XLVII Congresso Nazionale AMCLI
10-13 novembre 2018 - Palacongressi di Rimini

Malaria: applicazione delle tecniche bio-molecolari

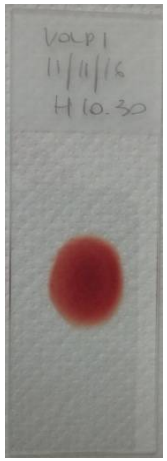
Valentina Mangano

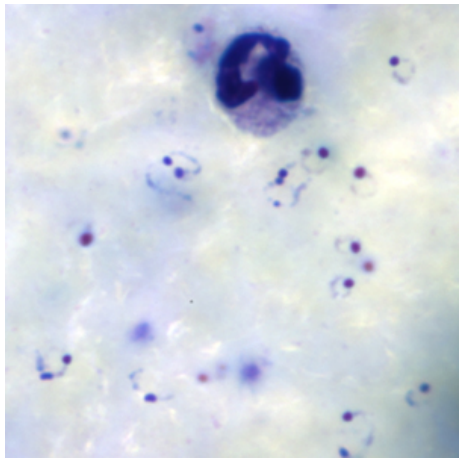
Dipartimento di Ricerca Traslazionale
Università di Pisa

Outline

- Microscopia: il metodo gold standard per la diagnosi di malaria
- Test ICT di ricerca dell'antigene: pro e contro
- Metodi molecolari: LAMP *vs* PCR
- Percorso diagnostico e refertazione: algoritmi proposti
- Oltre la diagnosi: altre applicazioni dei metodi molecolari

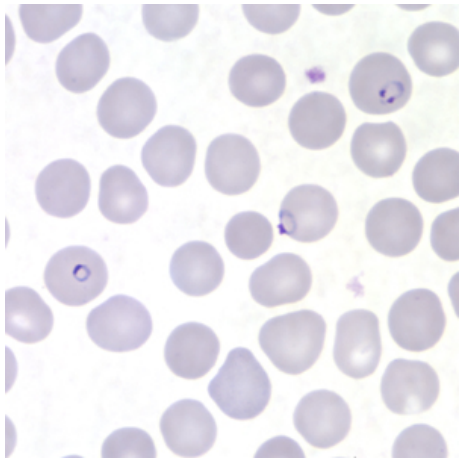
Microscopia: goccia spessa e striscio sottile





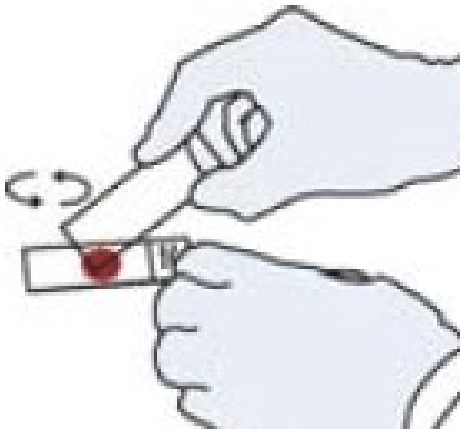
Per verificare la presenza di parassiti
LoD: 4 par/µl
Sensibilità: 50-100 par/µl, operatore-dipendente

Per stimare la densità parassitaria



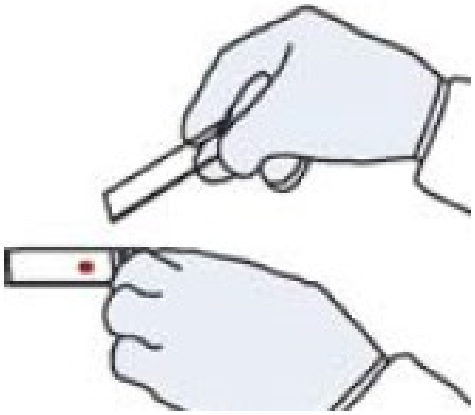
Per determinare la specie di Plasmodio

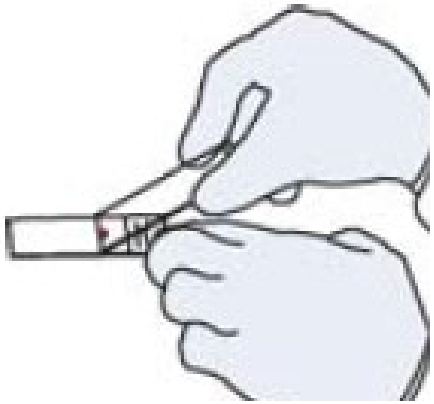
Confezione della goccia spessa

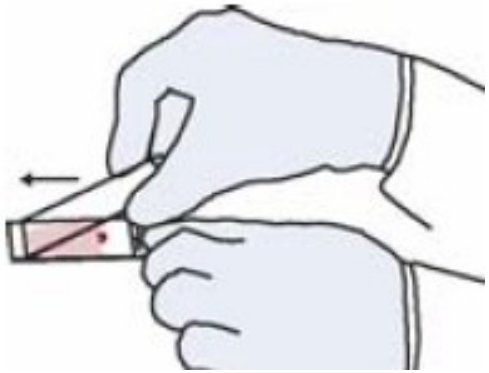


- Importante: i vetrini vanno confezionati il prima possibile dopo il prelievo di sangue e comunque entro le 24h
- Depositare 10μl di sangue al centro del vetrino
- Allargare la goccia usando un altro vetrino fino a un diametro di 1.5cm
- Lasciar asciugare a lungo (almeno 3h a 37°C)
- La completa asciugatura è importante per evitare il distacco della goccia durante la colorazione

Confezione dello striscio sottile



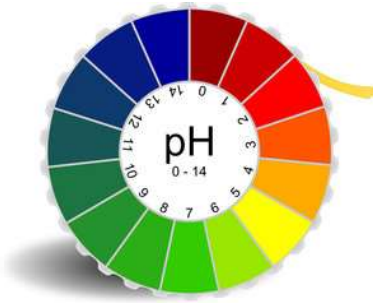




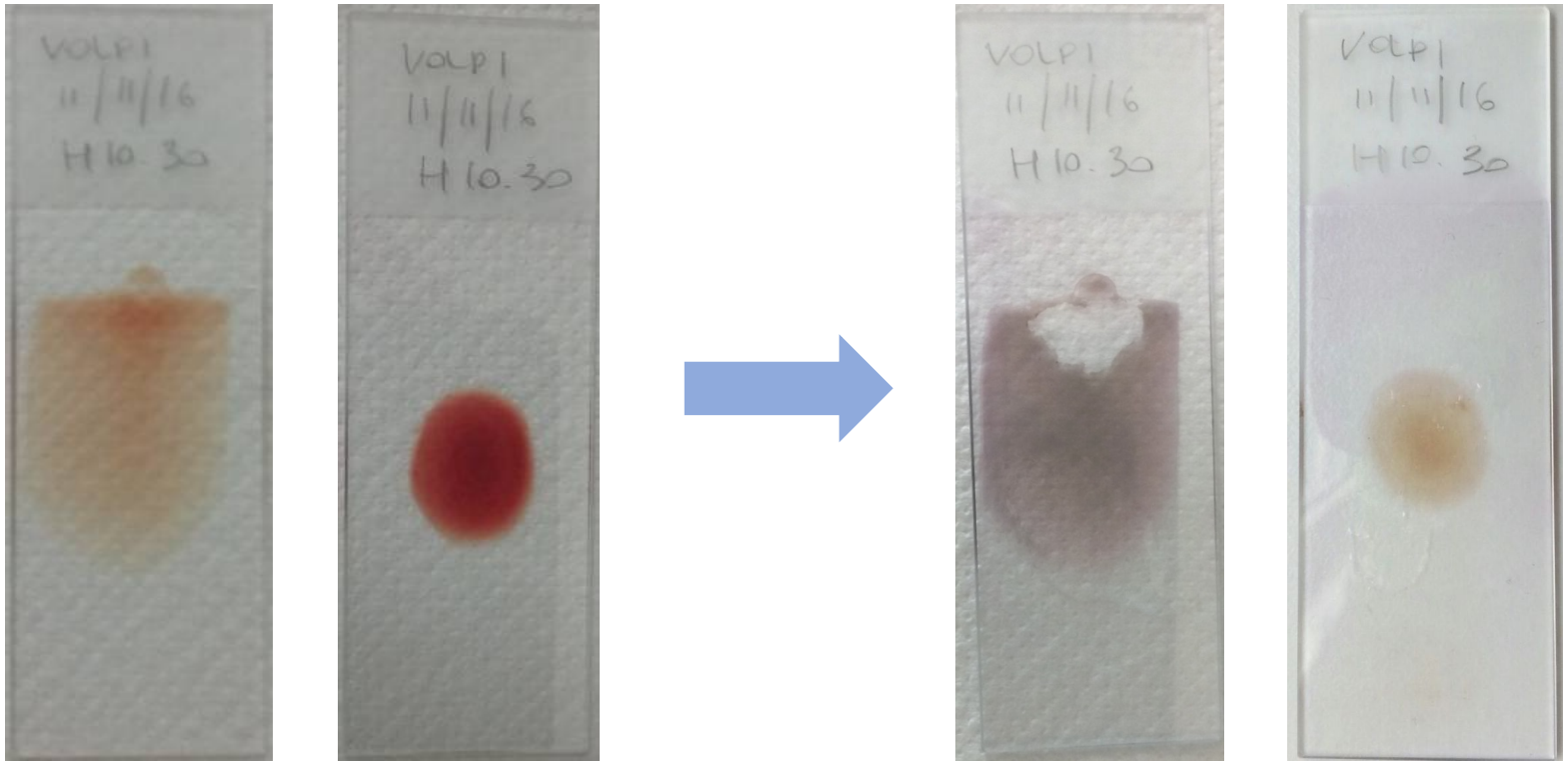
- Importante: i vetrini vanno confezionati il prima possibile dopo il prelievo di sangue e comunque entro le 24h
- Depositare 5μl di sangue all'estremità del vetrino
- Strisciare usando un altro vetrino mantenendo un'angolazione di 45°
- Lasciar asciugare
- Fissare i globuli rossi immergendo in metanolo per 5 secondi
- Lasciar asciugare

Colorazione

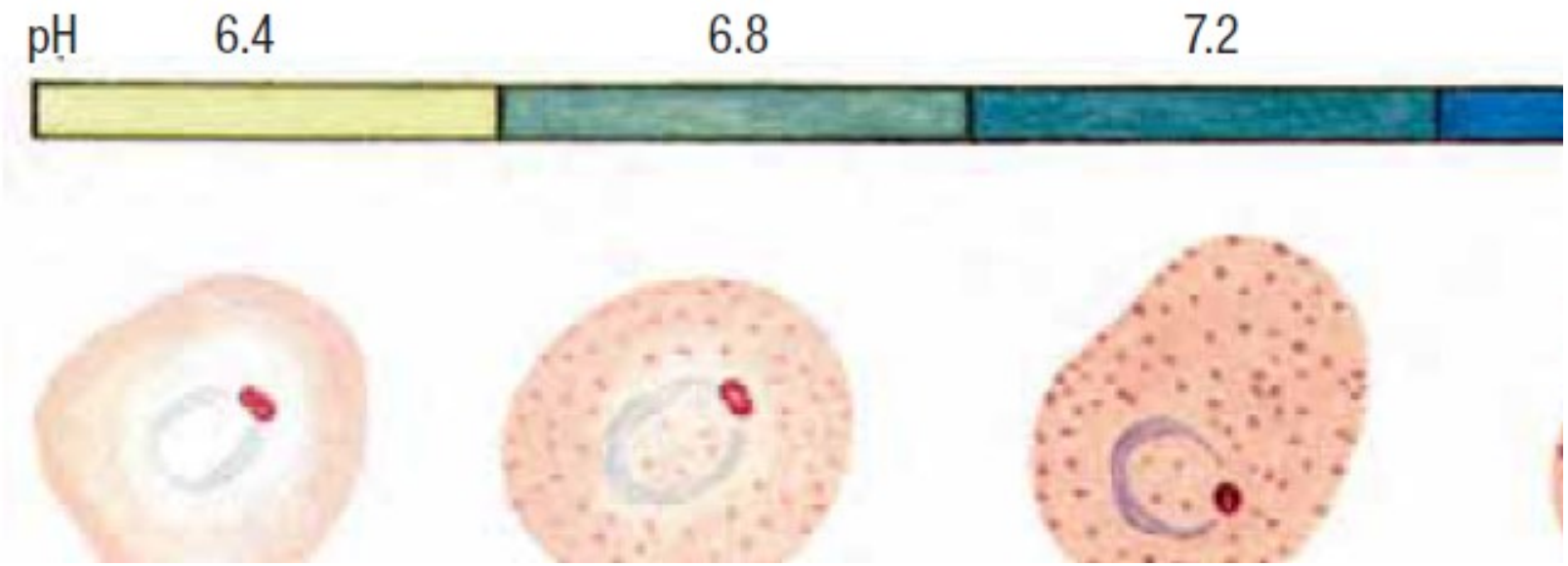
- Soluzione di Giemsa 10%:
  - miscelare 1 parte di Giemsa concentrato e 9 parti di H_2O tamponata a pH 7.2 (0.7g KH_2PO_4, 1g Na_2HPO_4, 1lt ddH_2O)
  - filtrare con filtro 0.45µm o con carta bibula
  - importante: preparare una nuova soluzione di Giemsa per ogni colorazione
- Colorazione rapida: ricoprire i vetrini con soluzione di Giemsa 10% per 5-10 minuti, risciacquare con H_2O pH7.2



Colorazione

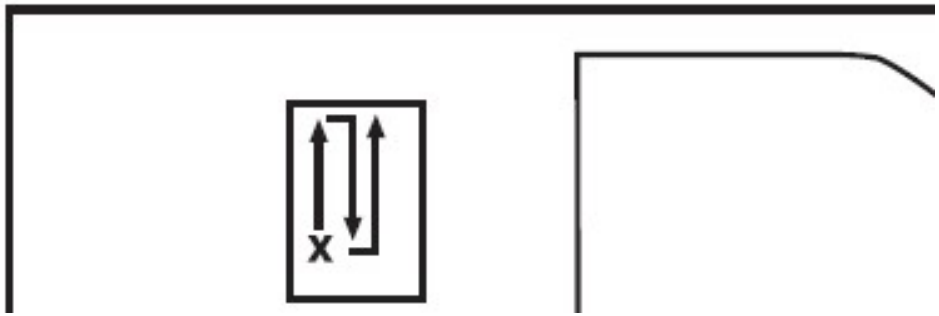


Importanza del pH

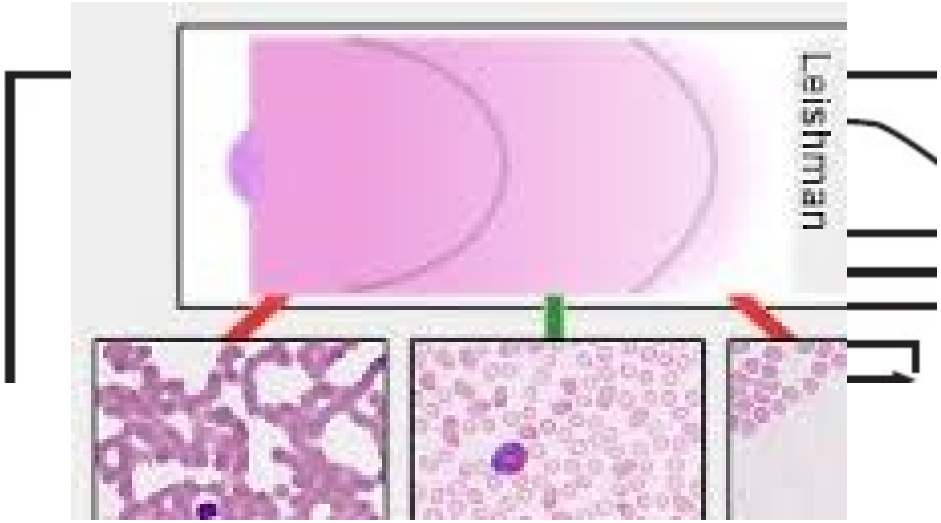


Osservazione al microscopio

Obiettivo 100X in immersione con olio



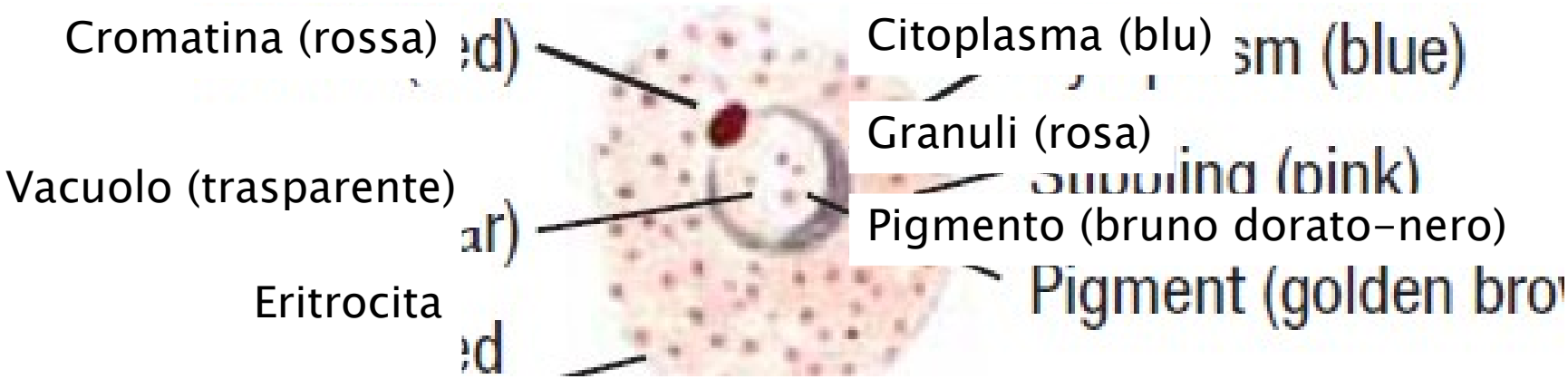
- individuare la porzione di vetrino ben colorata e con una distribuzione uniforme di 15-20 leucociti per campo
- leggere 100 campi



- individuare la porzione di vetrino ben colorata e con una distribuzione uniforme di globuli rossi non sovrapposti fra loro
- leggere i campi necessari all'identificazione di specie

Presenza del Plasmodio

- La presenza del parassita viene accertata tramite lettura della **goccia spessa**
- Se dopo la lettura di almeno <u>100 campi</u> non vengono identificati parassiti, il campione può essere definito negativo
- I plasmodi vengono identificati grazie alla distinzione delle loro caratteristiche morfologiche rispetto agli elementi figurati del sangue, artefatti e contaminanti
- Fare riferimento alle tavole dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)



Diagnosi di specie

- La diagnosi di specie viene effettuata più agevolmente sullo **striscio sottile** (fare riferimento alle tavole OMS)

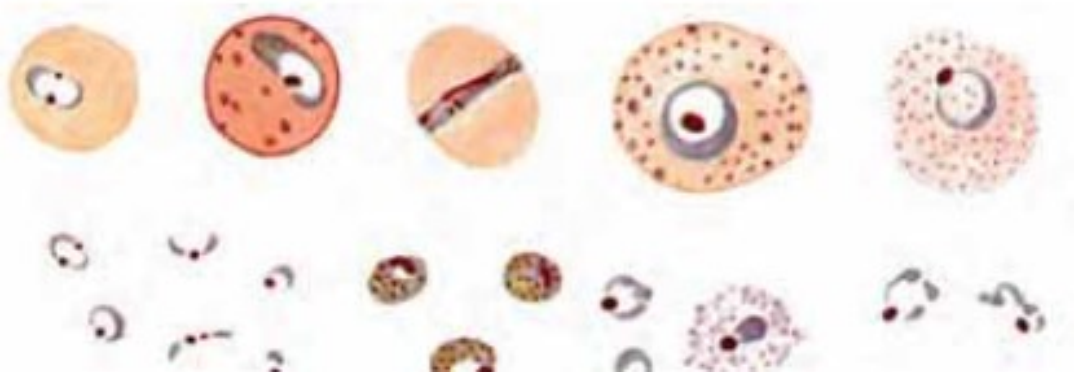
- Morfologia del **parassita**
  - Dimensione
  - Forma (es. ad anello, ameboide, compatta)
  - Citoplasma (colore, omogeneità, compattezza, presenza di vacuolo, presenza di pigmento)
  - Nucleo (numero, colorazione)

- Morfologia dell'**eritrocita infetto**
  - Dimensione (normale, ridotta, aumentata)
  - Forma (normale, ovale, perimetro irregolare)
  - Citoplasma (colore, presenza di granuli di Schüffner o di, Maurer)

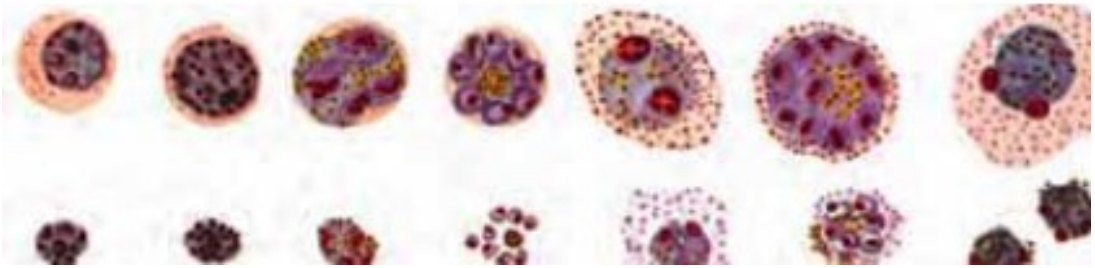
Diagnosi di specie

	P. falciparum	*P. vivax*	*P.ovale*	*P.malariae*
Trofozoita giovane	1/5 eritrocita posizione periferica spesso + trofozoiti	1/3 eritrocita a volte lobato	simile a *P.vivax* ma più compatto	grande nucleo
Trofozoita maturo	assente nel sp	molto grande	simile a *P.vivax* ma più compatto	fascia equatoriale
Eritrocita infetto	granuli di Maurer	molto ingrandito granuli di Schuffner	ingrandito granuli di Schuffner	rari i granuli di Ziemann
Schizonte	2/3 eritrocita 18 (8-24) merozoiti a rosetta assente nel sp	molto grande 16 (12-14) merozoiti	molto grande 8 (4-16) merozoiti	100% eritrocita 8 (6-12) merozoiti a rosetta pigmento
Gametocita ♂	a falce	grande e tondo	tondo, + piccolo	grande e tondo
Gametocita ♀	a falce	grande e tondo	tondo, + grande	grande e tondo

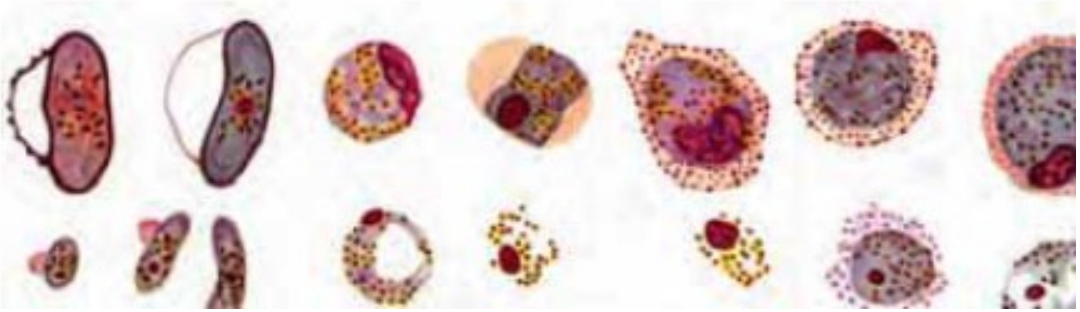
Morfologia dei diversi stadi



Trofozoiti

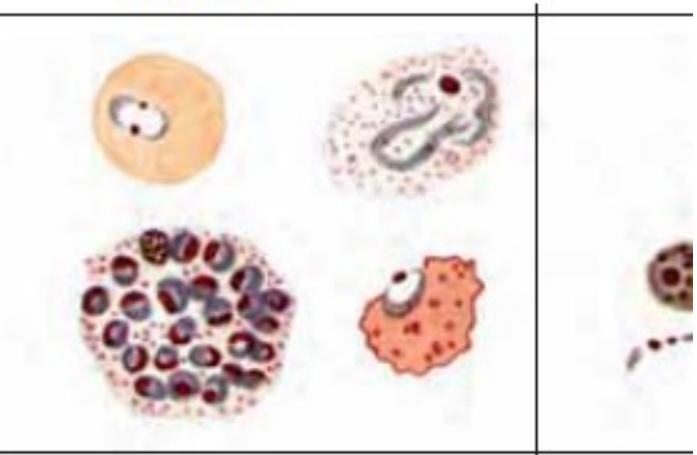
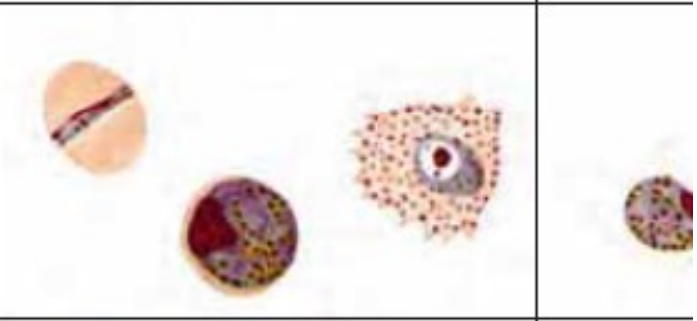


Schizonti

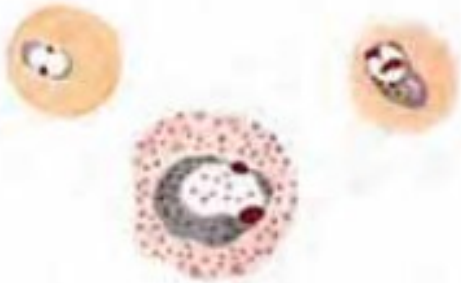


Gametociti

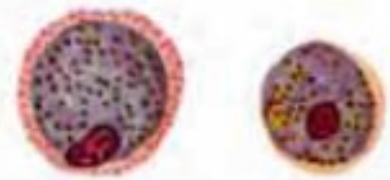
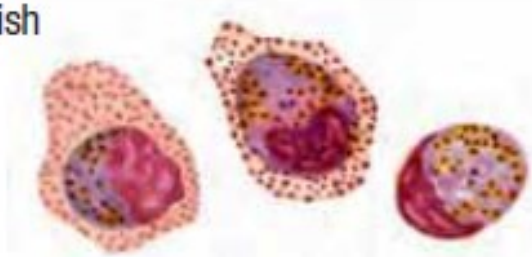
Chiavi diagnostiche

Do you see:	Thin film
1. one or more red chromatin dots with attached blue cytoplasm? Yes: Go to 2. No: What you see is not a parasite.	
2. the size and shape right for a parasite? Yes: This is probably a malaria parasite; go to 3. No: What you see is not a parasite.	
3. pigment in the 'cell'? Yes: Go to 7. No: Go to 4.	
4. one chromatin dot attached to a ring of blue cytoplasm containing a vacuole? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 5.	

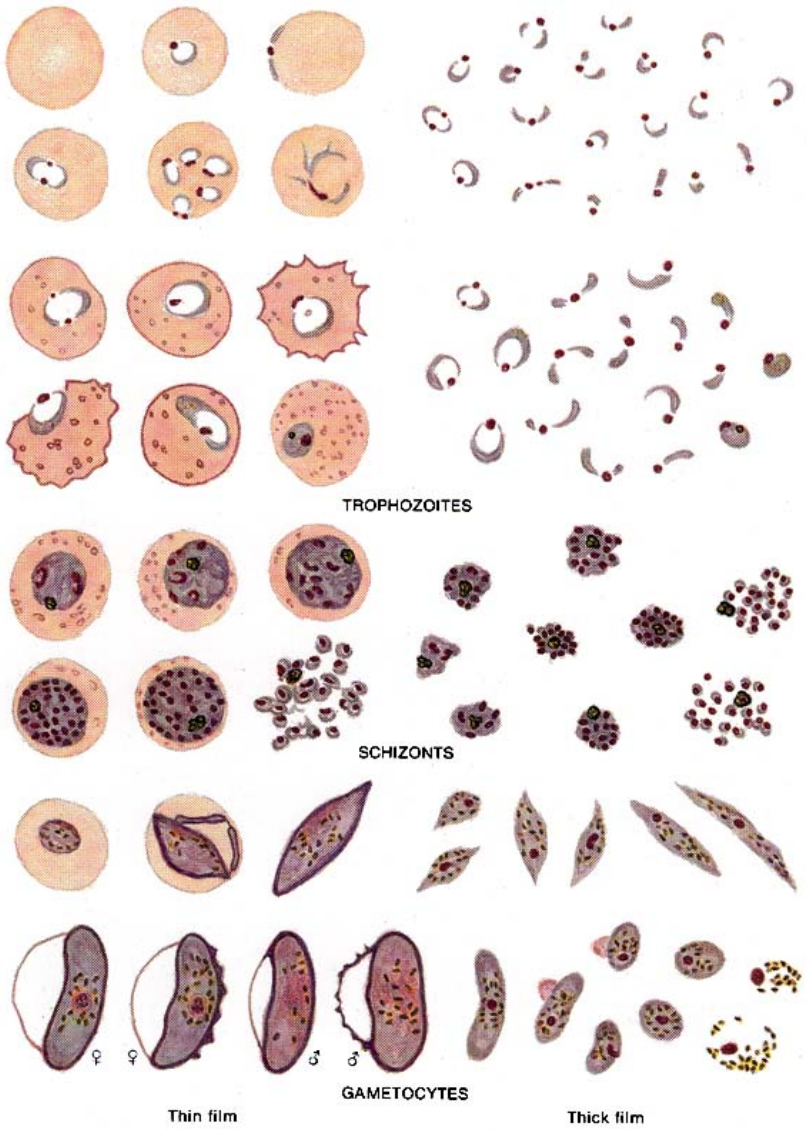
Chiavi diagnostiche

Do you see:	Thin film	Thick film
6. one chromatin dot and irregular or fragmented blue cytoplasm? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 8.		
7. a chromatin dot in the parasite with pigment? Yes: Go to 8.		
8. a vacuole in the parasite or cytoplasm that is fragmented in some way? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 11.		
9. two chromatin dots attached to a ring of cytoplasm and a vacuole? Yes: This is a trophozoite. No: Go to 10.		
10. 2–32 chromatin dots and pigment?		

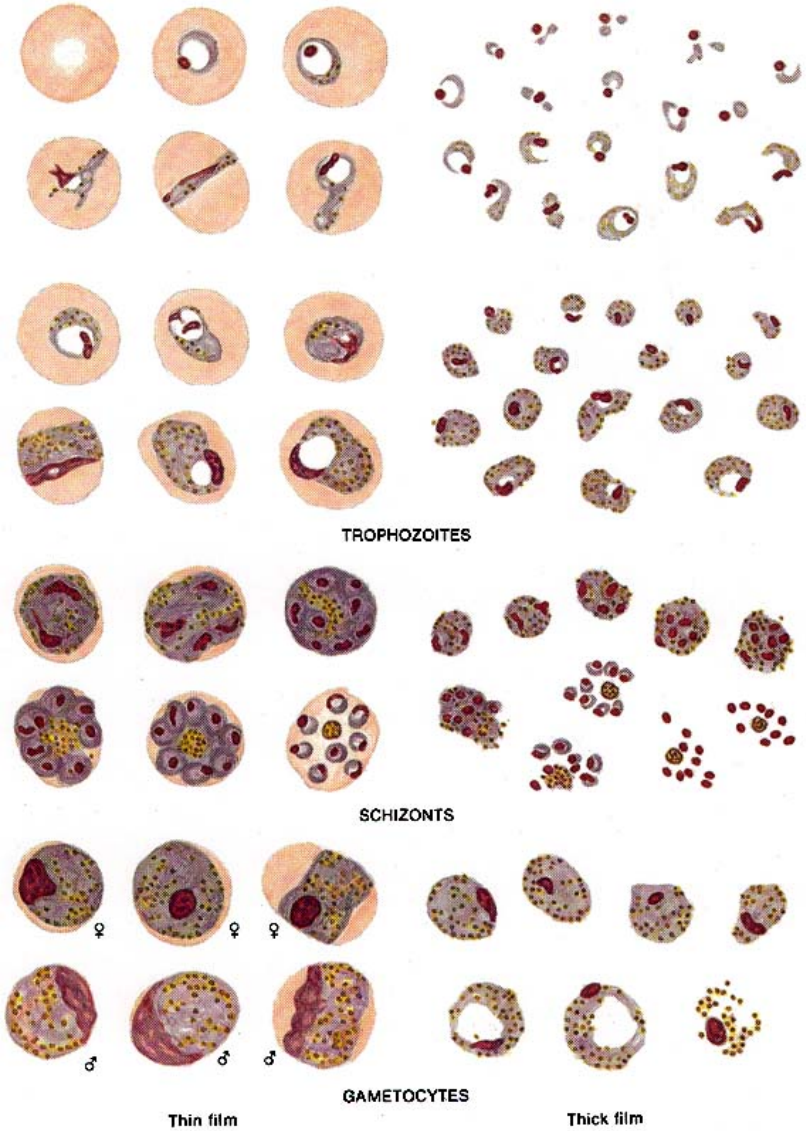
Chiavi diagnostiche

Do you see:	Thin film	Thick film
11. a rounded or a banana shape? Rounded: Go to 12. Banana-shaped: Go to 14.		
12. clear-red chromatin and deep-blue cytoplasm in the rounded body? Yes: This is a female gametocyte. No: Go to 13.		
13. that the rounded body has stained a reddish colour so that the chromatin is not clear? Yes: This is a male gametocyte.		It is difficu between n gametocyt
14. a banana-shaped parasite with densely stained blue cytoplasm and bright red chromatin? Yes: This is a female gametocyte. No: Go to 15.		

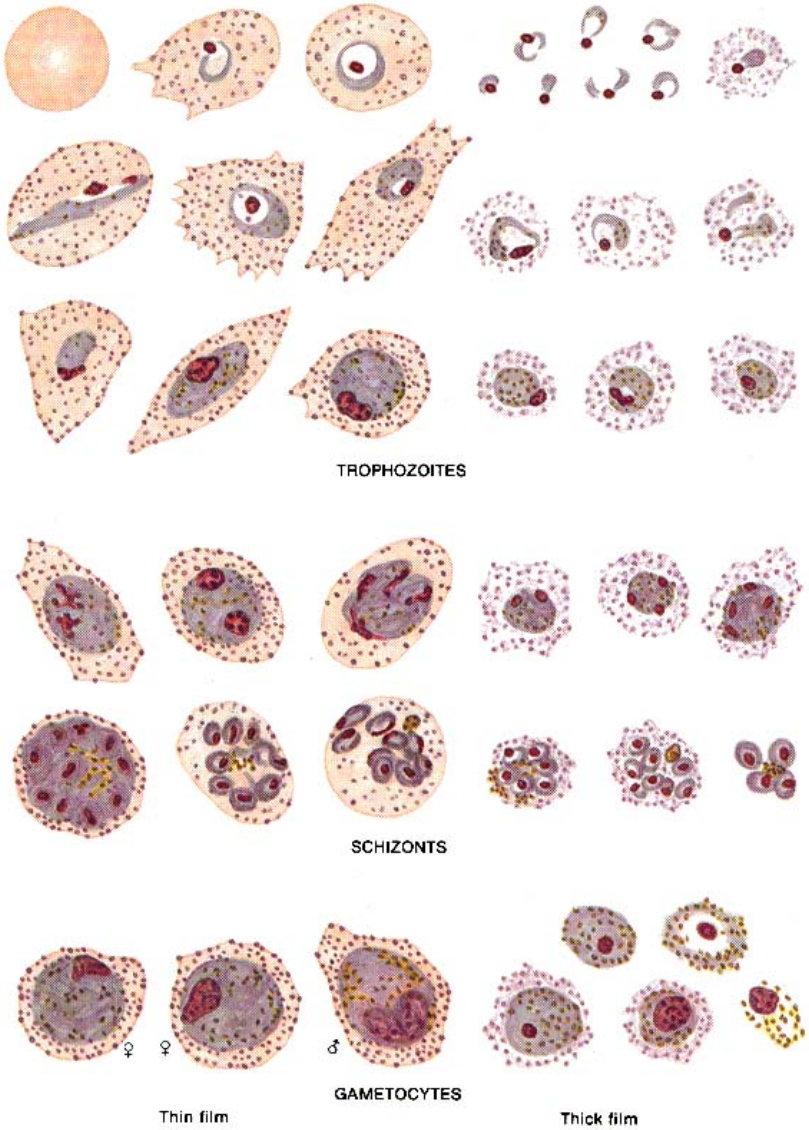
P. falciparum



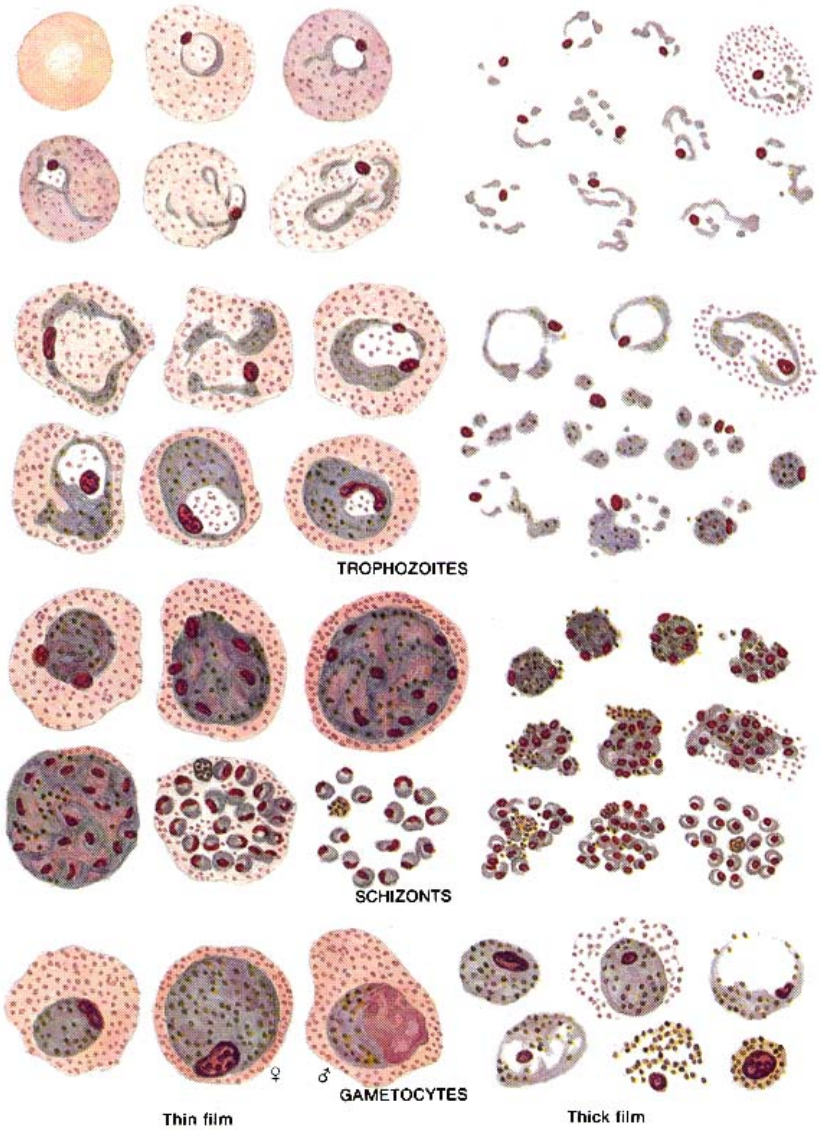
P. malariae



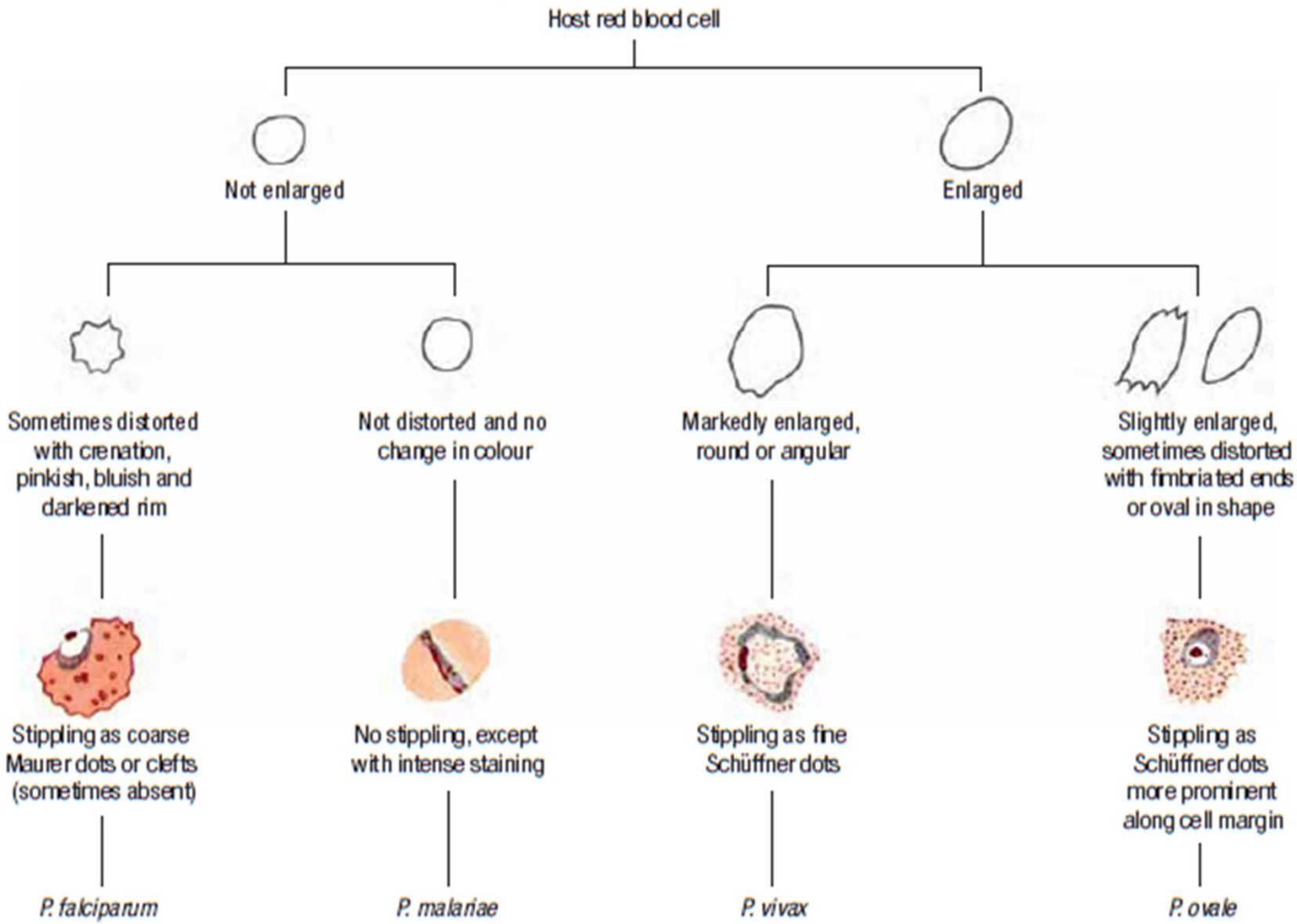
P. ovale



P. vivax



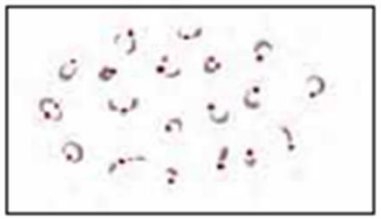
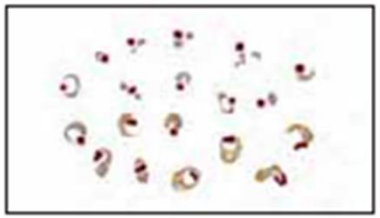
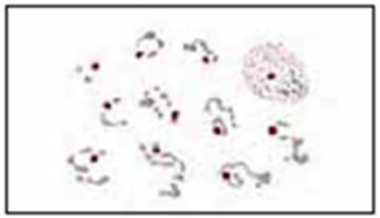
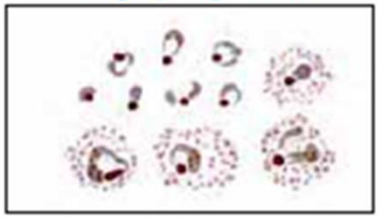
Malaria species differentiation in thin films



Malaria species differentiation in thin films using host-cell changes and presence of stippling (Giemsa stain)

Differentiation of malaria parasite species in thick films

Trophozoite

- Regular cytoplasm
  - Uniform
    - 
    - Associated stages: banana-shaped or rounded gametocytes with rice-grain-like dark pigment, sometimes with pinkish extrusion body or "tongue" (schizonts usually not seen except in health infection with many ring forms)
    - *P. falciparum*
  - Compact
    - 
    - (abundant pigment with yellow tinge in older forms)
    - Associated stages: schizonts and gametocytes usually seen
    - *P. malariae*
- Irregular cytoplasm
  - Markedly fragmented
    - 
    - (fragmented cluster)
    - Associated stages: schizonts and gametocytes usually seen
    - "Ghost" or host cells, with faint Schüffner's dots seen at film edge
    - *P. vivax*
  - Slightly fragmented
    - 
    - Associated stages: schizonts and gametocytes usually seen
    - "Ghost" or host cells, with prominent Schüffner's dots seen at film edge
    - *P. ovale*

Malaria species differentiation in thick films based on patterns of cytoplasm and stippling in trophozoites (Giemsa stain)

Densità parassitaria

- Importante per valutare la **gravità dell'infezione** e la **risposta al trattamento farmacologico**

- Deve sempre essere stimata per *P. falciparum*

- Di norma viene stimata a partire dalla **goccia spessa**
  - leggere 100 campi microscopici popolati da 15-20 leucociti ciascuno
  - contare il numero di parassiti osservati
  - contare il numero di leucociti osservati
  - assumendo una conta leucocitaria di 8000 leucociti/μl di sangue o utilizzando la conta leucocitaria del paziente si ottiene il numero di parassiti per μl:

$$\text{N parassiti}/\text{N WBC X N WBC}/\mu\text{l} = \text{N parassiti}/\mu\text{l}$$

Densità parassitaria

- Importante per valutare la **gravità dell'infezione** e la **risposta al trattamento farmacologico**

- Deve sempre essere stimata per *P. falciparum*

- In caso di alte densità parassitarie (>5000 par/μl) può essere stimata a partire dallo **striscio sottile**
  - leggere 20 campi microscopici
  - contare il numero di emazie parassitate osservate
  - contare il numero totale di emazie osservate
  - dividere il numero di emazie parassitate per il totale
  - si ottiene la percentuale (%) di emazie parassitate:

$$\text{N iRBC} / \text{N RBC} = \%\ \text{iRBC}$$

Test ICT di ricerca dell'antigene

- Test immunocromatografici a flusso laterale
- Ricerca di antigene di Plasmodio nel sangue periferico
- Consigliati dall'OMS in Africa Sub-Sahariana per la diagnosi di malaria quando la microscopia non è disponibile – «test before treat»
- Più di 200 prodotti disponibili in commercio

World Health Organization

Test ICT di ricerca dell'antigene

- Test immunocromatografici a flusso laterale
- Ricerca di antigene di Plasmodio nel sangue periferico
- Consigliati dall'OMS in Africa Sub-Sahariana per la diagnosi di malaria quando la microscopia non è disponibile – «test before treat»
- Più di 200 prodotti disponibili in commercio

HRP
Histidine Rich Protein
Ag Pf-specifico
Maggiore sensibilità
Permane in circolo >2 settimane post-trattamento

pLDH
Plasmodium Lactate DeHydrogenase
Ag Pf/Pv/Pan
Maggiore specificità
Presente in circolo solo quando il parassita è vitale

Test ICT di ricerca dell'antigene

Pro

- Facilità di esecuzione
- Non richiede strumentazione
- Risultato in 15 minuti
- Sensibilità ottimale per *P. falciparum* a densità parassitarie >200 par/µl

<u>Utilità in aree endemiche per la diagnosi rapida point of care</u>

- Diagnosi differenziale delle sindromi febbrili a livello comunitario

malaria o polmonite?

Test ICT di ricerca dell'antigene

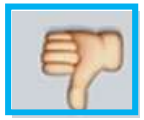
Pro

- Facilità di esecuzione
- Non richiede strumentazione
- Risultato in 15 minuti
- Sensibilità ottimale per *P. falciparum* a densità parassitarie >200 par/µl

<u>Utilità in aree endemiche per la diagnosi rapida point of care</u>

- Diagnosi differenziale delle sindromi febbrili a livello comunitario
- Trattamento corretto
- Limitare la selezione di farmacoresistenze

Test ICT di ricerca dell'antigene

Contro 

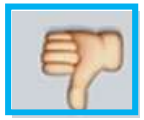
- Sensibilità ottimale per *P. falciparum* a densità parassitarie >200 par/µl
- Sensibilità variabili e sub-ottimali per le altre specie
- Numerosi report di ceppi di *P. falciparum* HRP negativi

	Single infection, species			
Parasite density (/µL) Number	*P. falciparum*	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*
0–100	105	4	16	4
101–500	132	18	34	3
501–5 000	294	86	63	25
5 001–250 000	512	82	14	7
>250 000	66	1	0	0
Total	1109	191	127	39
Cumulative (%)				
≤ 100	9.5	2.1	12.6	10.3
>100	90.5	97.9	87.4	89.7
>500	78.6	88.5	60.6	82.1
>5 000	52.1	43.5	11	17.9
>250 000	6	0.5	0	0

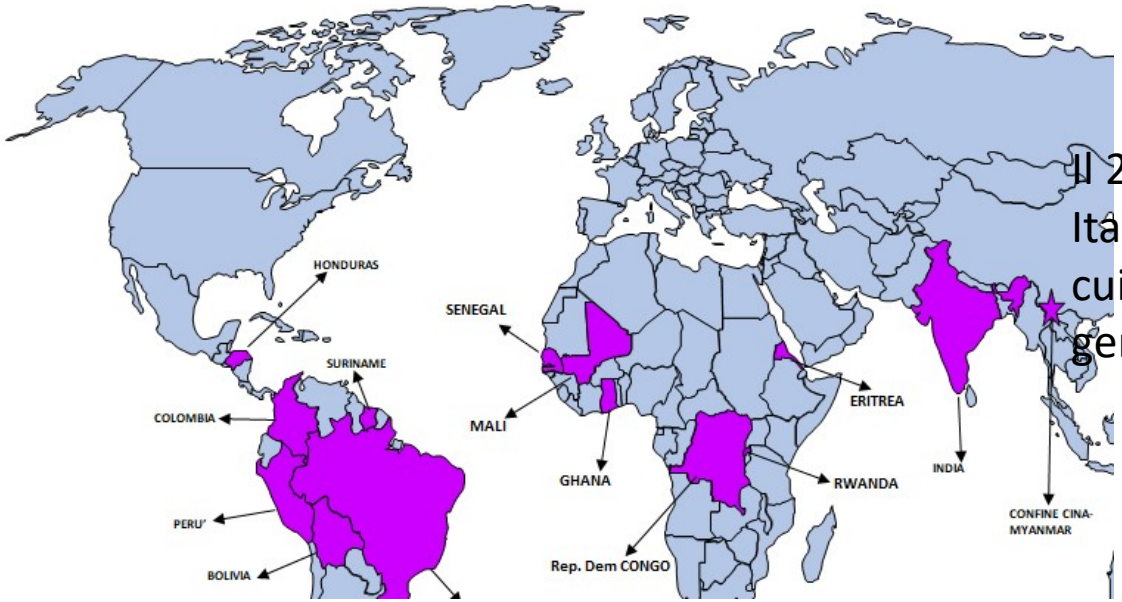
Il 10% dei casi clinici da *P. falciparum* in area non endemica ha densità parassitarie <100 par/µl

Martha et al. *Clinical Microbiology and Infection* 2013

Test ICT di ricerca dell'antigene

Contro 

- Sensibilità ottimale per *P. falciparum* a densità parassitarie >200 par/µl
- Sensibilità variabili e sub-ottimali per le altre specie
- Numerosi report di ceppi di *P. falciparum* HRP negativi



Il 20% dei casi clinici da *P. falciparum* in Itália (2011-16) provengono da paesi in cui sono state riscontrate delezioni nei geni HRP2 e HRP3

Cortesia di M. Menegon (ISS)

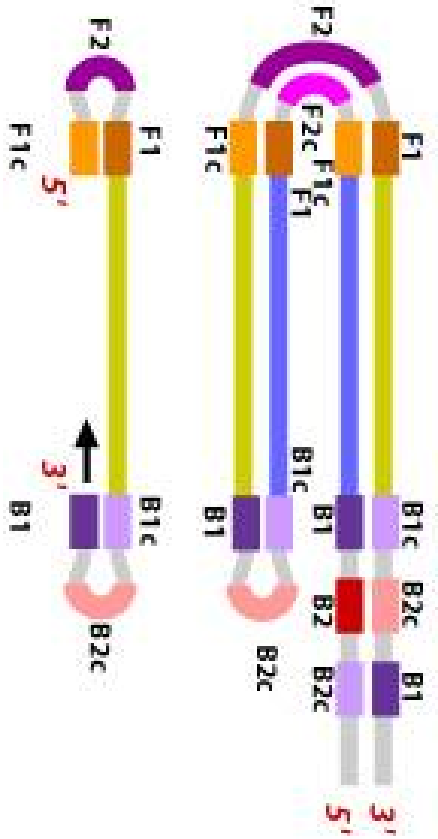
Test ICT di ricerca dell'antigene

Contro

- Sensibilità ottimale per *P. falciparum* a densità parassitarie >200 par/µl
- Sensibilità variabili e sub-ottimali per le altre specie
- Numerosi report di ceppi di *P. falciparum* HRP negativi

<u>Rischio significativo di falsi negativi in aree non-endemiche</u>

Metodi molecolari

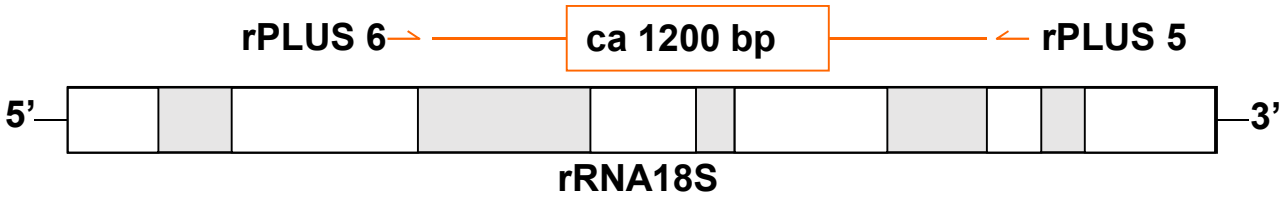


- Amplificazione di sequenze di DNA o RNA del parassita tramite PCR o LAMP
- Sensibilità superiore alla diagnosi microscopica
- Permettono di identificare la infezioni a bassa densità parassitaria
- Possono essere utilizzati per:
  - la diagnosi di infezione
  - l'identificazione di marker molecolari di farmacoresistenza
  - la tipizzazione dei cloni plasmodiali

Diagnosi di infezione

Target: gene che codifica per <u>RNA ribosomale della subunità minore</u> (rRNA18S)

1ª Amplificazione: Genere-Specifica



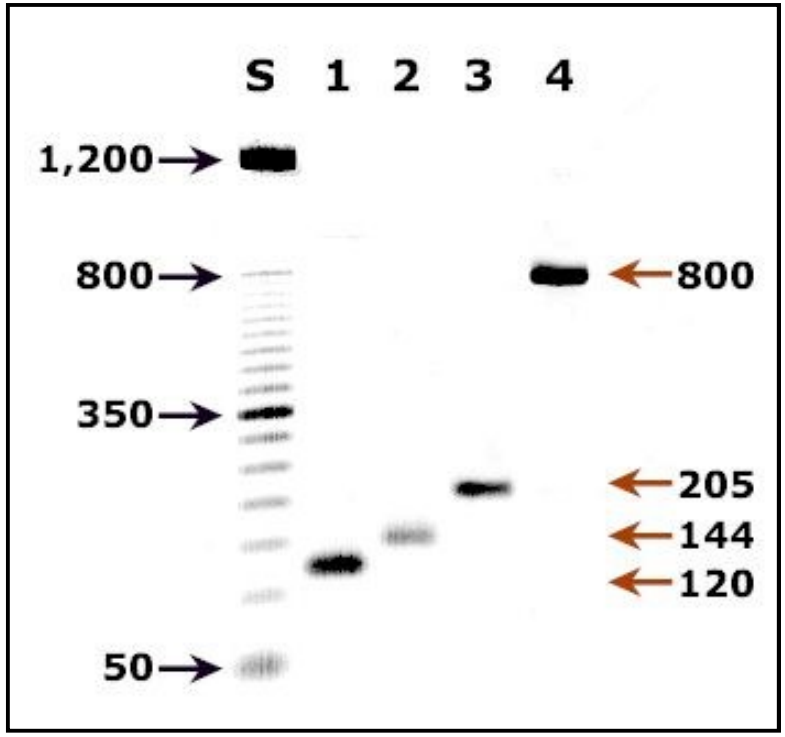
2ª Amplificazione: Specie-Specifica

Snounou et al. *Mol Biochem Parasitol* 1993

cortesia di M.Menegon, ISS

Diagnosi di infezione

Gel di agarosio al 2%



P.ovale

P.falciparum

P.malariae

P.vivax

Snounou et al. *Mol Biochem Parasitol* 1993

Metodi basati sulla PCR

PCR SINGLE- STEP

Study	ecificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)
Al-Harthi 2008	0.94 [0.84, 0.99]	
Aslan 2007	1.00 [0.94, 1.00]	
* Barman 2003	1.00 [0.96, 1.00]	
* Barman 2003	1.00 [0.95, 1.00]	
Boonma 2007	0.89 [0.77, 0.96]	
* Carrasquilla 2000	0.80 [0.76, 0.84]	
Datta 2010	1.00 [0.85, 1.00]	
Dawoud 2008b	0.82 [0.65, 0.93]	
Gaye 1999	0.73 [0.59, 0.84]	
* Haghdoost 2006	0.97 [0.91, 0.99]	
* Hwang 2011	0.00 [0.00, 0.11]	
Menge 2008	0.75 [0.69, 0.80]	
Montoya 2008	0.97 [0.85, 1.00]	
* Nandwani 2005	1.00 [0.99, 1.00]	
Ogbolu 2012	1.00 [0.98, 1.00]	
Puri 2013	1.00 [0.96, 1.00]	
Runsewe-Abiodun 2(	0.95 [0.88, 0.99]	

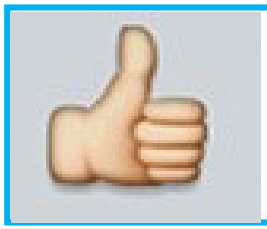
NESTED-PCR

Study	ecificity (95% CI)	Sensitivity (95% C
Andrade 2010	0.81 [0.74, 0.87]	
* Anthony 2013	1.00 [0.74, 1.00]	
* Anthony 2013	1.00 [0.74, 1.00]	
Boonma 2007	0.89 [0.77, 0.96]	
Costa 2008	0.48 [0.42, 0.55]	
Ebrahimzadeh 20(	0.27 [0.11, 0.50]	
* Ebrahimzadeh 20(	0.27 [0.11, 0.50]	
Genc 2010	0.81 [0.67, 0.91]	
* Hwang 2011	0.00 [0.00, 0.11]	
Kuamsab 2012	0.90 [0.81, 0.95]	
Kumudunayana 2(	0.92 [0.87, 0.96]	
Lee 2012	0.78 [0.67, 0.86]	
Menge 2008	0.79 [0.74, 0.83]	
Mens 2007	0.88 [0.84, 0.92]	
Nicastri 2009	0.97 [0.95, 0.99]	
Nwakanma 2009	0.95 [0.92, 0.97]	
Osman 2010	0.95 [0.91, 0.98]	
Pakalapati 2013b	0.97 [0.92, 0.99]	
* Parajuli 2009	0.78 [0.52, 0.94]	
Postigo 1998	0.81 [0.63, 0.93]	
Singh 2013	0.94 [0.71, 1.00]	
Tao 2011	1.00 [0.88, 1.00]	

REAL TIME-PCR

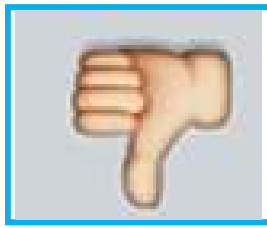
Study	cificity (95% CI)	Sensitivity (95% C
** Alam 2011	0.98 [0.96, 0.99]	
** Alam 2011	0.98 [0.94, 0.99]	
Boonma 2007	0.89 [0.77, 0.96]	
Chaudry 2012	0.90 [0.73, 0.98]	
Cheng 2013	0.98 [0.94, 1.00]	
Chou 2012	0.95 [0.92, 0.96]	
Dawoud 2008a	0.80 [0.61, 0.92]	
Elahi 2013	0.99 [0.95, 1.00]	
Genc 2010	0.75 [0.60, 0.86]	
* Hwang 2011	0.00 [0.00, 0.11]	
Khan 2013	0.93 [0.89, 0.96]	
Nkrumah 2010	0.64 [0.59, 0.70]	
Rakotonirina 20	0.98 [0.95, 0.99]	
Ratsimbasoa 20	0.78 [0.73, 0.82]	
Swan 2005	1.00 [0.48, 1.00]	

Roth et al. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016



Alta sensibilità

0.004-5 parassiti/µl di sangue



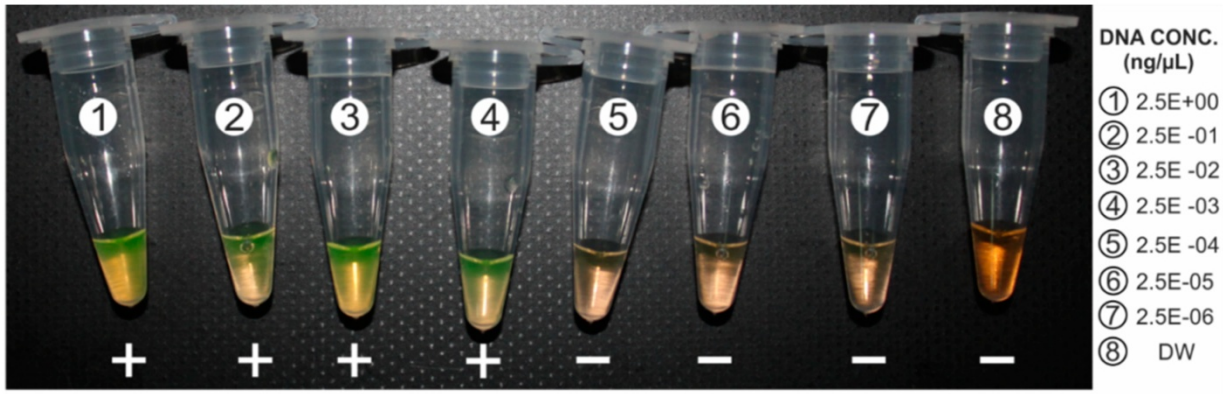
Richiedono particolare esperienza e competenza del personale tecnico

cortesia di M.Menegon, ISS

LAMP *vs* PCR

Loop-mediated AMPlification *vs* Polymerase Chain Reaction

- Reazione isotermica → non richiede termociclatore
- Uso di 4-6 primers → elevata specificità
- I loop primers accelerano la reazione
- L'amplificazione determina la produzione di $Mg_2P_2O_7$ → torbidità
- La rilevazione avviene tramite torbidometro o a occhio nudo quando accoppiata con un colorante
- Più economica, veloce e di semplice esecuzione



Notomi et al. *Nucleic Acids Res* 2000

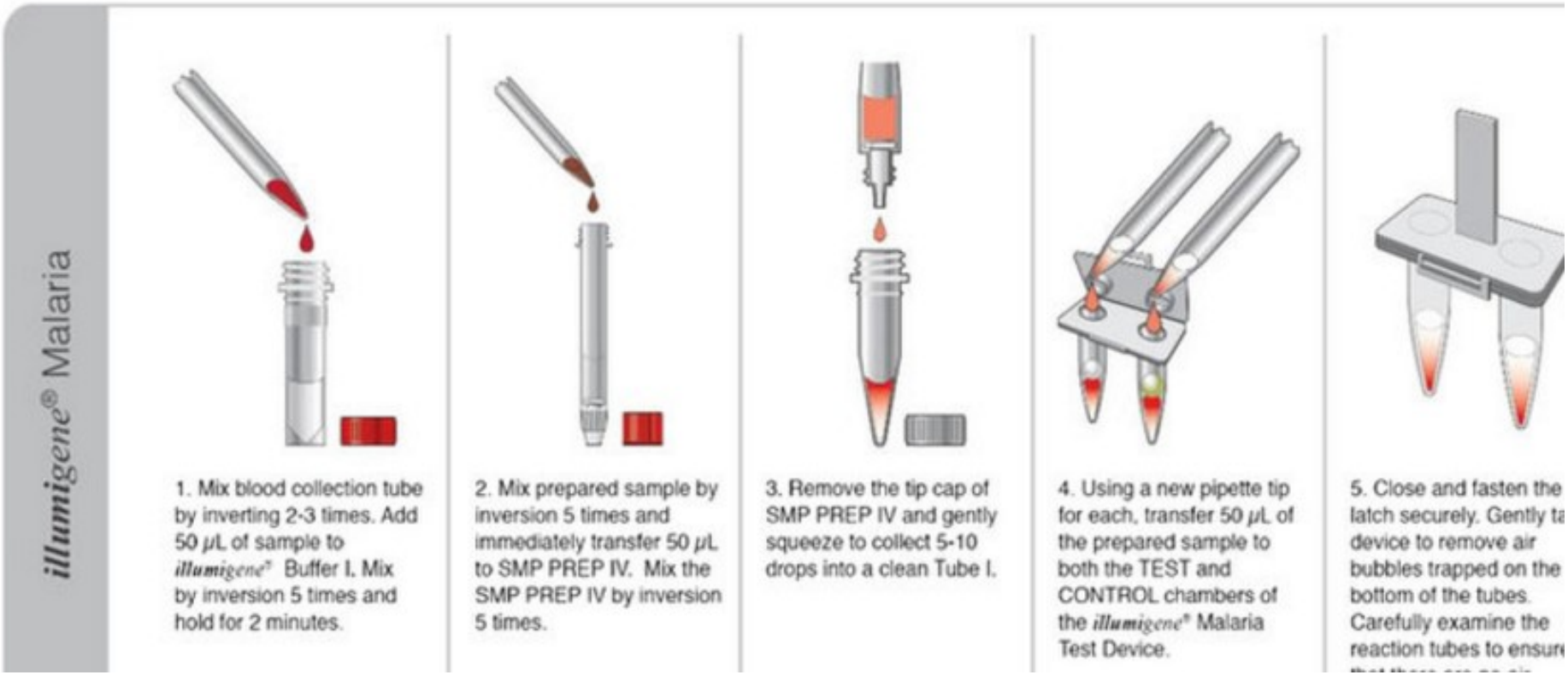
Saggi LAMP per la diagnosi di malaria

- Sono stati messi a punto diversi saggi LAMP per la diagnosi di malaria
- Due kit commerciali
  - ➢ Loopamp MALARIA kit (Eiken Chemical Co.)
  - ➢ Illumigene Malaria LAMP (Meridian Bioscience Inc.)

disponibile in Italia, utilizzato da 70 centri*

* Cortesia di A. Tosi, Meridian

Illumigene malaria LAMP



1. Estrazione del DNA da sangue intero in EDTA per lisi e filtrazione
2. Trasferimento del campione nelle provette di reazione (test e controllo), già complete dei reagent LAMP
3. Amplificazione di una sequenza di 214 bp di DNA mitocondriale non codificante comune alle 5 specie di Plasmodio, e misurazione della torbidità (40 minuti)

Illumigene malaria LAMP

Performance in aree non-endemiche rispetto alla PCR

Studio	Paese	N	SE (%)	SP (%)	LoD Pf (par/µl)	Metodo di riferimento
De Koninck 2017	Belgium	115	100	100	0.5	Mic, RDT, qPCR
Rypien 2017	Canada	140	97.3	93.8	na	Mic, qPCR
Ponce 2017	France	310	100	98.13	0.1	qPCR
Frickmann 2018	Germany	1000	98.7	99.6	na	Mic, qPCR
Charpentier 2018	France	330	97.2	99.6	na	qPCR
Martin 2018	Spain	115	98.8	94.7	0.01	qPCR

- Sensibilità ~ PCR
- Valore predittivo negativo ~ 100%

<u>Un risultato negativo esclude l'infezione e non richiede ulteriori indagini</u>

Illumigene malaria LAMP

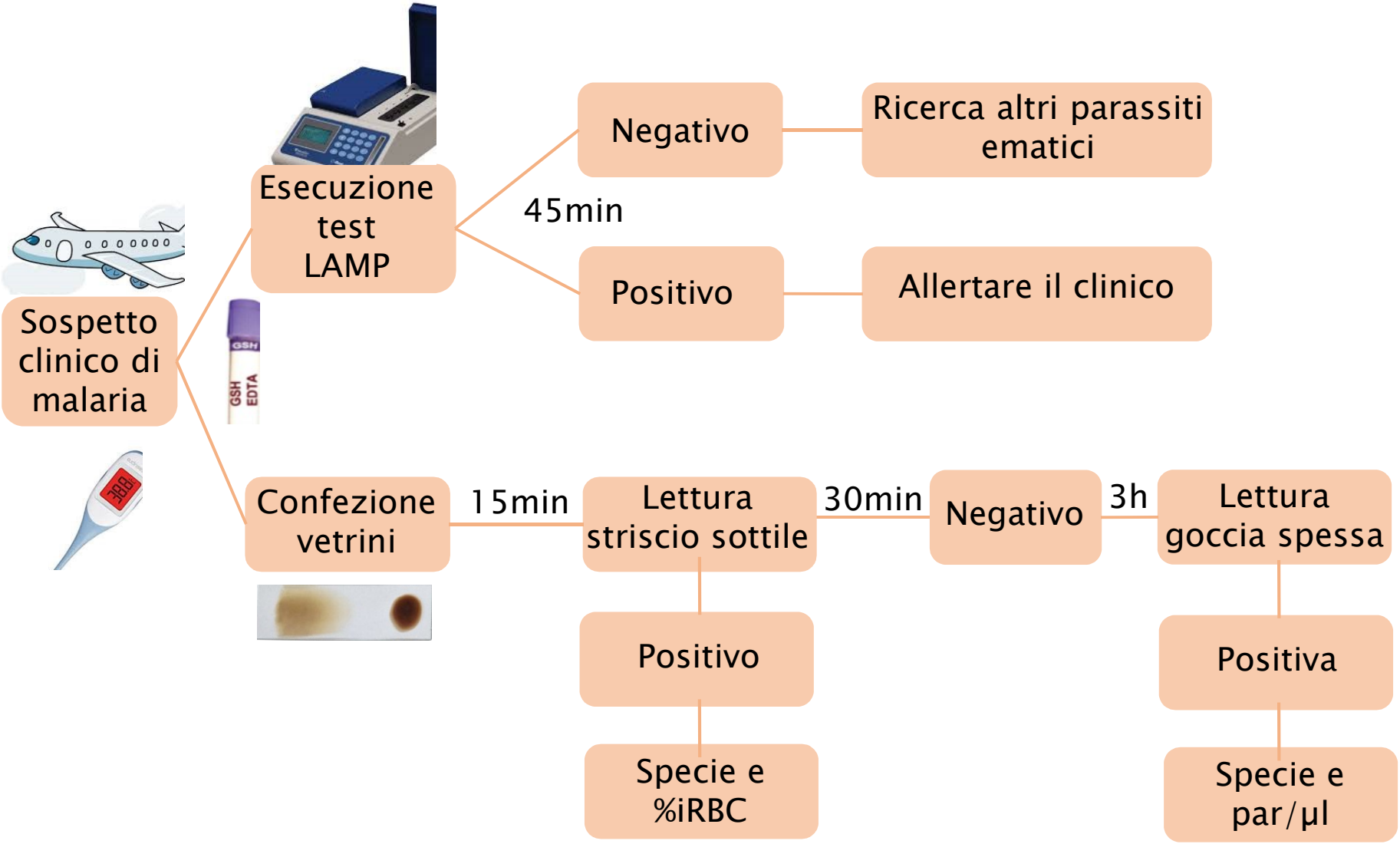
Confronto con gli altri metodi diagnostici

Caratteristica	Microscopia	RDT	qPCR	LAMP
Facilità di esecuzione	+	+++	+	++
Tempo necessario	>3 ore	15 minuti	>3 ore	45 minuti
Sensibilità	++	+	+++	+++
Diagnosi di specie	Si	Pf/non-Pf	Si	Illumigene: No Loopamp: Pf/non-Pf
Densità parassitaria	Si	No	No *	No

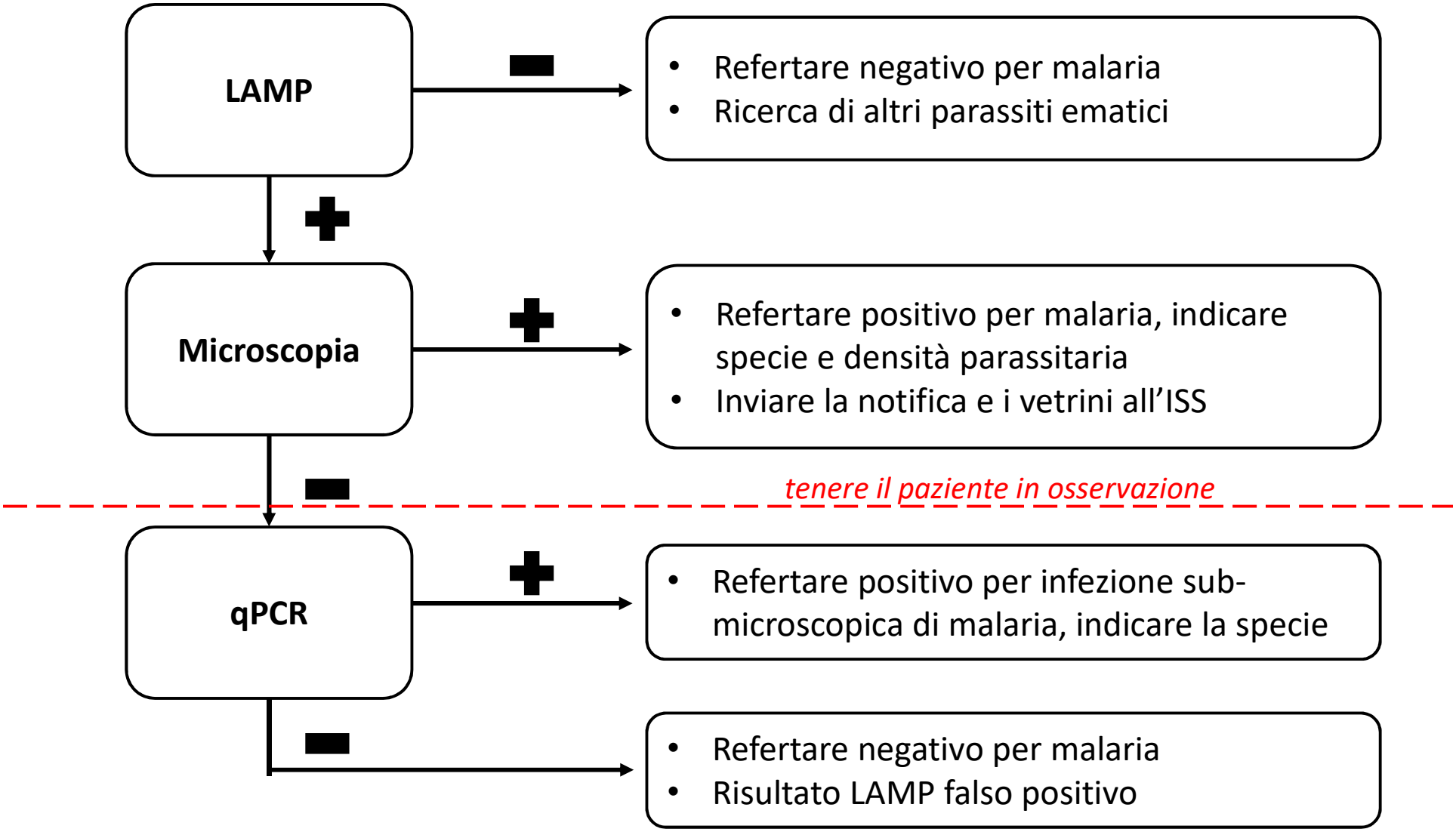
* Il risultato quantitativo permette di monitorare il successo della terapia

Può essere impiegato come primo test nel percorso diagnostico

Percorso diagnostico



Algoritmo diagnostico



Notifica

- Obbligatoria (D.M. 15/11/1990)
- Segnalazione alla Direzione Sanitaria
- Notifica a:
  - ➢ Ministero della Salute
  - ➢ Dip. Malattie Infettive ISS
  - ➢ Assessorato Sanità Regione
  - ➢ ASL
- Invio dei vetrini all'ISS
- Entro 5 giorni dalla diagnosi per i casi importati
- Entro 24h per i casi sospetti autoctoni

<u>Conferma e indagine epidemiologica</u>

Inviare a:
Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Regione, Autorità sanitaria locale

Mod.15 - Sanità Pubblica - modificato
Classe III

SCHEDA PER LA NOTIFICA E L'INCHIESTA EPIDEMIOLOGICA SU CASO DI MALARIA
☐ IMPORTATA ☐ INDOTTA ☐ AUTOCTONA

REGIONE _____ PROVINCIA _____
COMUNE _____ ASL _____ COD.ASL _____

Sezione A

COGNOME _____ NOME _____ SESSO ☐ maschio ☐ femmina

ETA' COMPIUTA ALL'INIZIO DELLA MALATTIA: [___] [___]
< 1 anno. Da 0 a 11 mesi ≥ 1 anno. Da 1 a 99 anni >99 indicare 99

CITTADINANZA _____

CODICE SSN |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_| PROFESSIONE_____

INDIRIZZO DOMICILIO ABITUALE _____
STATO DI RESIDENZA_____

SE RESIDENTE IN ITALIA INDICARE COMUNE _____ PROV. [___]

ASL DI RESIDENZA _____ COD. ASL RES _____

Sezione B

PAESE VISITATO _____ CONTINENTE _____
MOTIVO DEL VIAGGIO ☐ lavoro ☐ turismo ☐ rientro Paese d'origine
☐ immigrazione ☐ missione religiosa ☐ missione militare
☐ non noto ☐ altro specificare _____

DATA PARTENZA DALL'ITALIA ____/____/____ DATA RIENTRO IN ITALIA ____/____/____
DATA INIZIO SINTOMI ____/____/____ RICOVERO ☐ no ☐ si
RICOVERATO PRESSO OSPEDALE DI _____REPARTO_____
DATA RICOVERO ____/____/____ DATA DIAGNOSI CLINICA ____/____/____
DATA DIAGNOSI EMOSCOPICA ____/____/____
ESITO ☐ guarigione ☐ decesso DATA DIMISSIONE/DECESSO ____/____/____
SPECIE DI PLASMODIO ☐ P. *falciparum* ☐ P. *vivax* ☐ P. *malariae* ☐ P. *ovale*
☐ forme miste specificare_____ ☐ non specificabile
TERAPIA _____ FARMACORESISTENZA A _____
CHEMIOPROFILASSI ☐ no ☐ si ☐ si, incompleta
Se si specificare tipo chemioprofilassi_____
Note: indicare eventuale stato di gravidanza o concomitanza di altre patologie, casi di recidiva e recrudescenza
_____
Medico _____ Data compilazione ____/____/____

Sezione C (riservata all'Istituto Superiore di Sanità)

Emoscopia pervenuta _____ Emoscopia di controllo _____

Inviare a:
Ministero della Salute, Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Ufficio 5 - Prevenzione delle malattie trasmissibili e profilassi internazionale, Viale Giorgio Ribotta, 5, Roma-00144. Indirizzo di posta elettronica: malinf@sanita.it

Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie infettive, Viale Regina Elena, 299, 00161-Roma, specificando nell'intestazione "Notifica per malaria". Indirizzo di posta elettronica: sorveglianza.malaria@iss.it

Assessorato Sanità Regionale
Autorità Sanitaria Locale

Altre applicazioni dei metodi molecolari

Identificazione di marcatori di farmacoresistenza

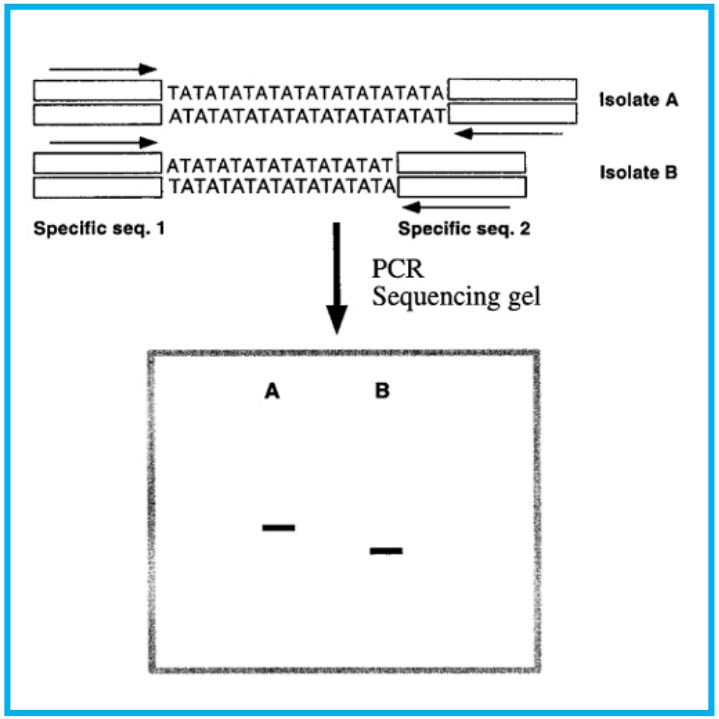
- Analisi di polimorfismi associati a resistenza ai farmaci
- Comprendere la causa dell'insuccesso terapeutico e modificare la terapia

Farmaco	*Locus*	Mutazione
Clorochina	*CRT*	+76 Lys/Thr
Pirimetamina	*PfDHFR*	+108 Ser/Asp
Sulfadosinna	*PfDHPS*	+437 Ala/Gly
Atovaquone	*PfCYTB*	+268 Tyr/Asp
Meflochina, Lumefantrina	*PfMDR1*	aumento n copie
Clorochina, Amodiachina	*PfMDR1*	+86 Gly/Tyr
Artemisinine	*PfK13*	+580 Cys/Tyr

Altre applicazioni dei metodi molecolari

Genotipizzazione dei ceppi di Plasmodio nei casi di malaria autoctona

- Analisi di geni polimorfici e/o microsatelliti per confrontare gli isolati di due casi, A e B
- Nei casi di malaria autoctona, verificare se è avvenuta trasmissione del parassita al soggetto A a seguito di contagio diretto sangue/sangue con individuo infetto B
- Nei casi di malaria neonatale, verificare se è avvenuta trasmissione verticale al feto A dalla gestante B



Screening dei donatori di sangue

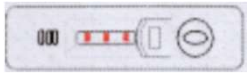
- La **malaria trasmessa da trasfusione** è un evento raro ma molto grave: 100 casi documentati in aree non-endemiche con una letalità del ~50%

- L'attuale **strategia di screening** dei donatori di sangue in Italia (l.219, D.M. 02/11/2015), in linea con le raccomandazioni OMS e CE prevede:
  1. l'identificazione dei donatori a rischio tramite questionario
  2. l'esecuzione di un test sierologico per la ricerca di anticorpi anti-Plasmodium nei donatori a rischio; l'esclusione dalla donazione per 3 anni per i soggetti con risultato sierologico positivo

Perché non sono impiegati metodi diretti?

10 iRBC can cause TTM

0.00002 par/μl

Nucleic acid amplification	Microscopy	Antigen detection
		
0.004-5 par/μl	5-100 par/μl	100-500 par/μl

Verra et al. *Malaria Journal* 2018

Screening dei donatori di sangue

- La **malaria trasmessa da trasfusione** è un evento raro ma molto grave: 100 casi documentati in aree non-endemiche con una letalità del ~50%

- L'attuale **strategia di screening** dei donatori di sangue in Italia (l.219, D.M. 02/11/2015), in linea con le raccomandazioni OMS e CE prevede:
  1. l'identificazione dei donatori a rischio tramite questionario
  2. l'esecuzione di un test sierologico per la ricerca di anticorpi anti-Plasmodium nei donatori a rischio; l'esclusione dalla donazione per 3 anni per i soggetti con risultato sierologico positivo

1

2

3

Escludere un'infezione da Plasmodium in atto

Verra et al. *Malaria Journal* 2018

Ringraziamenti

- Fabrizio Bruschi – Università di Pisa
- Michela Menegon – Istituto Superiore di Sanità
- Alessandro Bartoloni – Università di Firenze
- Romualdo Grande – Ospedale Luigi Sacco
- Annibale Raglio, Francesco Bernieri – CoSP, AMCLI