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

Diagnosi di Tripanosomiasi africana ed americana

F. Bernieri, A. Raglio

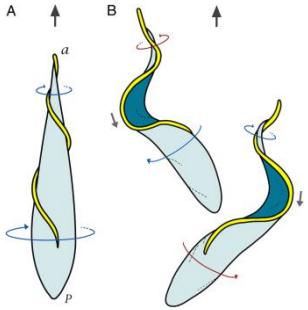
Conflitto di interessi

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

Tripanosomi africani - classificazione

• **SUBPHYLUM**	Mastigophora
• **ORDINE**	Kinetoplastida
• **FAMIGLIA**	Trypanosomatidae
• **GENERE**	*Trypanosoma* (circa 20 specie)
• **SOTTOGENERE**	*Trypanozoon*
• **SPECIE**	***Trypanosoma brucei***
• **SOTTOSPECIE**	***T. brucei gambiense***
	T. brucei rhodesiense

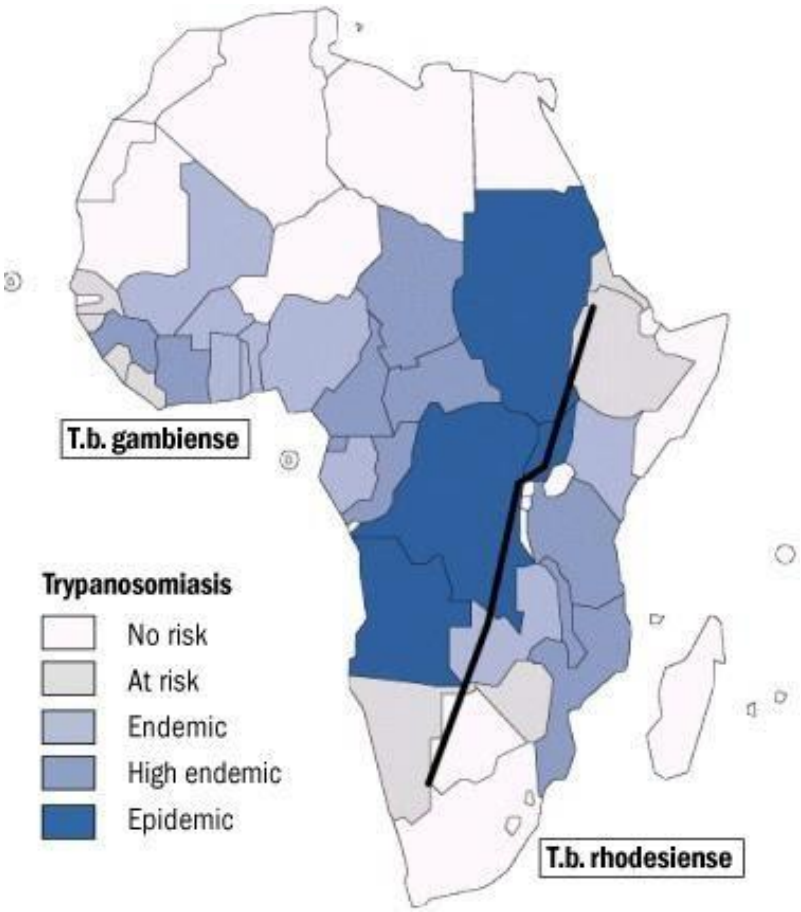
Trypanosoma. Dal greco "τρύπανον -ου [trỳpanon -ou]" = trapano + "σῶμα -ατος" [sòma –atos] = corpo: riferimento al movimento di tipo rotante, come un trapano o un cavatappi, dei tripomastigoti.



David Bruce (1855 – 1931)

Epidemiologia

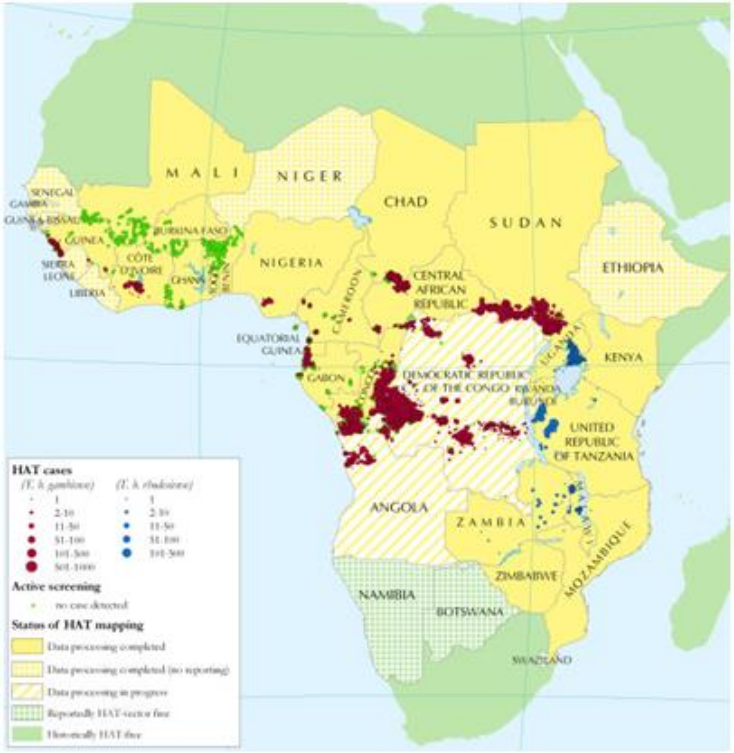
- Diffuso in tutta l'Africa a sud del Sahara e a nord del Kalahari.
- *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* presentano distinte distribuzioni geografiche, separate in senso longitudinale dalla Rift Valley con una sovrapposizione lungo le sponde del lago Vittoria).



Epidemiologia

T. b. gambiense

- È presente in 24 Paesi dell'Africa occidentale e centrale ed è causa del 98% di tutti i casi di malattia del sonno.
- La maggior parte dei casi umani (95%) si verifica nella Repubblica Democratica del Congo (70% dei casi), Angola, Sudan, Repubblica Centro Africana, Chad e Uganda del nord.
- L'uomo è il principale serbatoio dell'infezione (antroponosi) sebbene il parassita possa essere trovato a volte negli animali domestici.

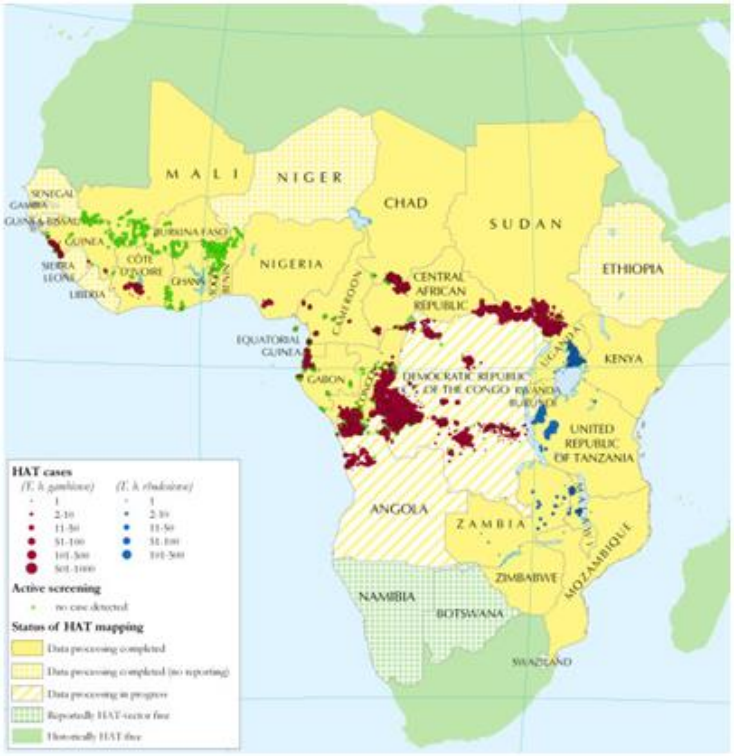


- È trasmesso dalle specie di *Glossina* del gruppo *palpalis*.
- Le zone di trasmissione sono le rive dei fiumi, guadi, zone di approvvigionamento idrico, zone forestali molto umide.

Epidemiologia

T. b. rhodesiense

- È presente in 13 Paesi dell'Africa orientale e meridionale ed è causa del 2% di tutti i casi di malattia del sonno.
- Più del 95% delle infezioni si verifica in Tanzania, Uganda, Malawi.
- Il serbatoio animale è rappresentato da animali selvatici, bovini e altri animali da allevamento (zoonosi).
- È trasmesso dalle specie di *Glossina* del gruppo *morsitans*.



- Le zone di trasmissione sono le macchie boschive della savana e gli insediamenti rurali.
- Le persone più a rischio sono cacciatori, taglialegna, pescatori, ma anche turisti che visitano i parchi nazionali dei Paesi endemici.

Trasmissione

GRUPPO DELLE “PALPALIS”

T. b. gambiense

Specie principali

- *Glossina palpalis*
- *Glossina* fuscipes
- *Glossina tachinoides*

Habitat

- Foreste “a galleria” lungo i corsi fluviali
- Abitudini antropofile

GRUPPO DELLE “MORSITANS”

T. b. rhodesiense

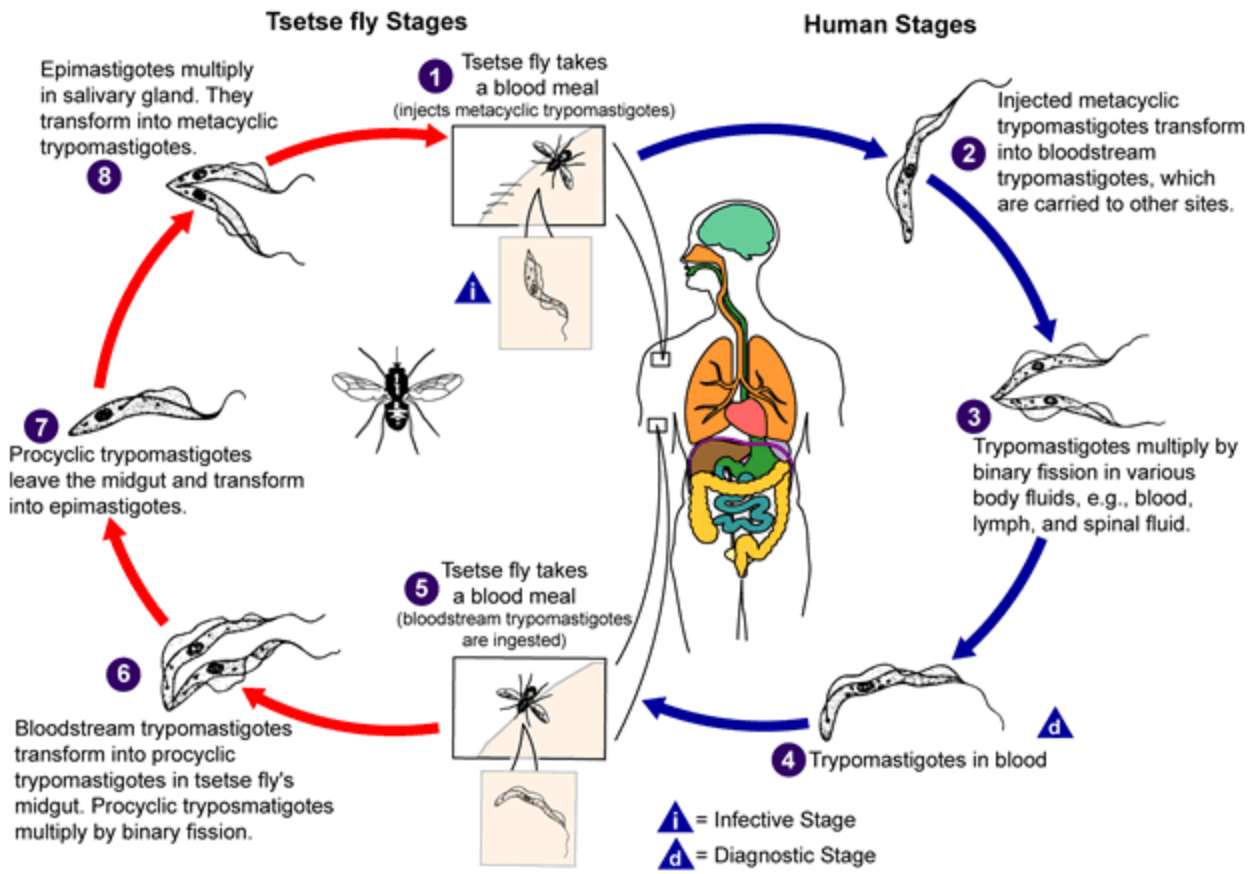
Specie principali

- *Glossina morsitans*,
- *Glossina pallidipes*,
- *Glossina swynnertoni*

Habitat

- Savana boscosa
- Abitudini zoofile

Ciclo biologico

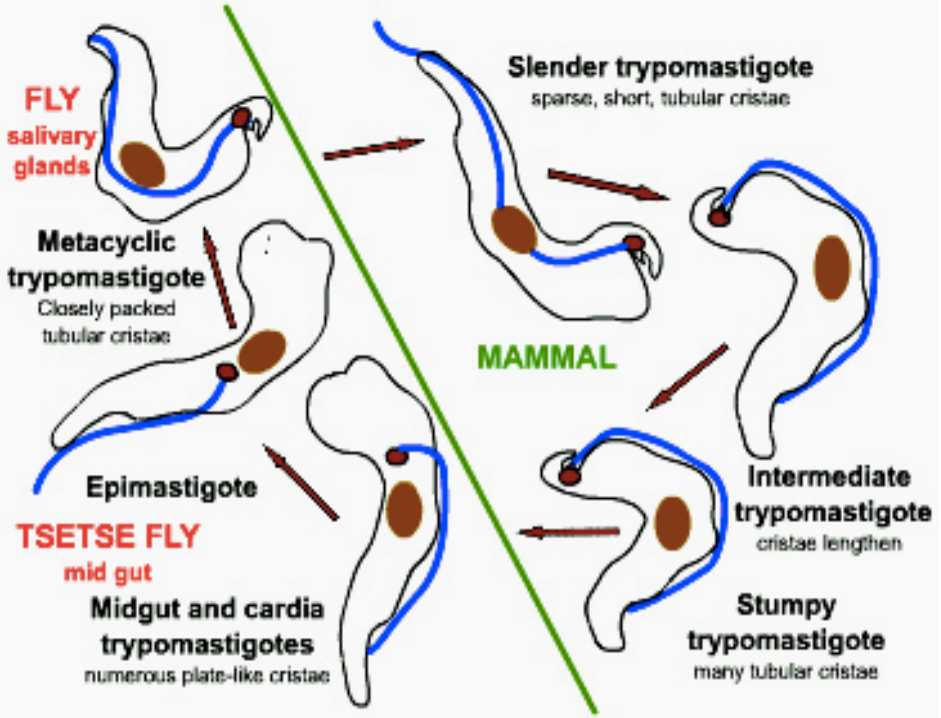


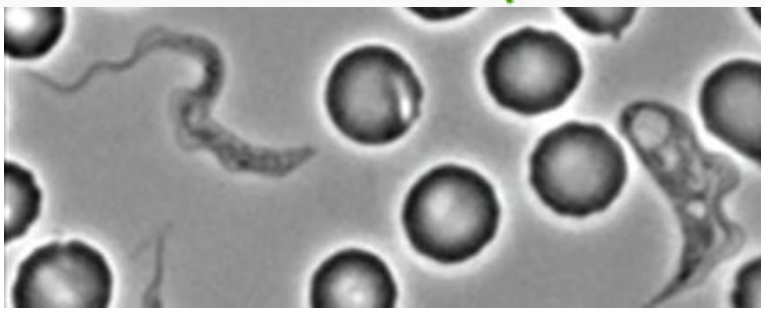
- L'uomo si infetta mediante inoculo attraverso la cute di **tripomastigoti metaciclici** durante un pasto ematico della mosca "tsetse"
- I tripomastigoti vengono tasportati via ematica al cuore ed a diversi organi; negli stadi avanzati della malattia invadono anche il **sistema nervoso centrale**.
- I tripomastigoti si moltiplicano per fissione binaria nel sangue e in altri fluidi corporei
- Le mosche "tsetse" si infettano ingerendo i tripomastigoti in circolo nell'ospite mammifero durante il pasto ematico.
- I tripomastigoti si sviluppano e si moltiplicano nell'intestino medio delle mosche infettate. Una volta infettate, **le mosche restano vettori per tutta la vita**.
- Dopo 2-3 settimane dal pasto infettante, i tripomastigoti migrano fino alle ghiandole salivari dell'insetto dove si moltiplicano ancora e si sviluppano in **epimastigoti** eppoi in **tripomastigoti metaciclici** che rappresentano la forma infettante per l'uomo.

Forme assunte dai tripanosomi africani

Nel sangue umano i tripomastigoti appaiono polimorfi:

- forme snelle (slender) di 12-35 µm con un flagello libero, molto mobili e spesso in fase di divisione,
- forme corte e tozze (stumpy) lunghe ~ 18 µm, con un breve flagello residuale libero anteriore, poco mobili e mai in divisione,
- Le forme tozze sono le forme infettanti per il vettore.





Slender Stumpy

Diagnosi

Una diagnosi mirata ed accurata di tripanosomiasi africana, così come la terapia, è estremamente complessa e richiede personale molto esperto, è quindi preferibile sia eseguita presso laboratori specializzati e/o centri di riferimento.

Diagnosi diretta

- Ricerca nella lesione cutanea iniziale
  - Osservazione microscopica a fresco e/o dopo Giemsa
- Ricerca su aspirato linfonodale
  - Osservazione microscopica a fresco
- Ricerca nel sangue periferico
  - Osservazione microscopica a fresco
  - Striscio sottile
  - Goccia spessa
  - Centrifugazione in Tubi Capillari (CTC)
  - Quantitative Buffy Coat (QBC)
  - Tripla centrifugazione
- Ricerca nel liquor
  - Esame del sedimento
  - Doppia centrifugazione del liquor

Diagnosi diretta

Osservazione microscopica a fresco

- Lesione cutanea
- Aspirato linfonodale
- Sangue periferico

- Utilizzando l'obiettivo 40x: in caso di positività si osserveranno dei microrganismi allungati, fusiformi, con membrana ondulante e flagello, molto mobili che, nel sangue periferico, spostano le emazie. Sono lunghi da 10 a 20 µm.
- È una tecnica scarsamente sensibile.

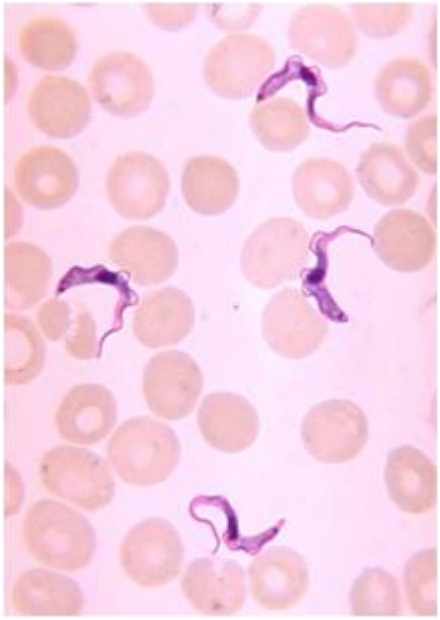
Trypanosoma.mpeg

Diagnosi diretta

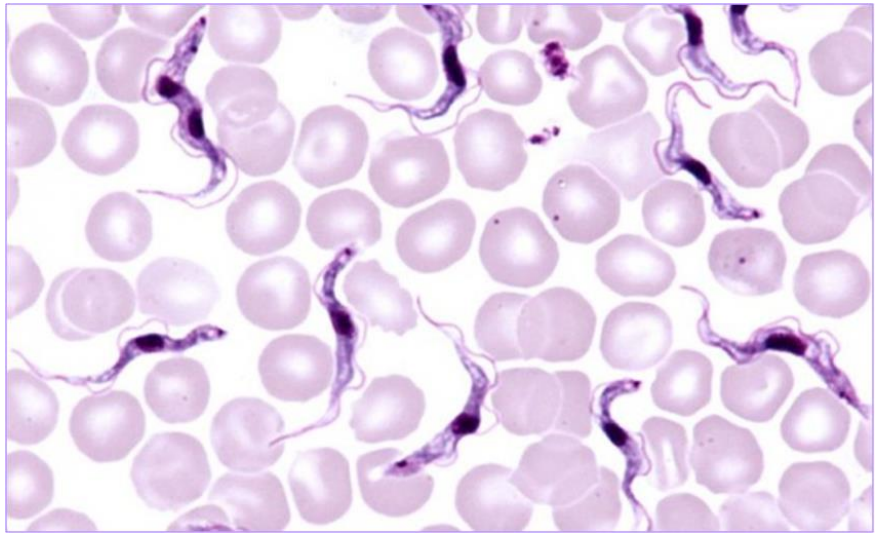
Striscio sottile e Goccia spessa

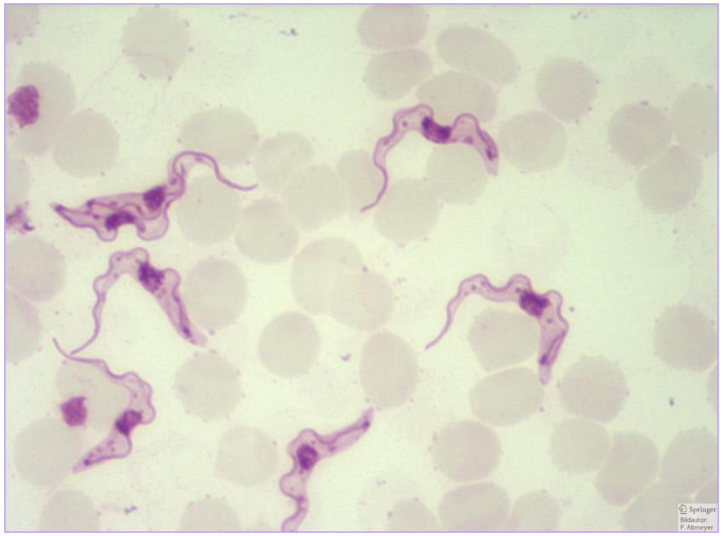
- Si procede come già descritto per la malaria, si colora con Giemsa (o colorazione analoga).
- I tripanosomi si presentano nella forma tripomastigote, le cui caratteristiche morfologiche sono:
  - forma allungata, colorazione blu o blu-grigio del citoplasma,
  - nucleo rosso porpora in posizione centrale, a volte in divisione,
  - piccolo chinetoplasto puntiforme all'estremità posteriore di colore rosso porpora,
  - membrana ondulante ben evidente e flagello libero dalla parte opposta del chinetoplasto.
- I tripanosomi sono sempre extracellulari.

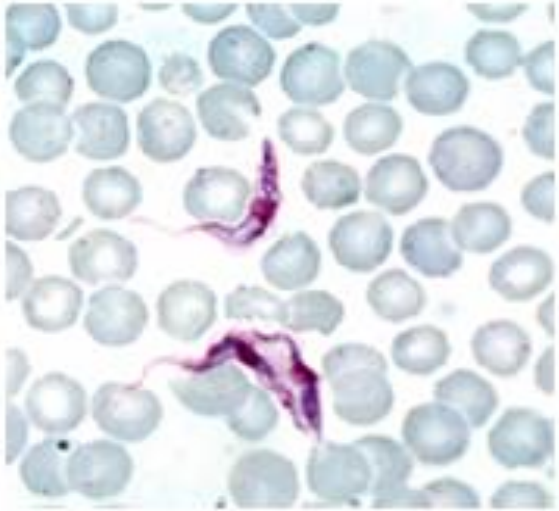
Trypanosoma brucei

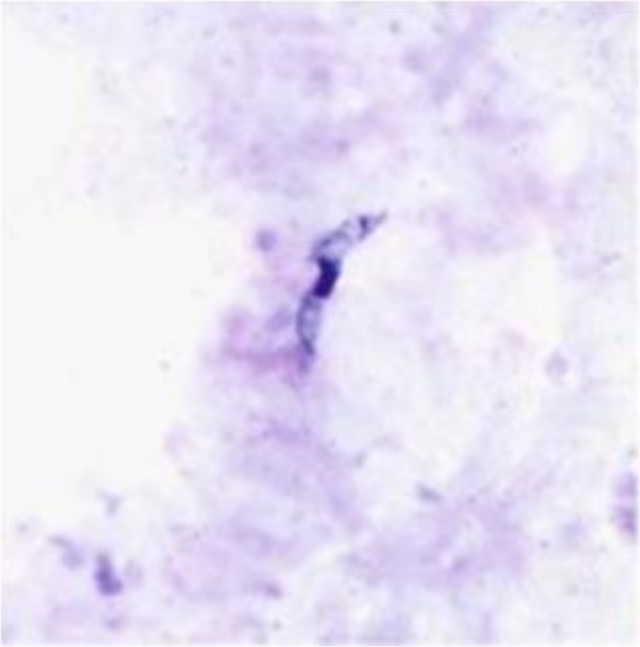


Tripanosomiasi africana

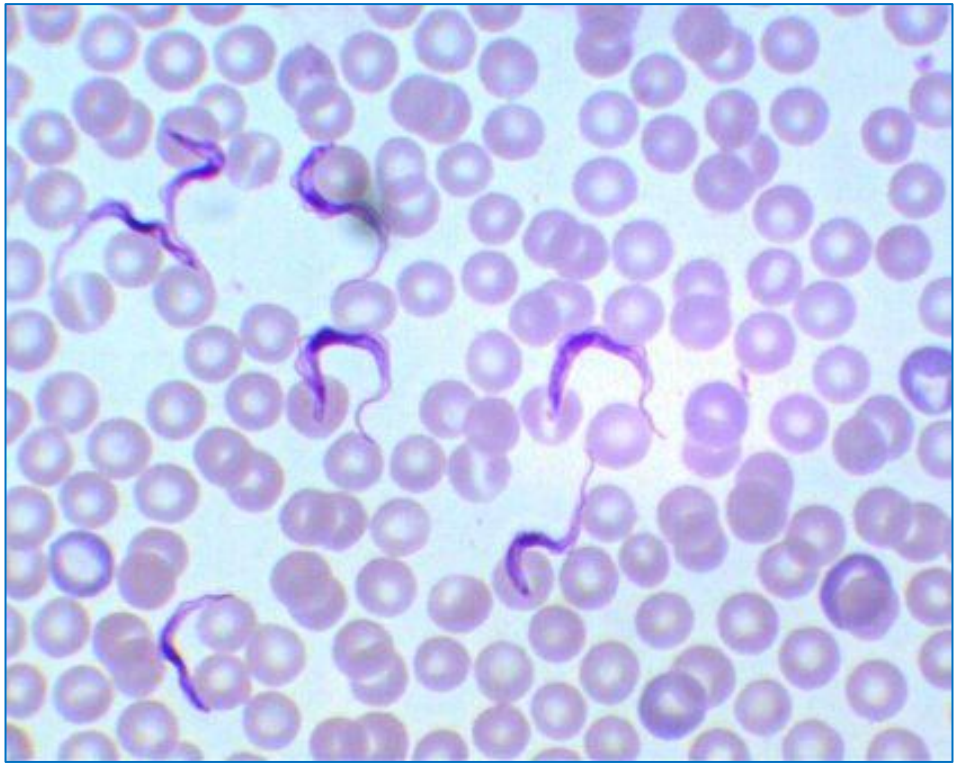




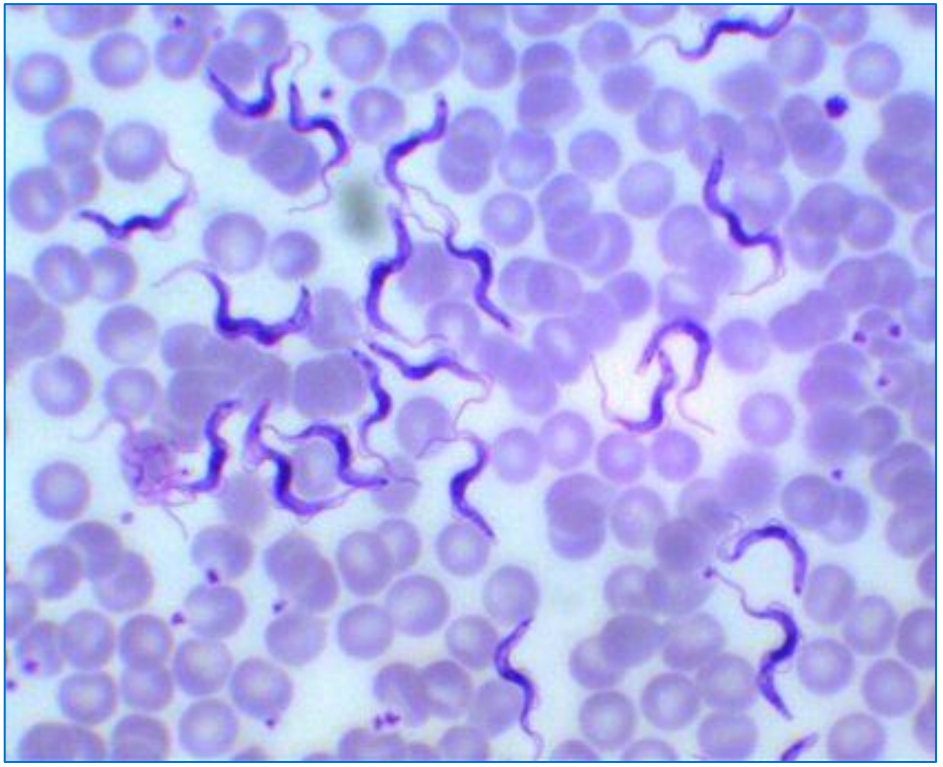




Tripanosomiasi africana



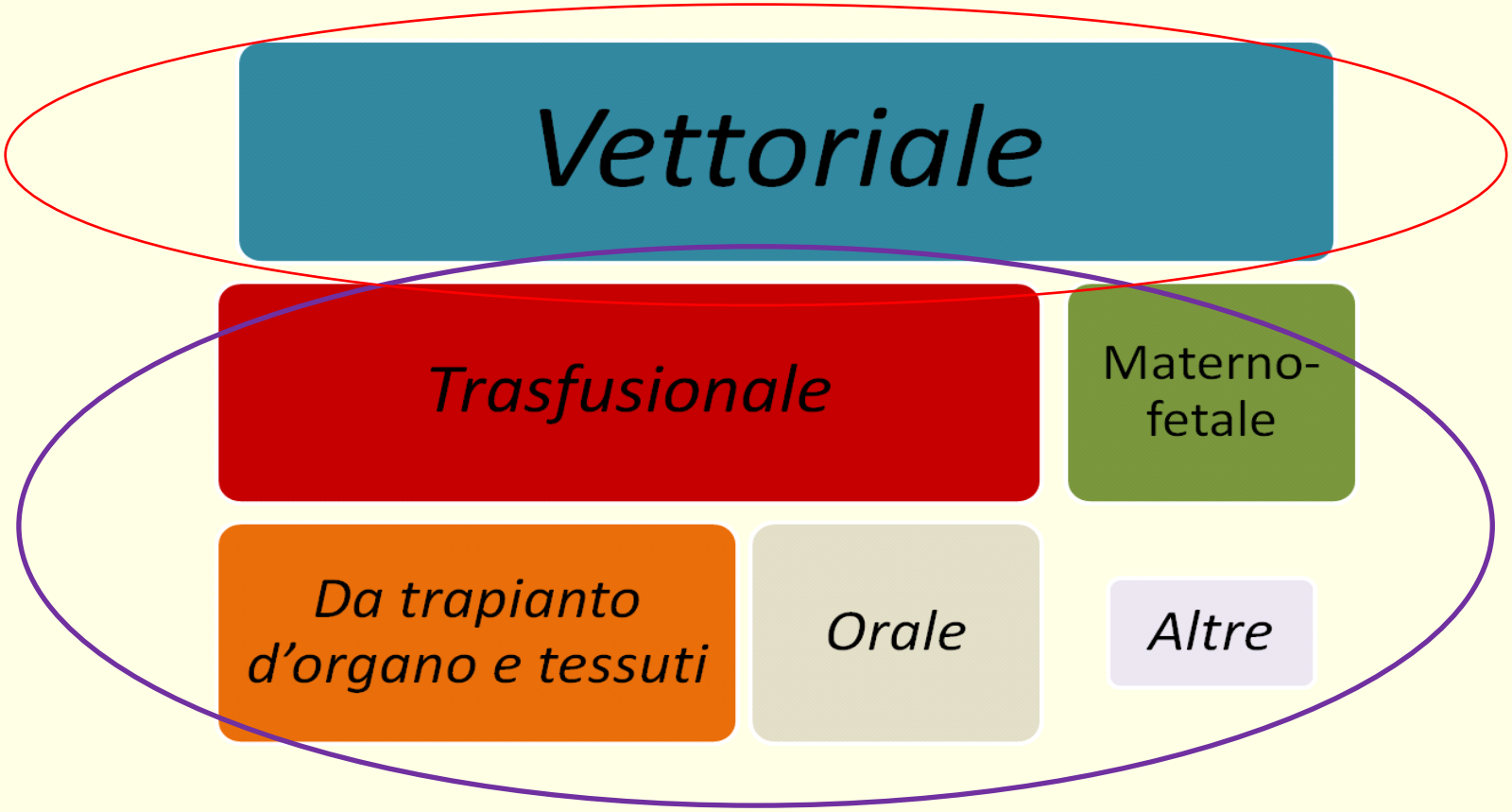
T. b. gambiense



T. b. rhodesiense

- L'unico criterio certo per distinguere le due sottospecie è il criterio epidemiologico.
- Refertare: *Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense*

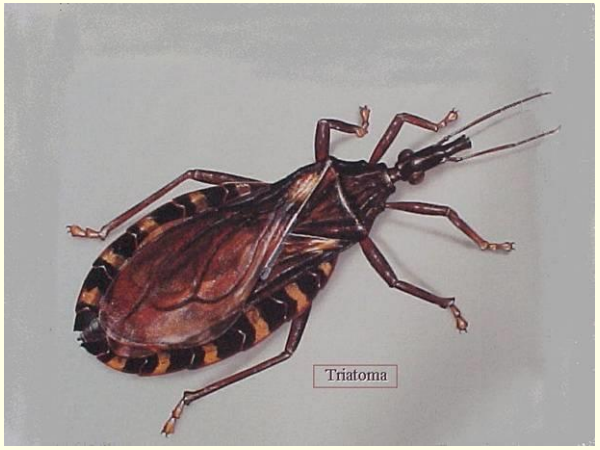
Tripanosomiasi Americana Modalità di trasmissione



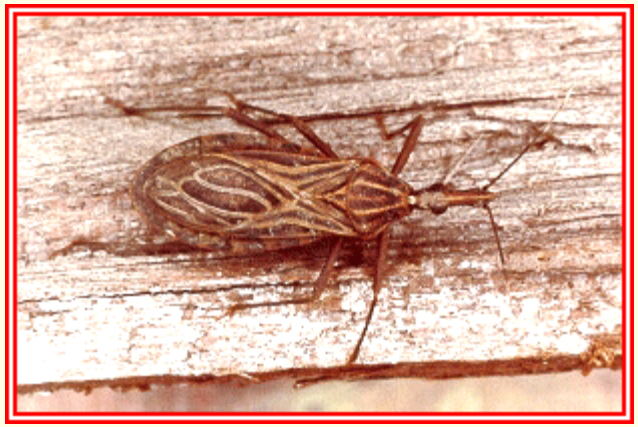
Rischio di trasmissione da:

- **contatto con Triatomina infetta: 0,1%**
- **singola trasfusione di sangue (500 ml): 12-20%**
- **trapianto renale da donatore in fase indeterminata: 35%**
- **riattivazione in corso di immunodepressione: 30%**
- **materno-fetale: 0,1-12%**

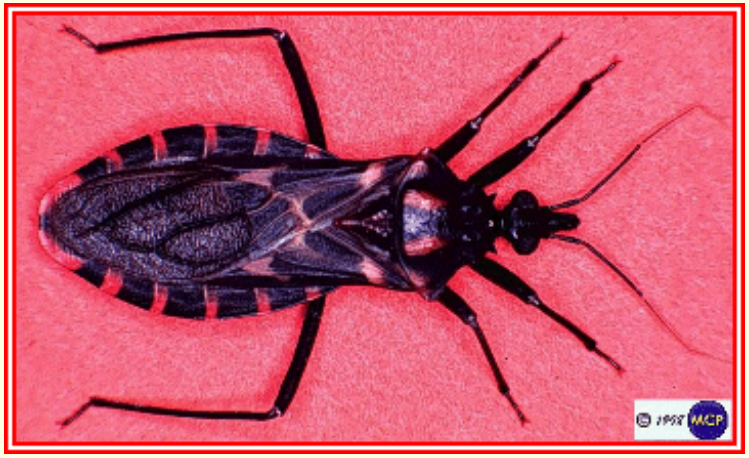
CIMICI REDUVIIDAE



Triatoma infestans



Rhodnius prolixus



Panstrongylus megistus

MALATTIA DI CHAGAS
INFEZIONE UMANA PER VIA VETTORIALE

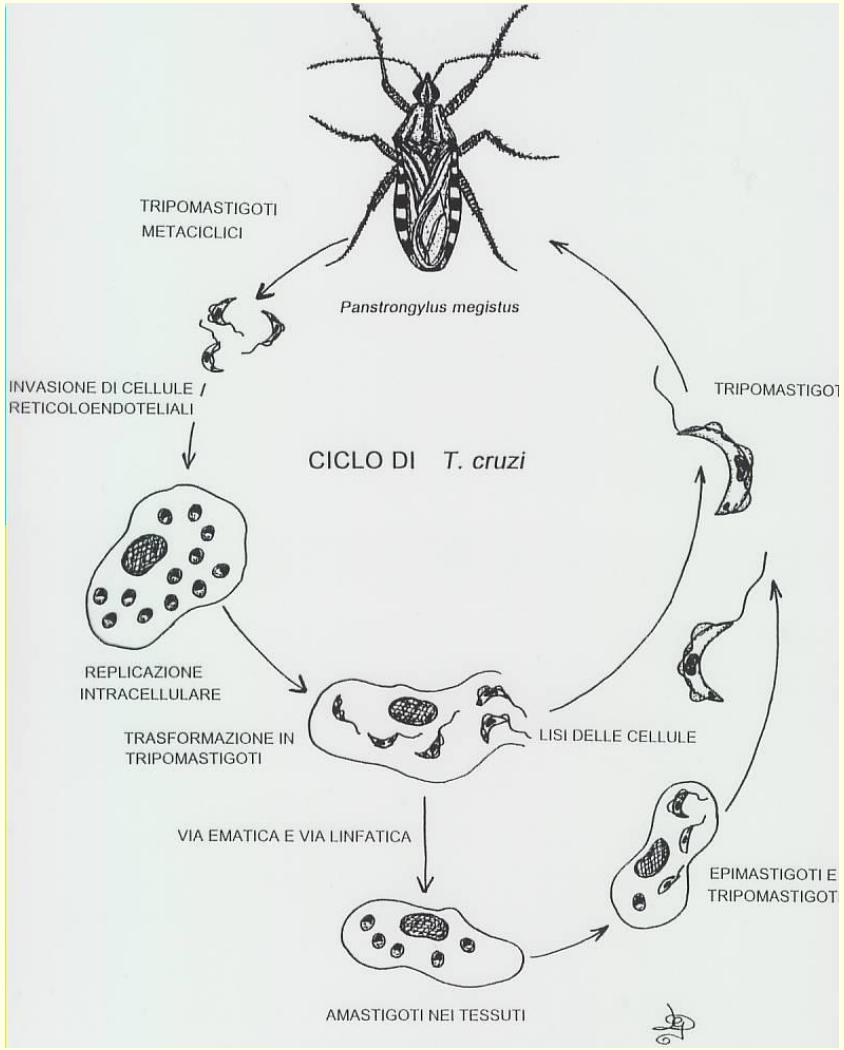
➲Trasmissione di *T. cruzi* determinata da triatomine ad *habitus* domiciliare - peridomiciliare

Le triatomine domiciliari, principali responsabili dell'infezione umana, colonizzano le abitazioni di aree rurali endemiche, costruite con materiali naturali quali fango, legno, foglie di palma

Crepe e fessure nelle pareti di fango, tetti costituiti da foglie di palma forniscono rifugio alle triatomine, che durante le ore notturne escono per consumare il pasto ematico

➲Sporadici casi di infezione da triatomine ad *habitus* selvatico (Amazzonia)

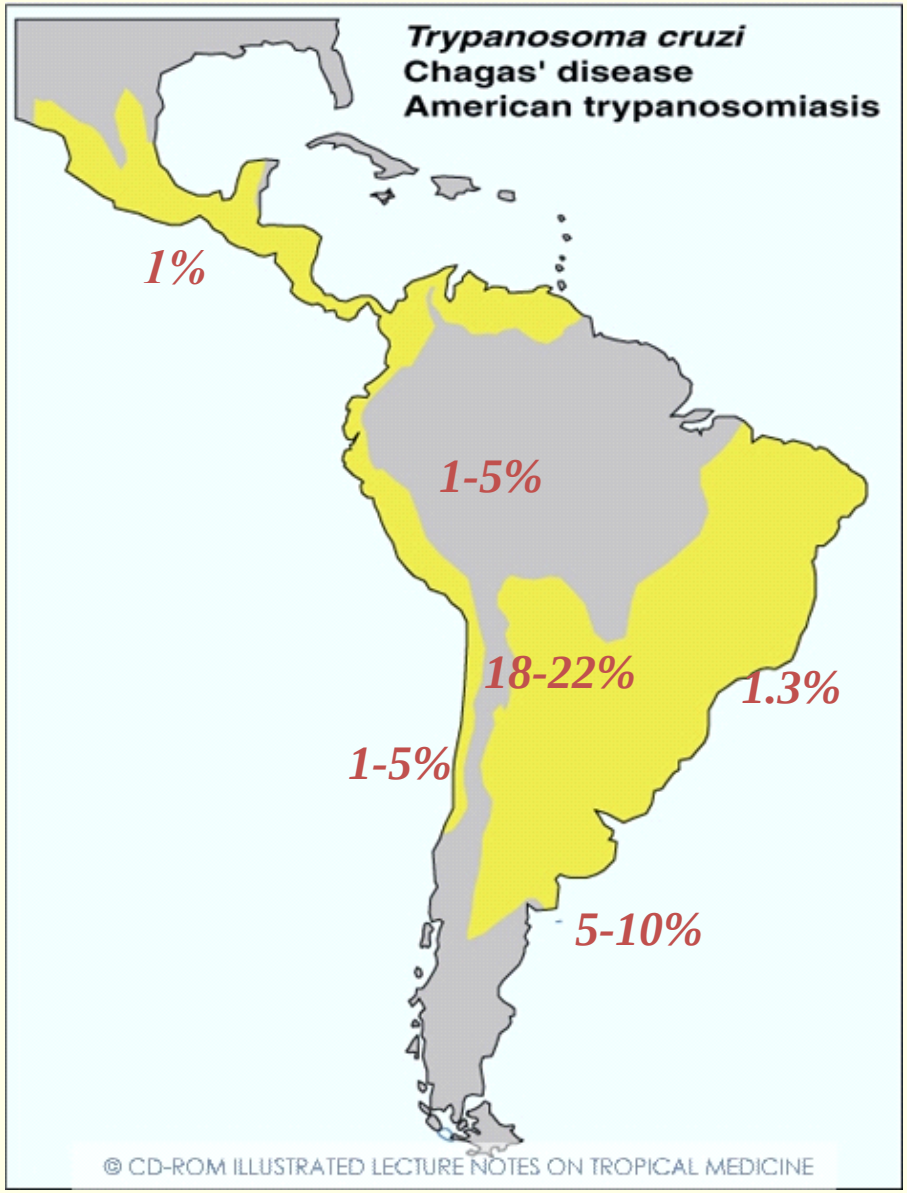
CICLO VITALE DI *T. cruzi*



- Durante un pasto ematico la cimice depone le feci contenenti i **tripomastigoti metaciclici** sulla pelle dell'uomo.

  I tripomastigoti penetrano nell'ospite attraverso la ferita del morso o attraverso mucose integre (congiuntiva)
- Nell'uomo, i tripomastigoti invadono cellule all'interno delle quali si differenziano in **amastigoti** e si moltiplicano per divisione binaria. Dopo essersi differenziati in tripomastigoti lasciano le cellule per entrare nella circolazione sanguigna.
- **I tripomastigoti non si moltiplicano nel sangue**, ma solo all'interno di cellule e nell'insetto vettore.
- Le cimici si infettano ingerendo tripomastigoti durante un pasto ematico.
- I tripomastigoti ingeriti si trasformano in **epimastigoti** e si moltiplicano nell'intestino medio del vettore.

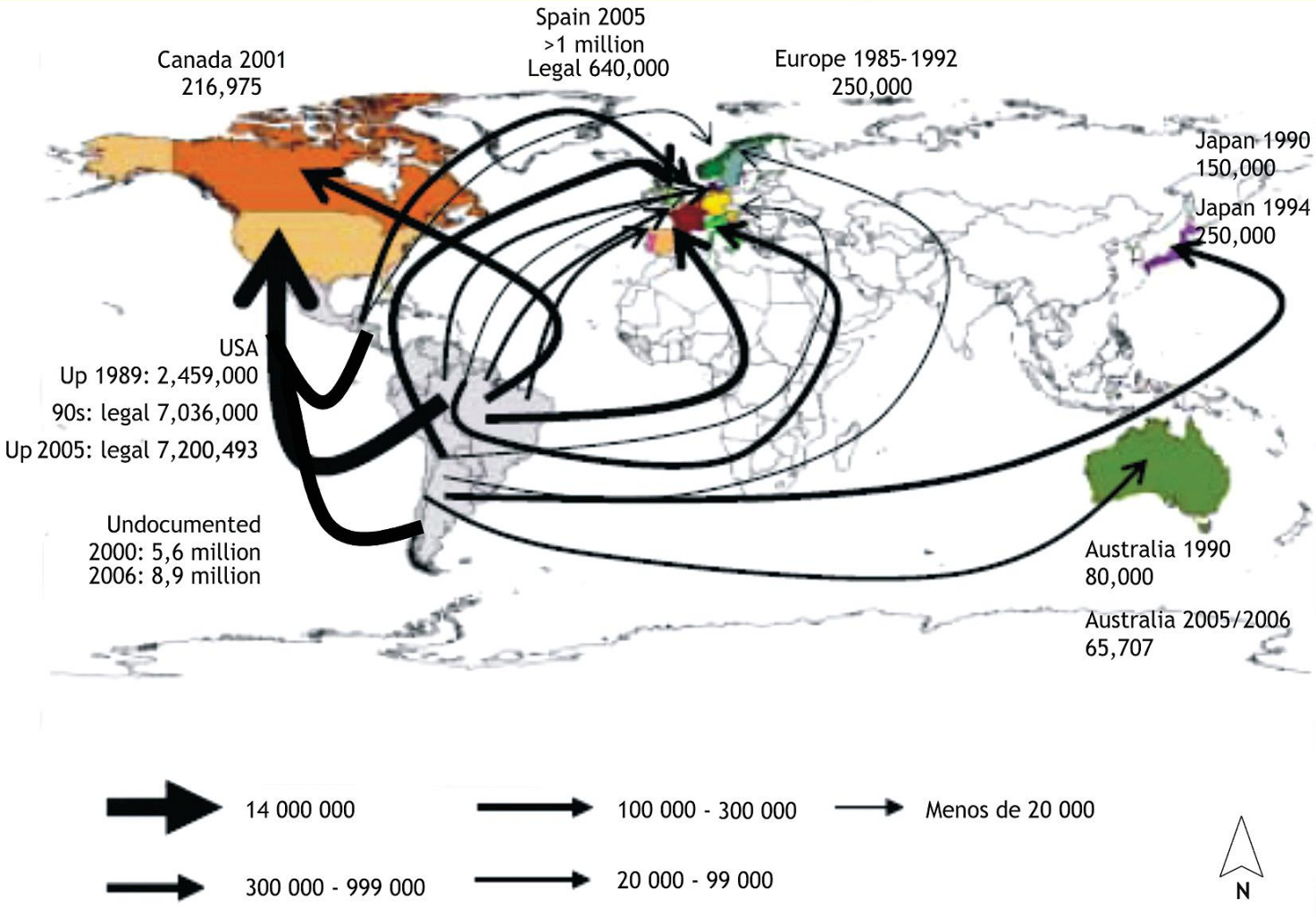
  A livello dell'intestino retto del vettore, si trasformano in **tripomastigoti metaciclici** infettanti.



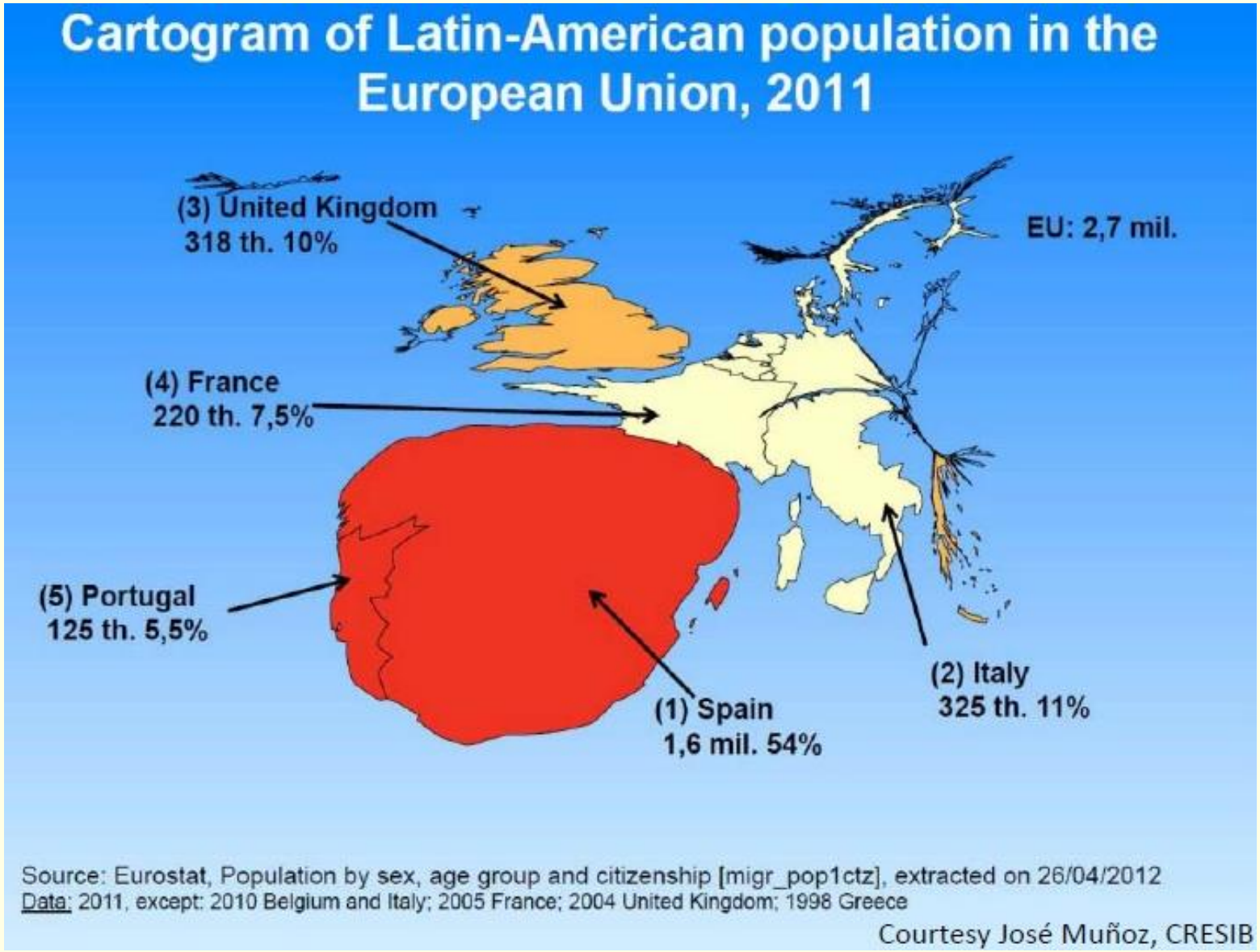
Aree Geografiche
Prevalenza

- *Endemica in 21 Paesi dell'America Latina continentale*
- *100 milioni di persone a rischio (25% della popolazione LA)*
- *8 milioni di persone infettate (12.000 decessi per anno)*
- *Importanti variazioni endemicità tra Paesi*
- *Migrazioni*

La migrazione di individui affetti da malattia di Chagas pone un PROBLEMA DI SALUTE PUBBLICA NEI PAESI NON ENDEMICI…



Migrazione Latino Americana in Europa



Paesi non endemici

- Malattia importata (immigrato, espatriato o viaggiatore (casi acuti: rari; casi cronici: più frequenti)
- Malattia trasmessa da madre a bambino (anche seconda generazione)
- Trasmissione via donazione di sangue, organo o tessuto

DM 2/11/2015 (GU n. 69 del 28/12/2015)
Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.

Malattia di Chagas o tripanosomiasi americana

I soggetti nati (o con madre nata) in Paesi dove la malattia è endemica, o che sono stati trasfusi in tali Paesi, o che hanno viaggiato in aree a rischio (rurali) e soggiornato in condizioni ambientali favorenti l'infezione (camping, trekking) possono essere ammessi alla donazione solo in presenza di un test per anticorpi anti-Tripanosoma Cruzii negativo.

Malattia di Chagas
Diagnosi

DIAGNOSI DI TRIPANOSOMIASI AMERICANA

DIRETTA

- **RICERCA DI TRIPOMASTIGOTI NEL SANGUE**
  stadio acuto
- **RICERCA MEDIANTE XENODIAGNOSI**
  stadi subacuti e cronici

INDIRETTA

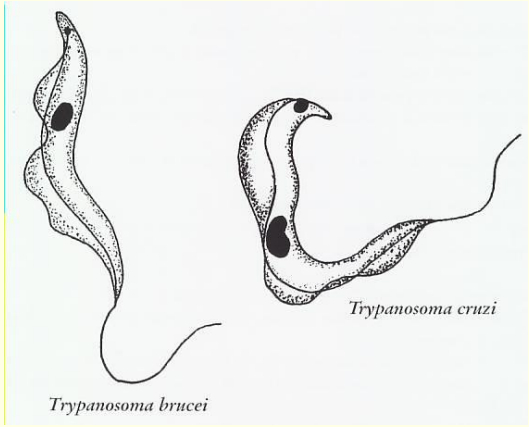
- **SIEROLOGIA (soprattutto IFI; EIA; IHA, WB)**
- **BIOLOGIA MOLECOLARE**

RICERCA DEI TRIPOMASTIGOTI NEL SANGUE (Fase acuta)

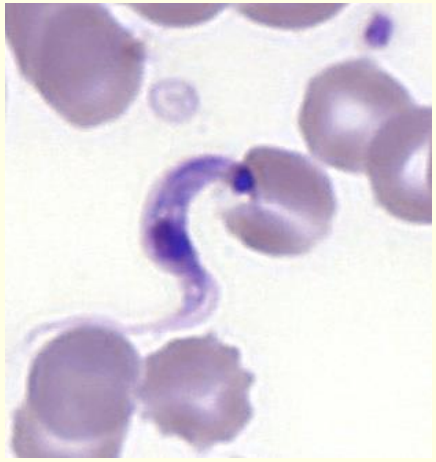
- **COLORAZIONE DI STRISCI EMATICI CON GIEMSA O FIELD** striscio sottile e goccia spessa
- RICERCA DIRETTA "A FRESCO"
- RICERCA DOPO CONCENTRAZIONE PER CENTRIFUGAZIONE
- METODO DEL MICROEMATOCRITO

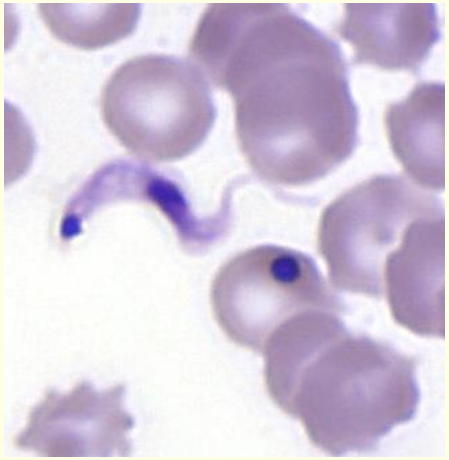
Trypanosoma cruzi
Tripomastigoti

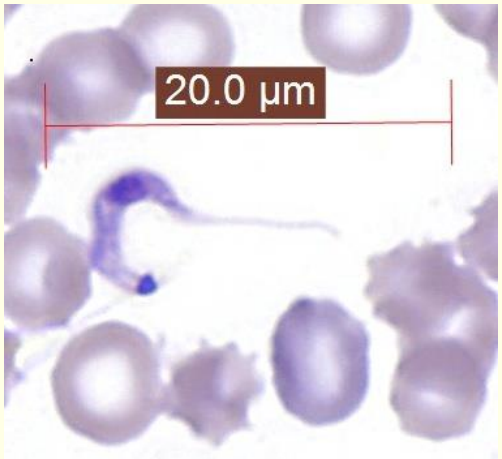
- Tripomastigoti a forma di “C” di 12 - 30 µm di lunghezza.
- Cinetoplasto grande, rotondo od ovale, situato in posizione terminale e che si colora in rosso scuro.
- Dal cinetoplasto parte un unico flagello che si prolunga lungo il margine esterno della stretta membrana ondulante e termina oltre la parte anteriore come flagello libero.
- Nucleo color violetto situato centralmente.

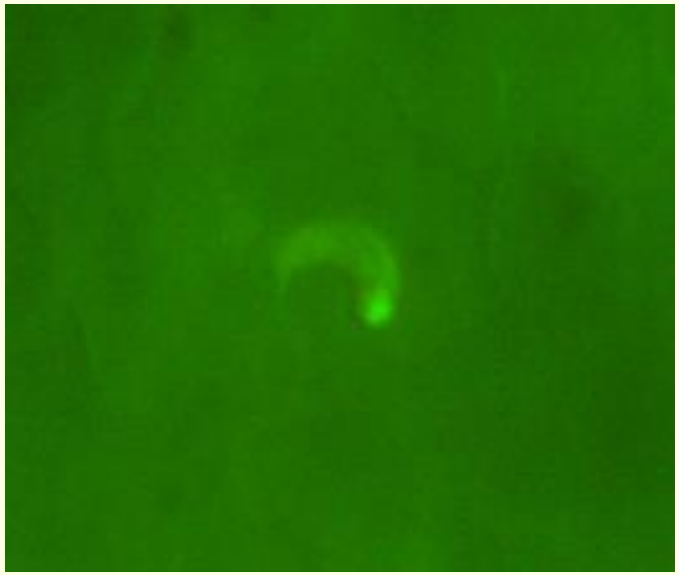


Trypanosoma cruzi
Tripomastigoti

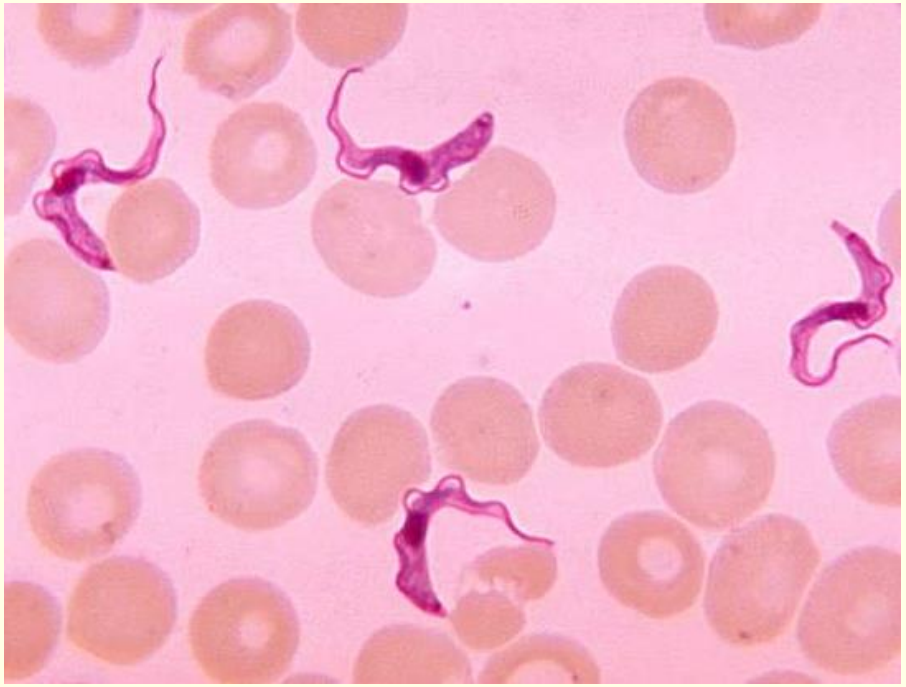


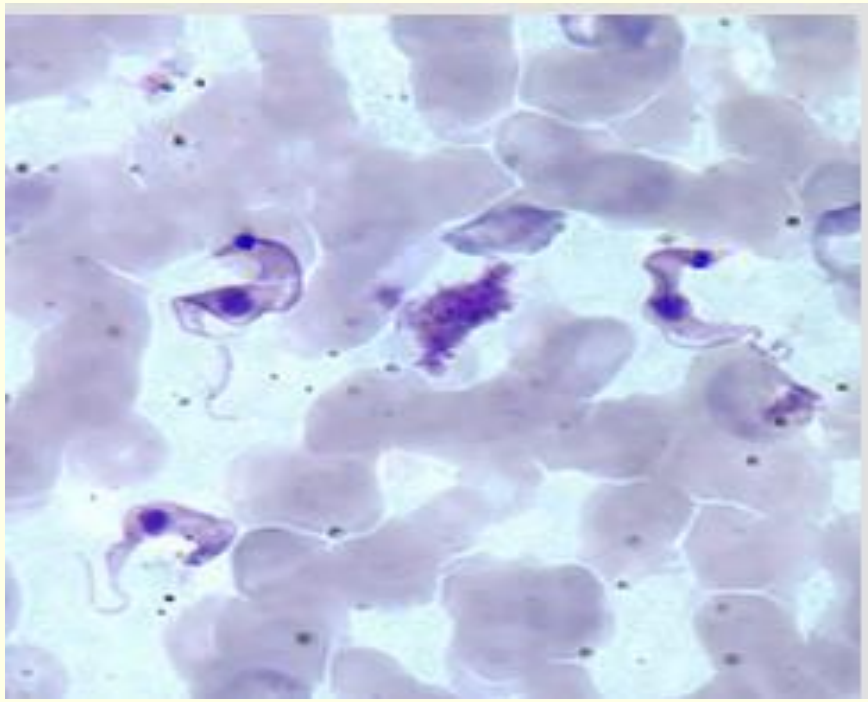






Tripomastigote
QBC





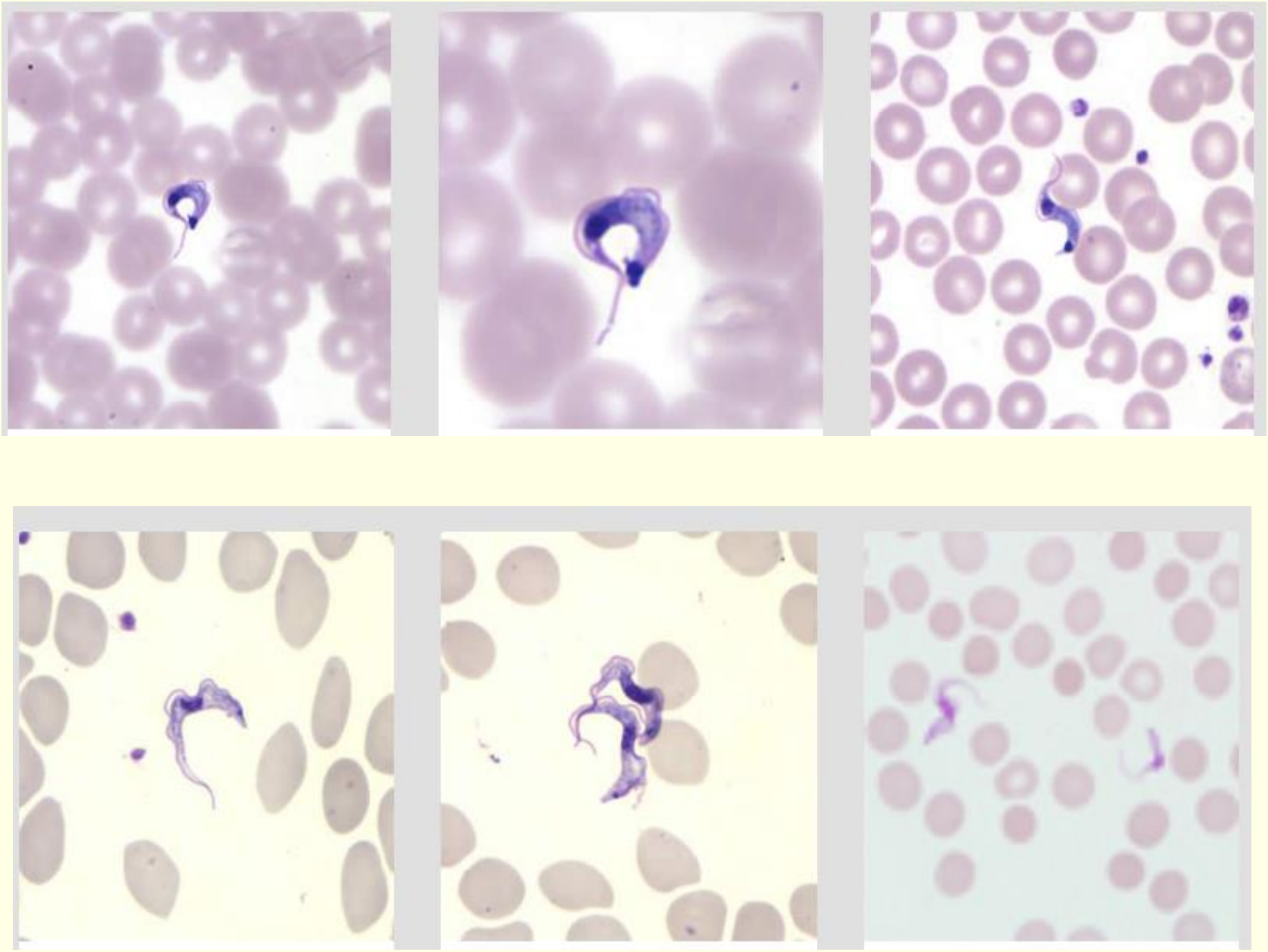


Figura 24. Algoritmo diagnostico per la malattia di Chagas in fase acuta

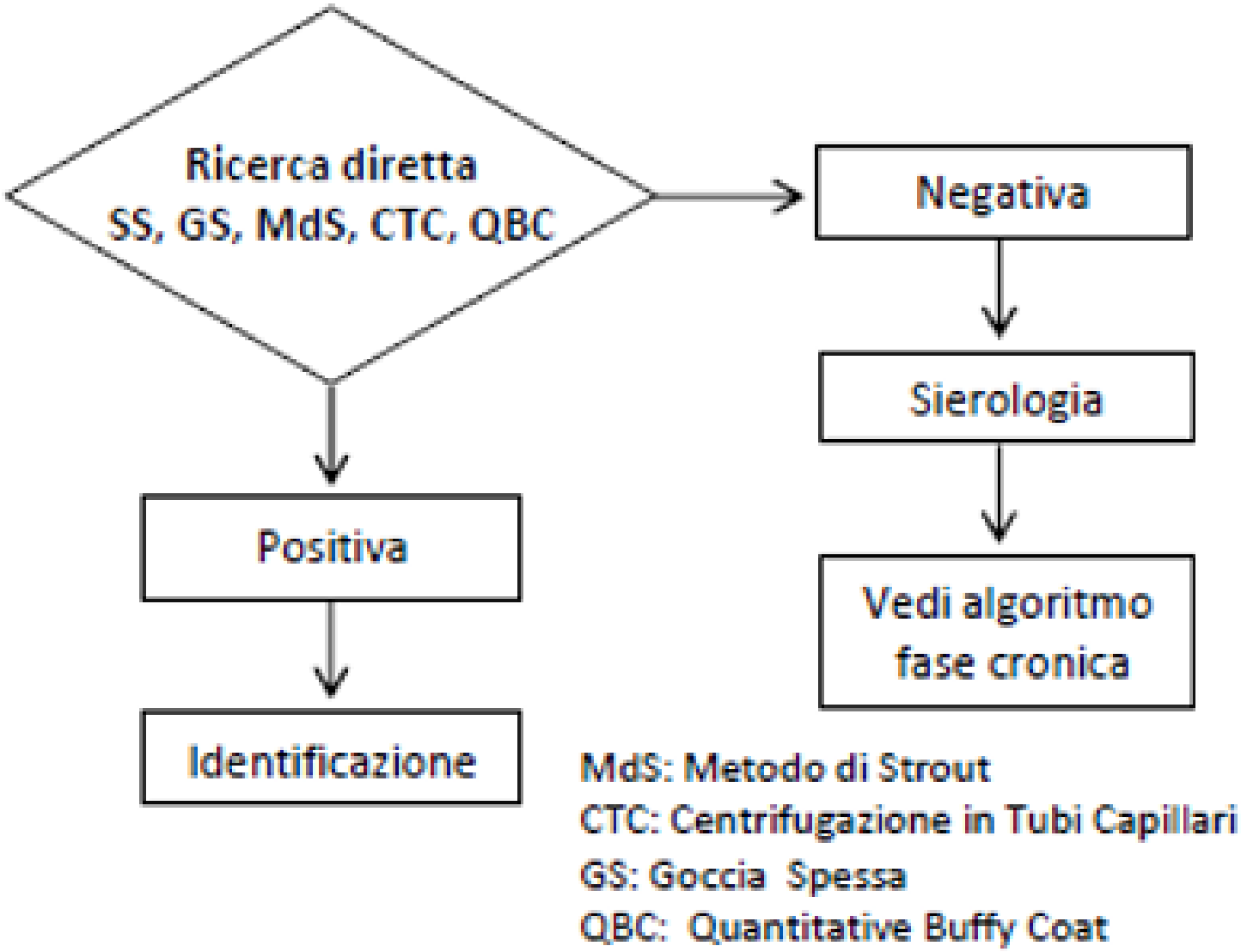
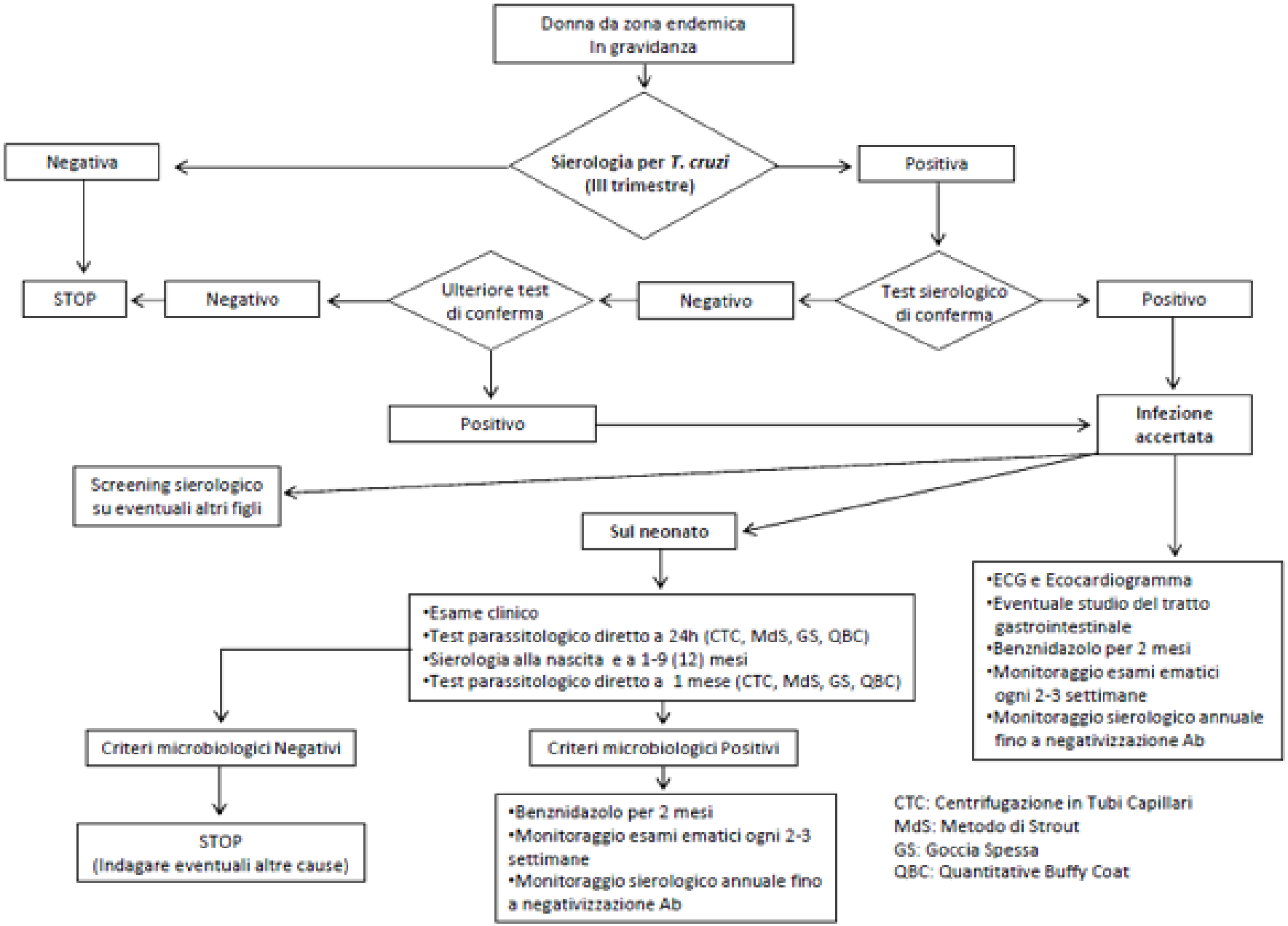


Figura 26. Algoritmo diagnostico in gravidanza



PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES 2019

VIEWPOINTS

Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women

Yves Carlier[1,2☯*], Jaime Altcheh[3☯], Andrea Angheben[4☯], Hector Freilij[3☯], Alejandro O. Luquetti[5☯], Alejandro G. Schijman[6☯], Manuel Segovia[7☯], Noemie Wagner[8☯], Pedro Albajar Vinas[9☯]

1 Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, **2** Department of Tropical Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University, New Orleans, Louisiana, United States of America, **3** Servicio de Parasitología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez (Centro colaborador en Chagas pediátrico OPS/OMS), Instituto Multidisciplinario de Investigación en Patologías Pediátricas (IMIPP), CONICET-GCBA, Buenos Aires, Argentina, **4** Centro per le Malattie Tropicali, IRCCS Ospedale "Sacro Cuore—Don Calabria," Negrar (Verona), Italy, **5** Laboratório de Chagas, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, **6** Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina, **7** Unidad Regional de Medicina Tropical, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar (Murcia), Spain, **8** Hôpitaux Universitaires de Genève, Geneva, Switzerland, **9** Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, Geneva, Switzerland

☯ These authors contributed equally to this work.
* ycarlier@ulb.ac.be

Check for updates

Donne in età fertile

Sierologia

SE Pos

Trattare

Neonato

Molecular methods are another approach for early detection of infection in the blood.
They are promising and increasingly used (particularly in Europe), though they present some limitations.
They are still economically prohibitive for routine screening in resource-limited settings [26].
False positive results may occur, particularly if samples are collected from umbilical cord blood at birth [15, 27].
They lack standardization, leading to various sensitivity levels according to the centers, and quality control programs are still not implemented enough [28].
As a consequence, molecular methods require stronger and wider clinical validations before being considered as gold standards to diagnose congenital infection.

Ricerca diretta e Follow up sierologico

Diagnosi sierologica di *Trypanosoma cruzi*

In Italia che tecniche vengono utilizzate?

Indagine conoscitiva sulla diagnostica parassitologica nei laboratori in Italia

- Hanno risposto 101 laboratori.
- 19 laboratori (18,8 %) dichiarano di essere in grado di eseguire la ricerca sierologica per *Trypanosoma cruzi*.

Immunocromatografico + CLIA IgG-IgM	1
Immunocromatografico + ELISA IgG Ag da lisato + ELISA IgG Ag ricombinante + WB	1
Immunocromatografico + ELISA IgG Ag da lisato	1
Immunocromatografico + WB	1
CLIA IgG	2
CLIA IgG-IgM	2
CLIA IgG + ELISA IgG Ag lisato + WB	1
E-CLIA IgG	1
CMIA IgG	3
ELISA IgG Ag da lisato + WB	1
ELISA IgG Ag da lisato + ELISA IgG Ag ricombinante	1
ELISA IgG Ag da lisato + CMIA IgG + WB	1
ELISA IgG Ag ricombinante	2
IFA IgG-IgM	1

Diagnosi in biologia molecolare per *Trypanosoma cruzi*

In Italia che tecniche vengono utilizzate?

Indagine conoscitiva sulla diagnostica parassitologica nei laboratori in Italia

- Hanno risposto 101 laboratori.
- 6 laboratori (5,9) %) dichiarano di essere in grado di eseguire un test in biologia molecolare per *Trypanosoma cruzi*.

PCR *home made*	4
PCR commerciale (due diverse ditte)	2

GRAZIE