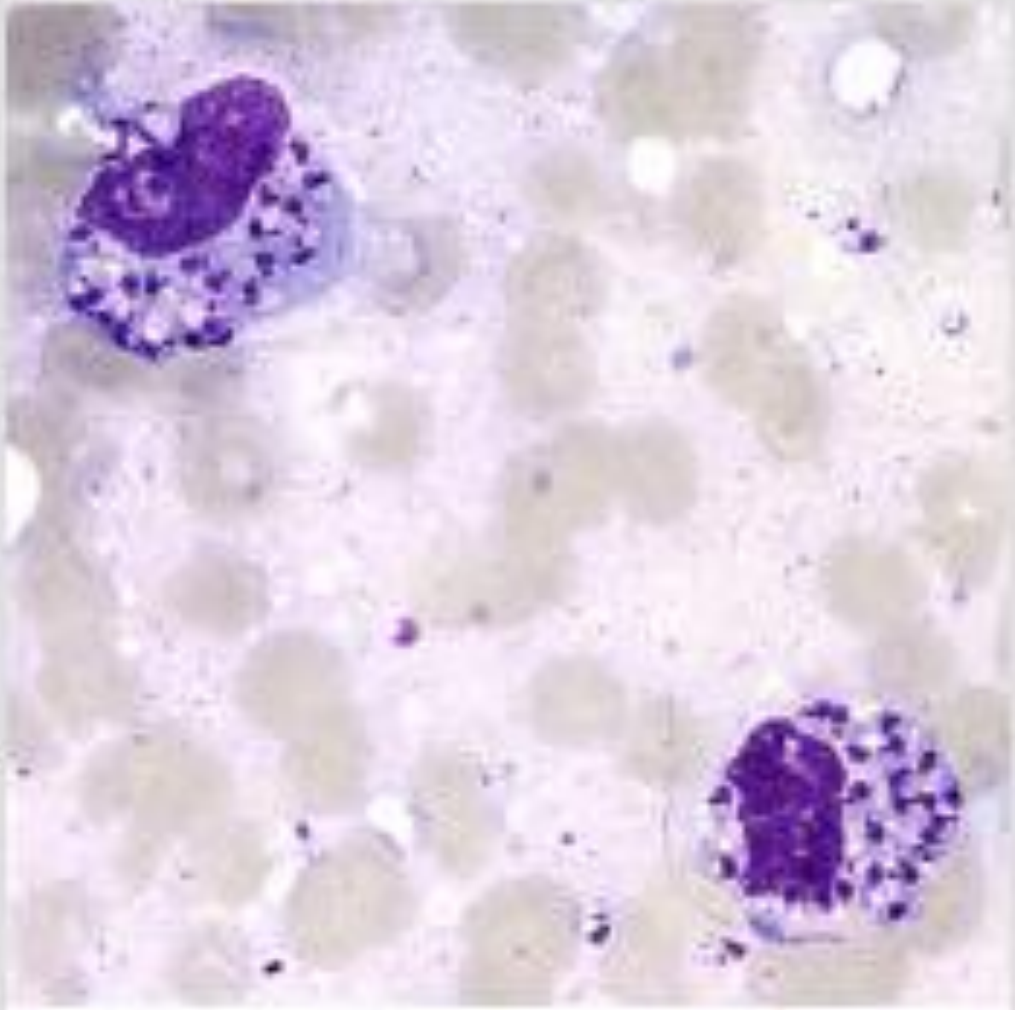
Apposizione Midollo, CDC

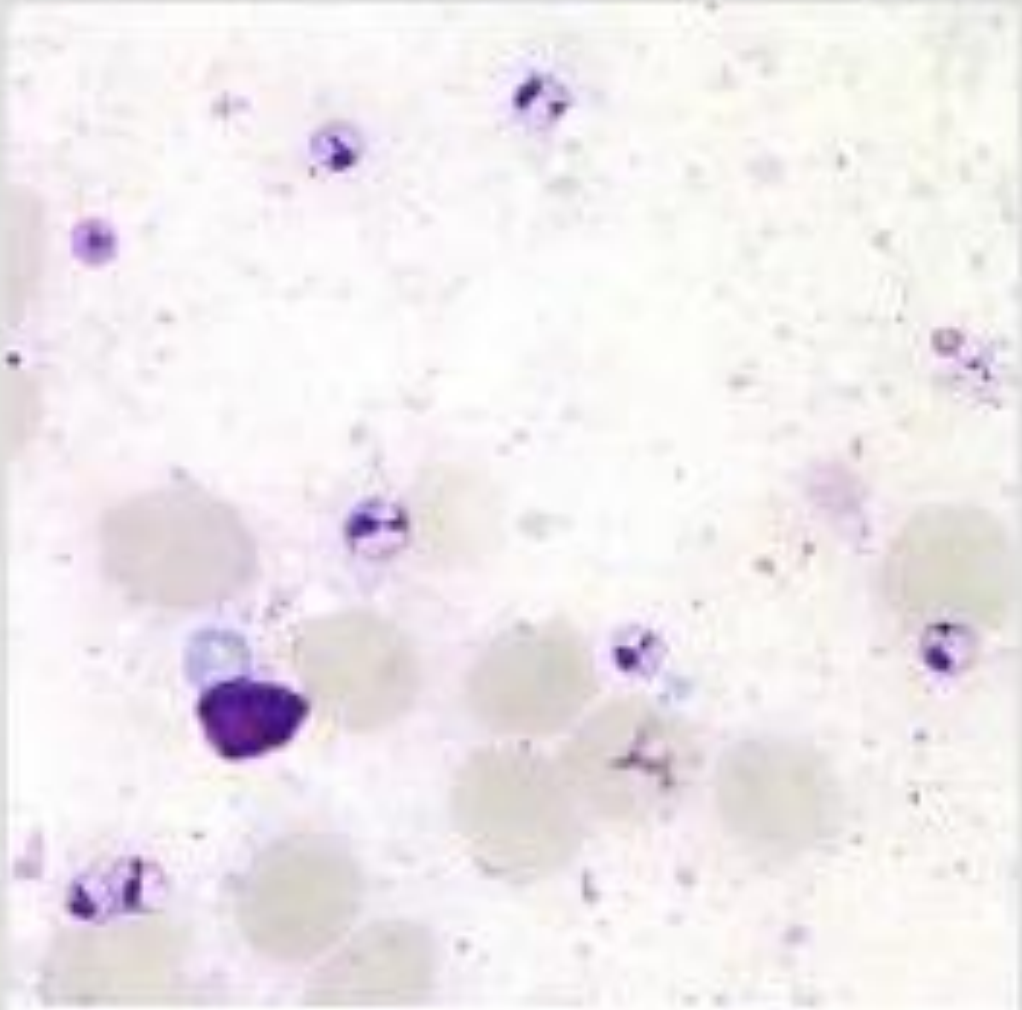


Striscio sangue midollare, CDC



Da scraping tessutale, CDC





Apposizioni Midollo, CDC

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti

Esame colturale

Terreni di coltura:

1) **Evans'Modified Tobie'S Medium (EMTM)**
2) **Sloppy Evans**
3) **Novy-Mc Neal-Nicolle**
4) **Brain Heart Infusion Agar**

Scelta:

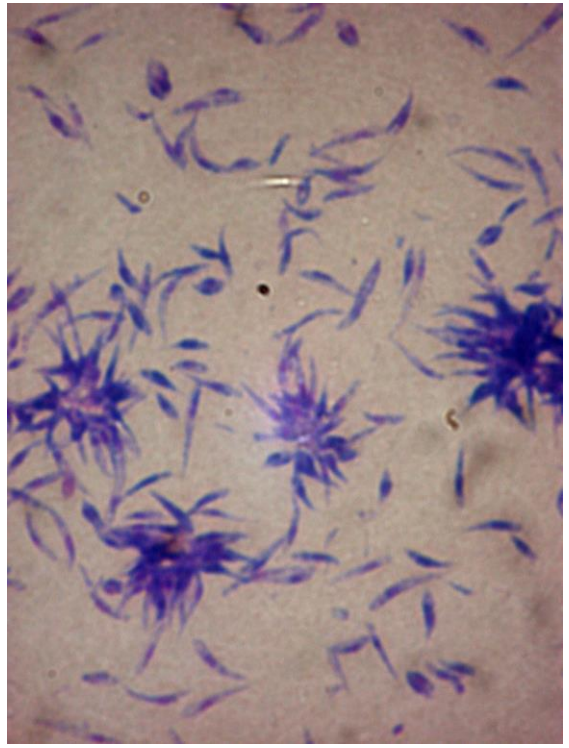
- **Esigenza di crescita del parassita**
- **Resa che si desidera ottenere**

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti

Esame colturale

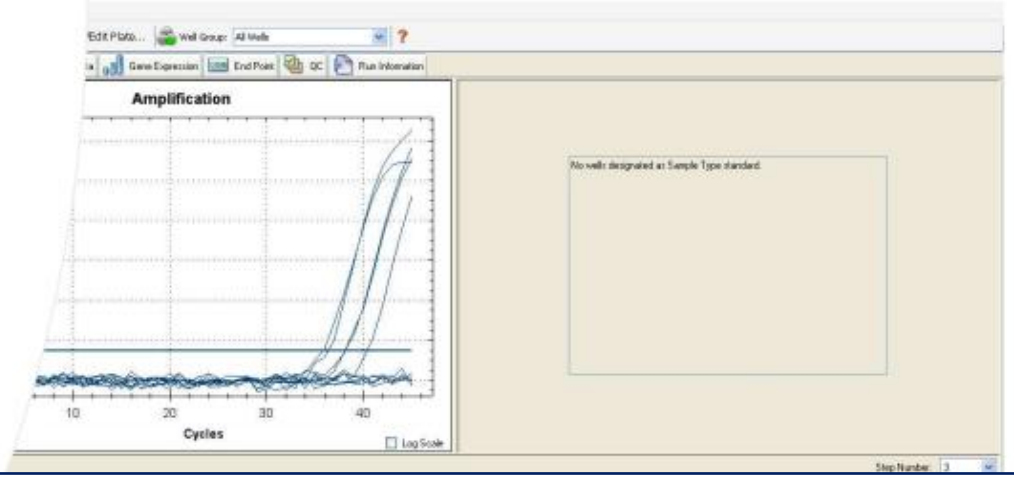
Evans'Modified Tobie'S Medium (EMTM)

Fase solida - Fase liquida – Promastigoti (Giemsa)



Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti – Test Molecolari

- Real-time PCR (e end-point PCR)
- Diagnosi rapida
- Sensibilità elevata (90-100%), specificità 70-95% (de Ruiter, J Clin Microbiol 2014)
- Utilizzo di un controllo interno di amplificazione (gene umano, quale β-actina, RNAse P, etc) per monitorare eventuali inibizione dell'amplificazione



PCR real-time per identificazione di *Leishmania* spp.

Targets	Assay type		Assay dye/fluorophore		
	Quantitative	Qualitative	TaqMan	SYBR Green	Others
kDNA	10	2	5	9	0
SSUrRNA	8	3	3	5	3
HSP70	1	2	1	1	2
Others	10	4	10	8	3
Total	29	11	19	23	8

Moreira et a. Acta Tropica, 2018

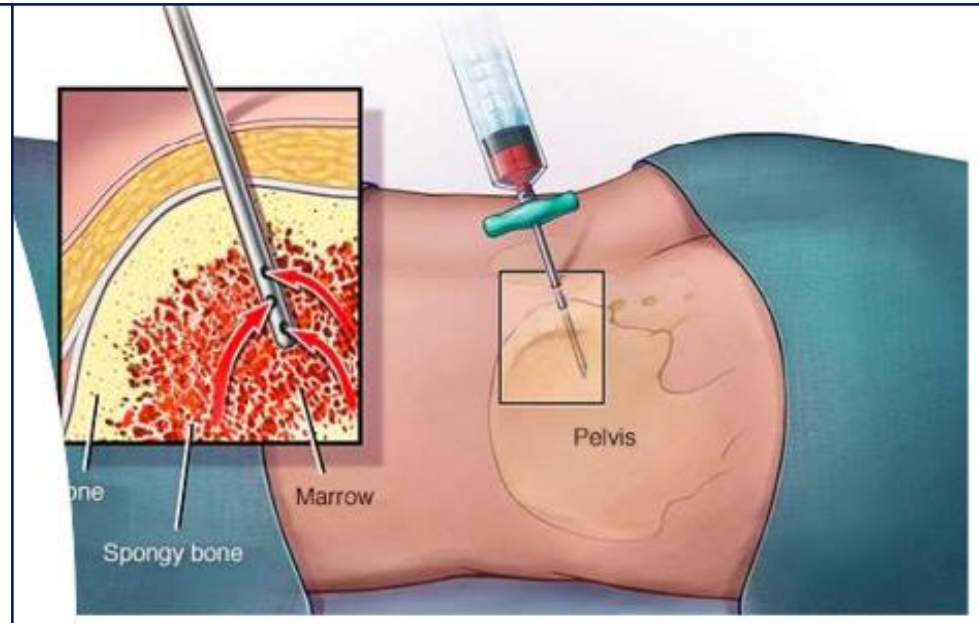
- Il DNA del chinetoplasto (kDNA) e quello codificante le proteine ribosomiali della subunità minore (SSUrDNA) sono i più utilizzati per la diagnosi di leishmaniosi (kDNA: *Mary C et al. 2004;* SSUrDNA: *Wortmann G et al. 2001)*

- **Non c' è standardizzazione né consenso sui metodi e target molecolari, non esistono linee guida internazionali**

Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Diretti – Test Molecolari

- Ricerca del DNA di Leishmania su sangue midollare e sangue periferico hanno sensibilità equivalenti

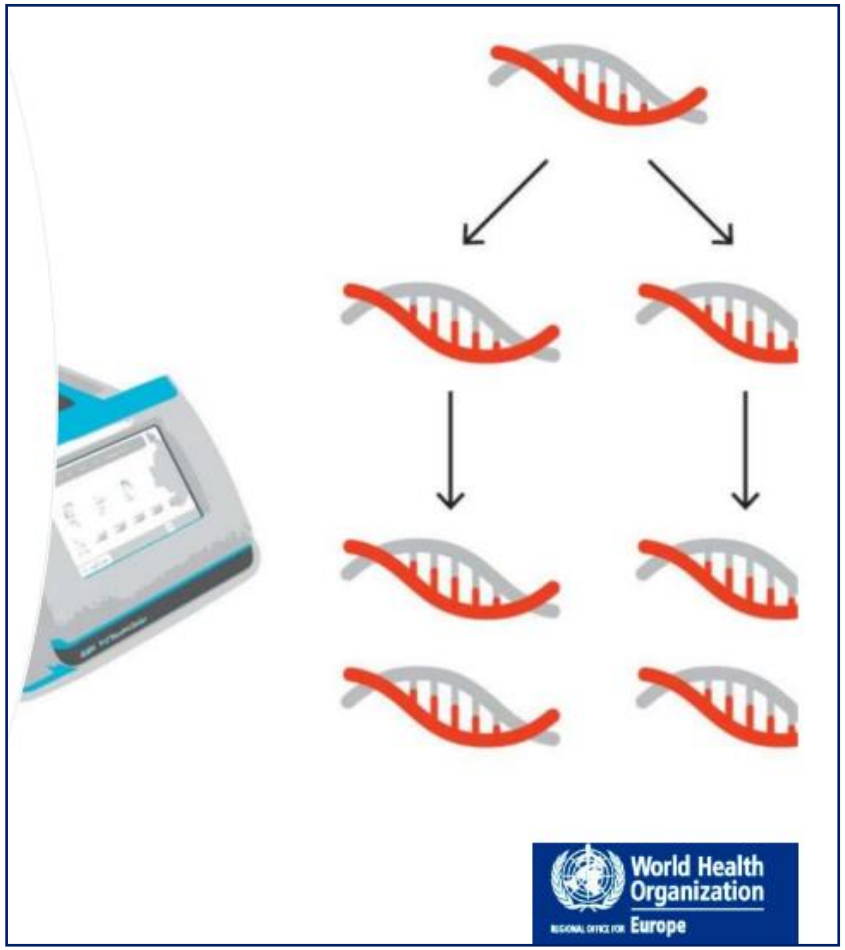
- Aspirato di midollo osseo è considerato il campione elettivo, tuttavia real-time PCR che utilizzano i target kDNA e SSUrDNA mostrano **risultati paragonabili su sangue periferico intero**



Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Test Molecolari in pazienti immunocompromessi

- Sensibilità dei metodi sierologici è limitata in pazienti immunocompromessi→ test sierologici non possono essere utilizzati per escludere leishmaniasi viscerale in pazienti HIV+

- Tra i metodi diretti, **la PCR su sangue periferico e/o aspirato midollare ha sensibilità e specificità più elevate rispetto ai metodi convenzionali** (esame microscopico e coltura)



Diagnosi di LVZ da *L. infantum* – Esami Indiretti

Assay or method Antibody detection	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Advantages	Disadvantages
IFA test	87–100	77–100	Positive in the early stages of infection and undetectable six to nine months after cure.	Requires sophisticated laboratory. No application in the field.
ELISA	> 97	> 94	Can be used to screen a large scale of epidemiologic studies.	Sensitivity and specificity is greatly influenced by the antigen used. Requires skilled personnel, sophisticated equipment, and electricity.
WESTERN BLOT	90–98	88–100	Provides detailed antibody responses to various leishmanial antigens.	Time consuming, technically cumbersome, and expensive.
IC test with rK39	90–100	93–100	Inexpensive, rapid, simple, and can be performed by untrained person.	

Percorso diagnostico per LV

(Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M. WHO, 2017)

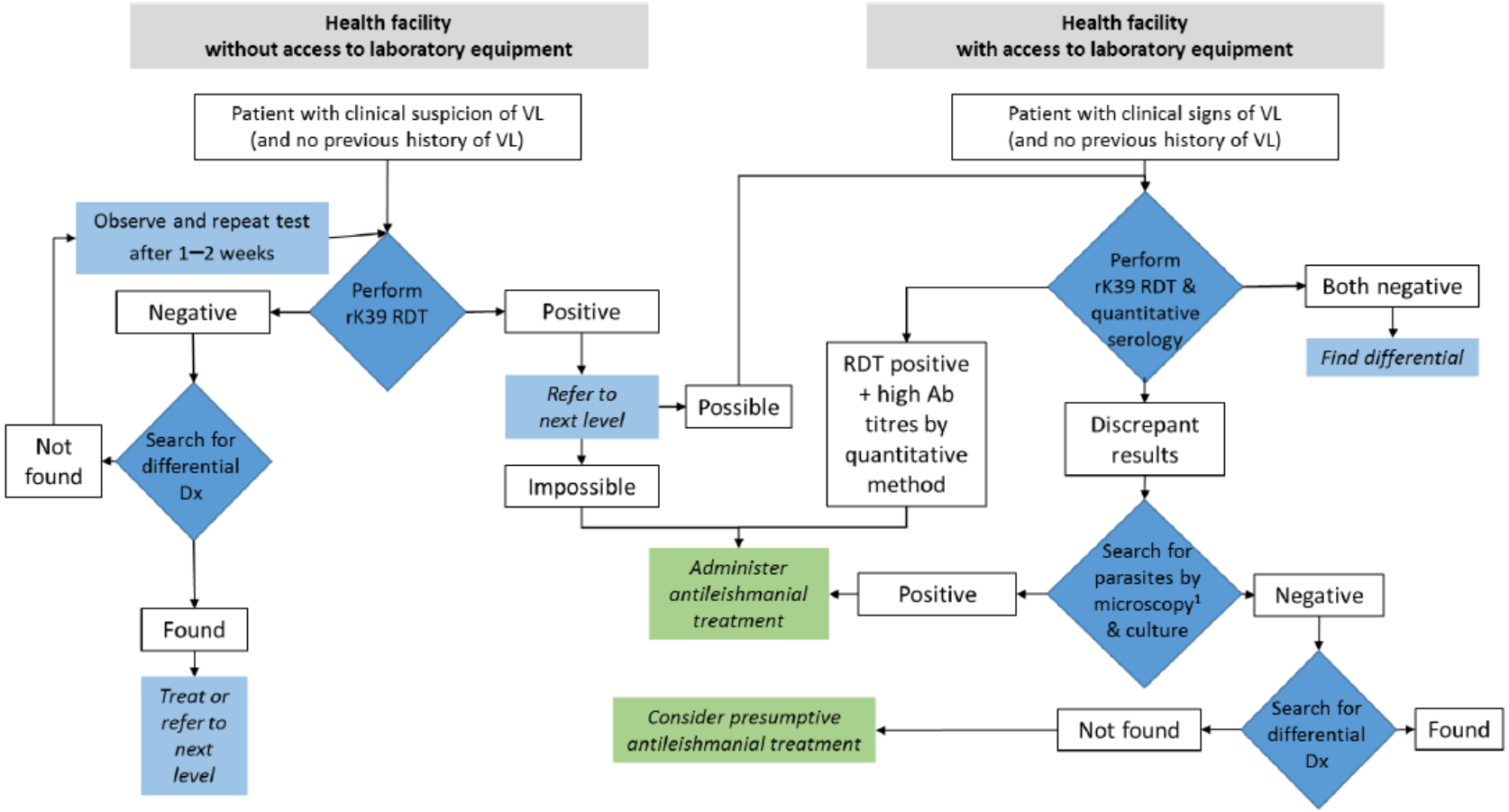


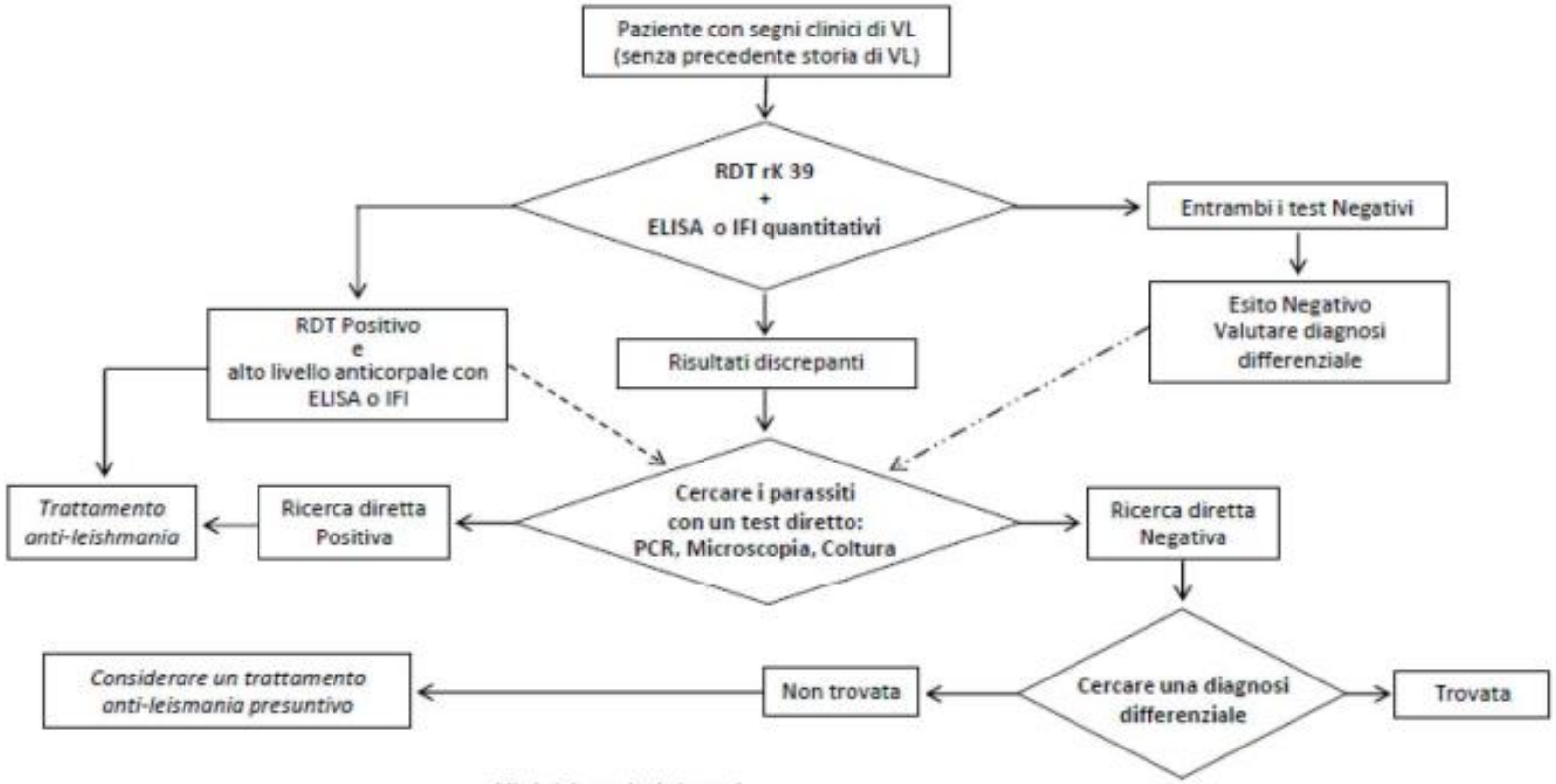
Fig. 3. Algorithm for VL diagnosis

[1] The most common clinical sample is bone marrow aspiration, but lymph node and other tissue biopsy and leucoconcentration of peripheral blood may be considered in specific situations.

Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M. WHO, 2017

World Health Organization Europe

Algoritmo diagnostico per le leishmaniasi viscerali



VL: Leishmaniosi viscerale
RDT: Test Rapido Immunocromatografico
ELISA: Enzime-Linked Immunosorbent Assay
IFI: Immunofluorescenza indiretta