Leishmania e leishmaniasi: esperienza di applicazione del protocollo OMS

Corso Precongressuale
Diagnostica Parassitologica

Stefania Varani

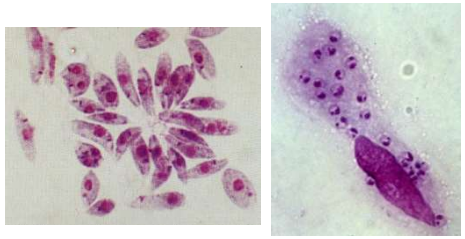
Unità Operativa di Microbiologia - Bologna

Leishmaniasi

Etiologia: -protozoo del genere *Leishmania (patogeno)*

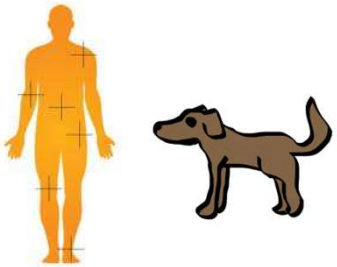
- infetta animali domestici, selvatici e l'uomo *(ospiti)*

-trasmesso tra gli animali e tra questi e l'uomo da pappataci o flebotomi (insetti ematofagi - *vettore*)



Patogeno:
Leishmania

Vettore:
Flebotomi o pappataci

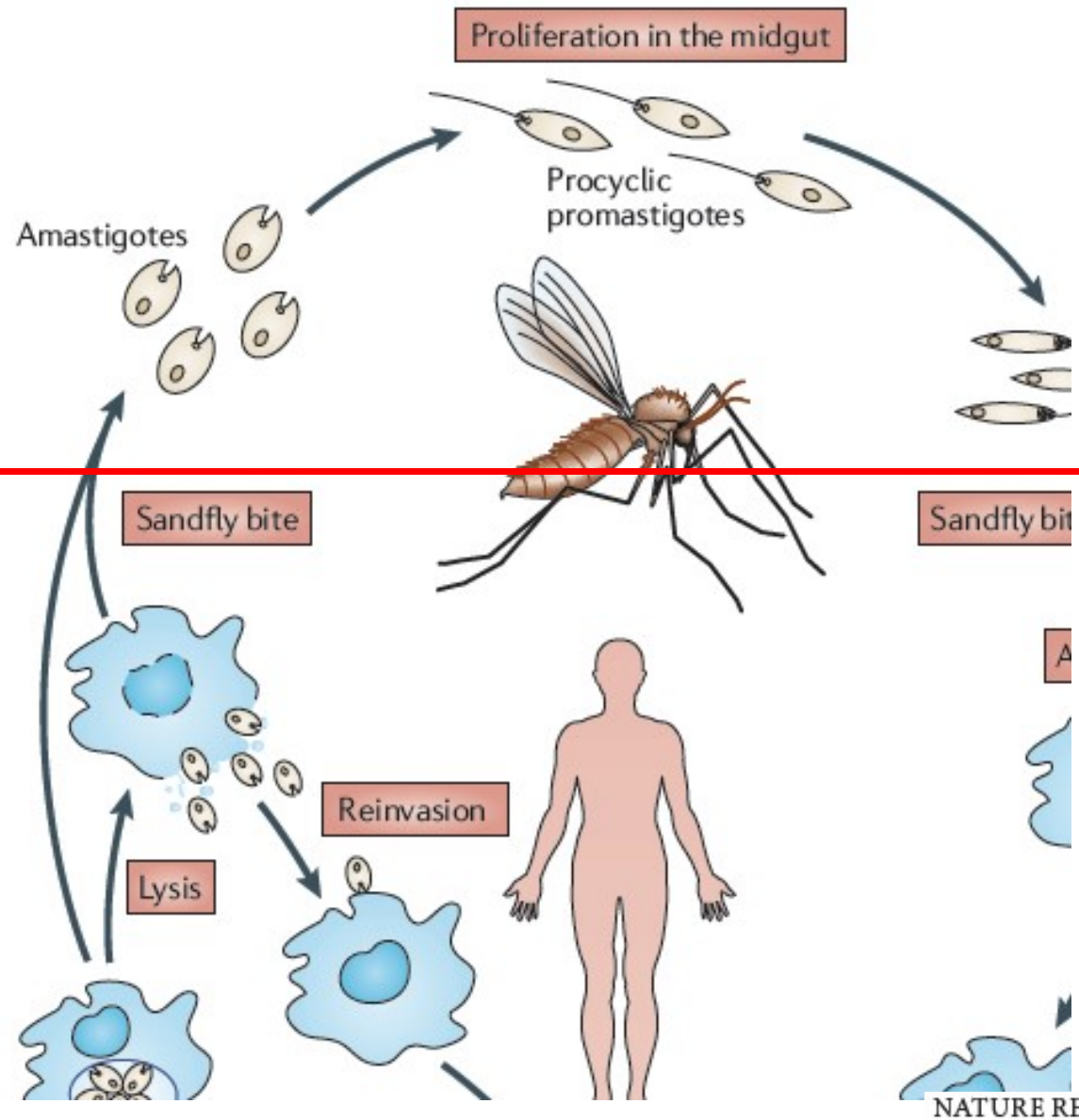


Ospite serbatoio:
Uomo, altri animali

Ciclo biologico di Leishmania

Promastigote: forme extracellulare flagellata

Amastigote: forme intracellulari in macrofagi



Kaye et al. 2011

NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY

Leishmaniasi umana

I ceppi di *Leishmania* spp. sono classificati con analisi degli isoenzimi o con metodi molecolari, ma praticamente rimane utile una **classificazione clinico-epidemiologica**

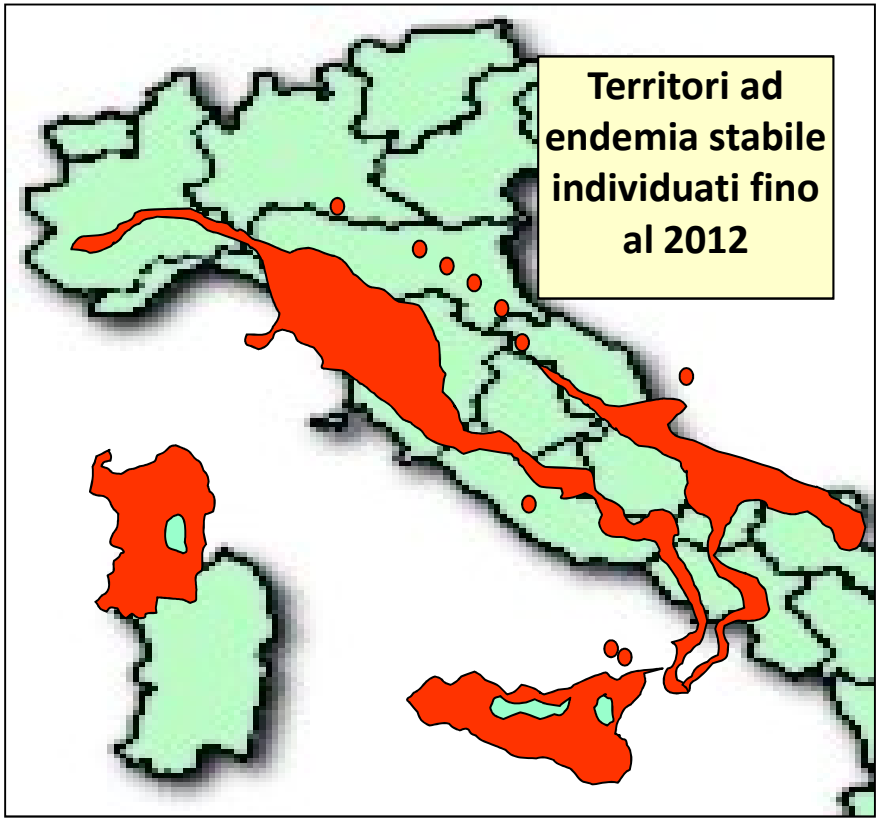
▪ **Leishmaniasi viscerale**	✓ Infantile o mediterranea ✓ Indiana o Kala-azar ✓ Africana ✓ Sud-americana	***L.donovani complex*** ***L. infantum*** ***L. donovani***
▪ **Leishmaniasi cutanea**	✓ Mediterraneo e Medio Oriente ✓ Africana ✓ Sud-americana	***L. tropica*** ***L. major*** ***L. infantum*** ***L. aethiopica*** ***L. mexicana*** ***L. amazonensis*** ***L. peruviana*** ***L.braziliensis***
▪ **Leishmaniasi muco-cutanea** ▪ **Leishmaniasi mucosa**	✓ **Sud-americana** ✓ Africana ✓ Indiana ✓ Mediterranea	***L. braziliensis*** ***L. aethiopica*** ***L. donovani*** ***L. infantum***

Leishmaniasi umana in Italia - situazione attuale

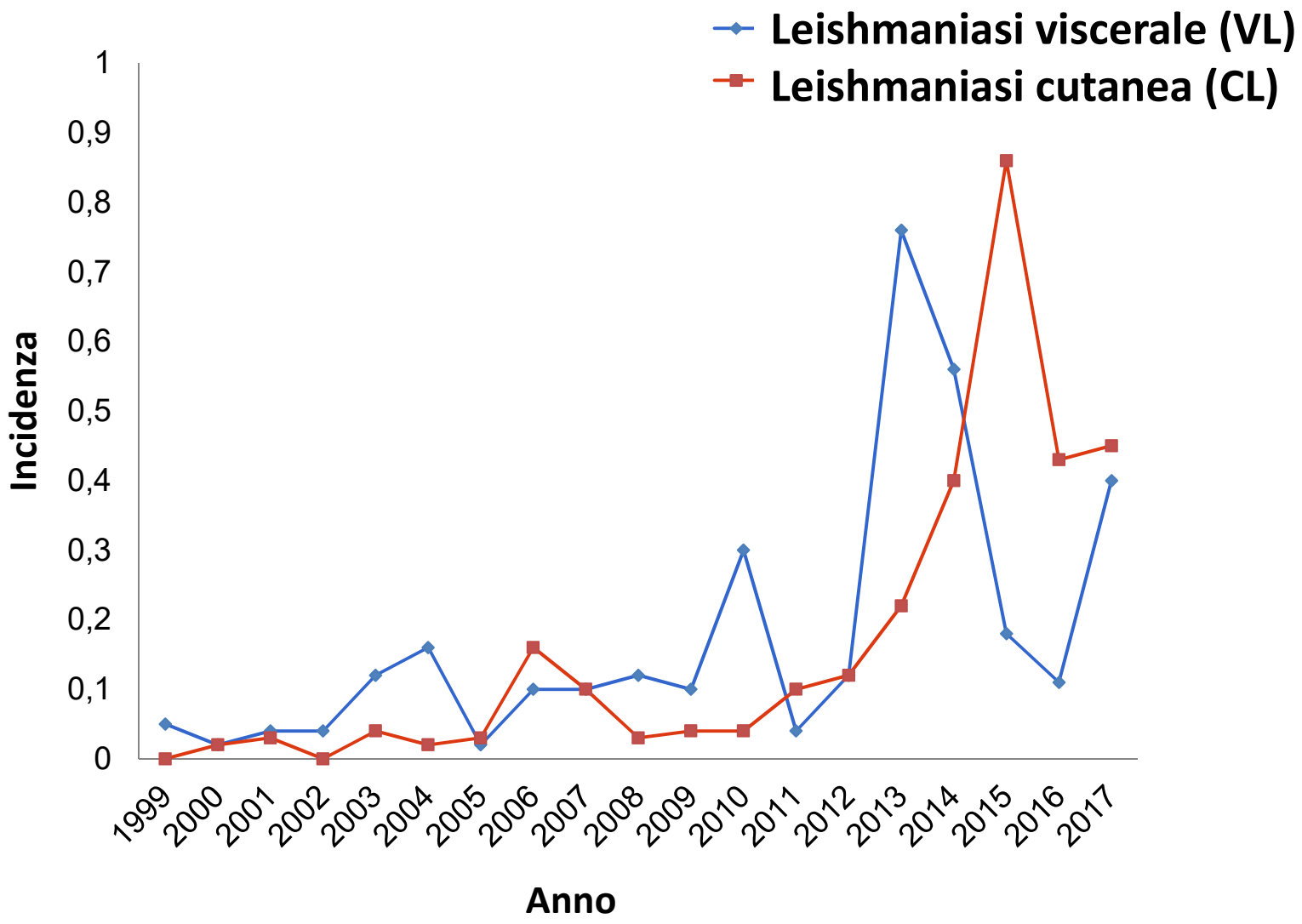
- *L.infantum* (ceppi viscerotropi e ceppi dermotropi)
- Serbatoio: cane

Aree tradizionali di endemia

Focolai di recente introduzione

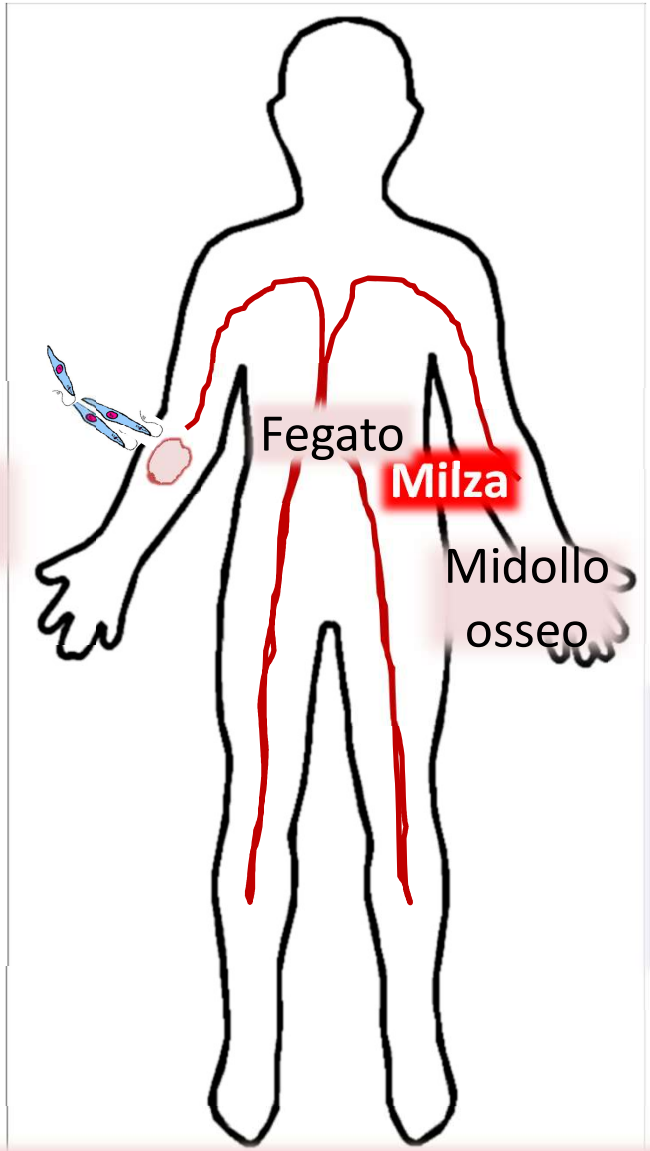


Incidenza leishmaniasi umana in Emilia-Romagna 1999-2017



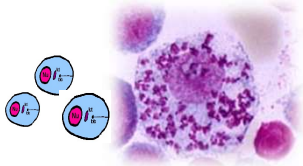
Patogenesi di leishmaniasi

Periodo di incubazione: mesi



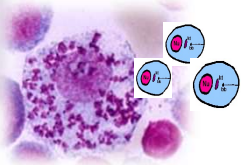
Leishmaniasi cutanea

Localizzazione degli amastigoti nei macrofagi del derma



Leishmaniasi viscerale

Localizzazione degli amastigoti in macrofagi del sistema reticolo-endoteliale



Permanenza in stato latente/persistente del protozoo

Leishmaniasi viscerale: quali sintomi?

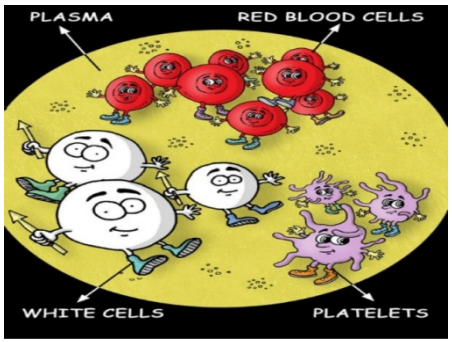
incubazione di 2-8 mesi

- **Febbre prolungata**, resistente agli antibiotici

- **Perdita di peso**

- **Splenomegalia, epatomegalia**

- **Anemia, piastrinopenia, leucopenia**



Leishmaniasi cutanea: quali lesioni?

Gaspari et al., J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017

REVIEW

Leishmaniasis in immunosuppressed i

J van Griensven et al. Clin Microbiol Infect 2014

- **Infezione persistente/latente**
- **immunosoppressione è il principale fattore di rischio per lo sviluppo di leishmaniosi viscerale: riattivazioni**

Leishmaniasi in pazienti HIV+:

- leishmaniasi cronica attiva → frequenti ricadute (35-45%), alta mortalità (>20%)

Leishmaniasi in pazienti riceventi trapianto d'organo

- Principalmente trapianto di rene→ frequenti ricadute (15-25%), alta mortalità(20%)

Leishmaniasi in reumatologia, gastro-enterologia, oncologia, dermatologia:

-In seguito a terapia con azatioprina, metotrexate, ciclosporina ciclofosfamide, steroidi, Ab monoclonali anti-TNF

Coinfezione HIV-Leishmania

-Sinergismo tra i due patogeni
- Possono esserci forme atipiche di leishmaniasi

- I pazienti co-infettati presentano frequentemente coinvolgimento cutaneo (anche diffuso) o mucosale da Leishmania

Dr. Mastroianni-Malattie Infettive, Cosenza

Dr.ssa Gaspari
UO Dermatologa, Bologna

Diagnosi di leishmaniasi umana

© World Health Organization 2017

Definizione di caso di leishmaniasi viscerale

"Presenza di sintomi clinici (febbre irregolare prolungata, splenomegalia e perdita di peso)
e
esame parassitologico positivo (microscopia, coltura, PCR)
e/o
sierologia positiva" → Fondamentale la diagnosi microbiologica

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

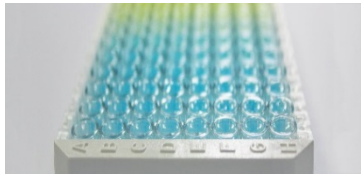
Diagnosi microbiologica di leishmaniasi viscerale

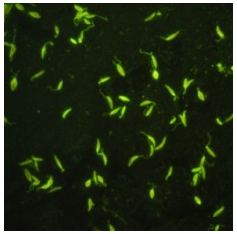
A. Identificazione diretta del protozoo:

- microscopica
- colturale
- molecolare

B. Diagnosi indiretta (ricerca di anticorpi anti-Leishmania)

- Test immunocromatografici rk39
- Test immunoenzimatici
- Test di immunofluorescenza indiretta
- Western Blot



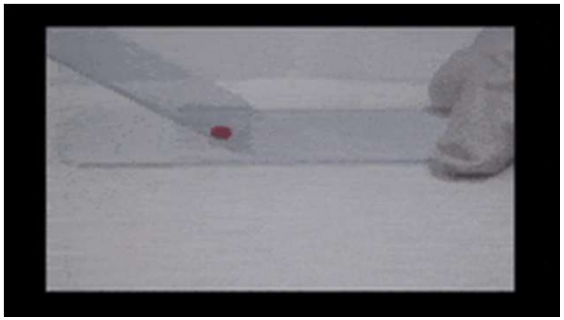


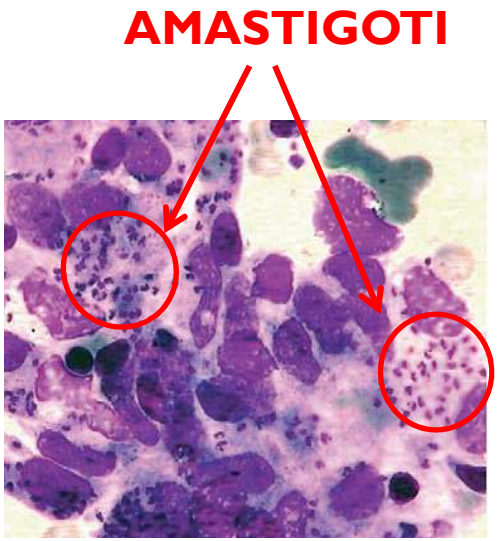
Diagnosi diretta di leishmaniasi viscerale: <u>microscopia</u>

-In striscio di aspirato da midollo osseo

-Presenza di amastigoti (intracellulari)

-Specificità del 100%
-Sensibilità: 53-86%
-Non è possibile una diagnosi di specie

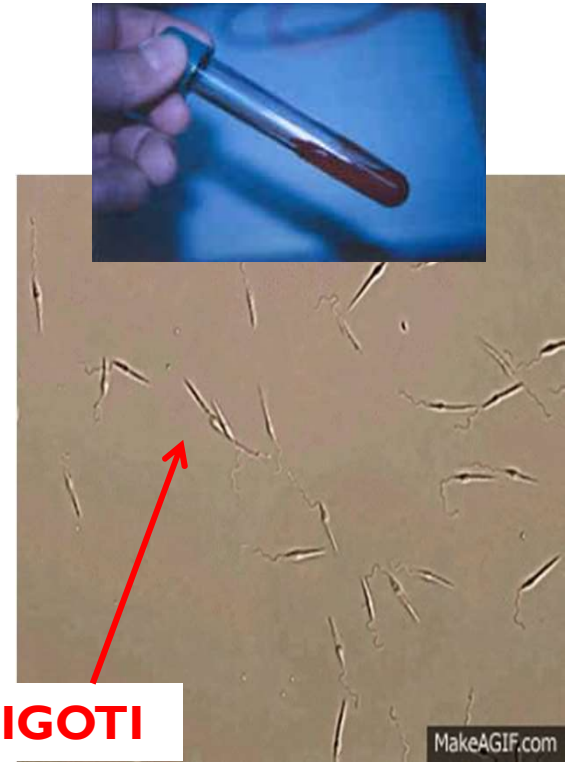




Murray et al. Lancet 2005

Diagnosi diretta di leishmaniasi viscerale: <u>coltura</u>

- Evidenziazione dei promastigoti (extracellulari, mobili)
- Richiede incubatore e terreni appropriati *home made* (terreno Novy–MacNeal–Nicolle)
- Sensibilità: 60-85%
- Fino a 4 settimane di coltura
- Solo laboratori di riferimento: importante per isolamento del ceppo

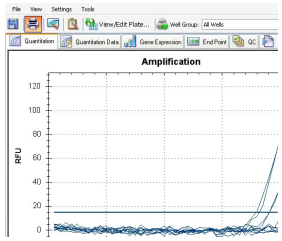


Diagnosi diretta di leishmaniasi viscerale: metodi molecolari

- La rilevazione del DNA del parassita mediante PCR in campioni clinici è sostanzialmente più sensibile rispetto alla microscopia o alla coltura

- Campioni meno invasivi, come sangue periferico mostrano un'alta sensibilità

- Possibile una diagnosi molecolare di specie
- PCR quantitativa (qPCR) in sangue periferico può essere utile per monitorare la risposta al trattamento

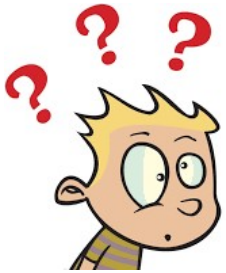


PCR real-time per identificazione di *Leishmania* spp.

Targets	Assay type		Assay dye/fluorophore	
	Quantitative	Qualitative	TaqMan	SYBR G
kDNA	10	2	5	9
SSUrRNA	8	3	3	5
HSP70	1	2	1	1

Moreira et a. Acta Tropica, 2018

- Target più usati a livello europeo (consorzio LeishMan): kDNA (*Mary C et al. 2004);* gene RNA ribosomiale 18S (*Wortmann G et al. 2001)*

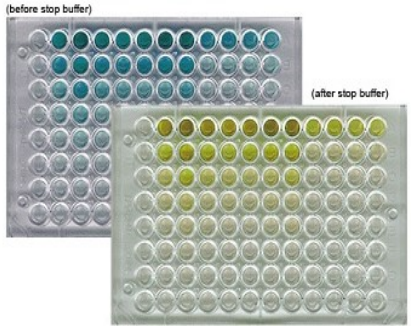


- **Manca una validazione dei target e una standardizzazione di protocolli per i metodi molecolari**

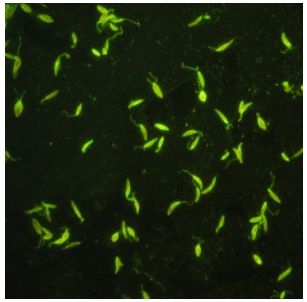
Sierodiagnosi di leishmaniosi viscerale: <u>Test quantitativi</u>

- I test sierologici quantitativi (ELISA, IFAT) sono considerati di prima scelta
- Permette determinazione titolo anticorpale
- Elevata sensibilità

- LEISHMANIA ELISA IgG+IgM -VIRCELL Microbiologists (Spain)
- Leishmania infantum IgG-ELISA –NOVATEC (Italy)
- Leishmania Ab –RIDASCREEN (Germany)
- Leishmania infantum - BORDIER AFFINITY PRODUCTS (France)



- Leishmania IFA IgG, Vircell, Spain
- Anti-Leishmania donovani IFA , EuroImmun, Germany



Sierodiagnosi di leishmaniasi viscerale: <u>test rapidi immunocromatografici</u>

- Test rapidi basati su rK39 (kinesin-like gene)

- Leishmania Dipstick Rapydtest – APACOR®
- IT LEISH Individual Rapid Test-Bio-Rad
- On Site Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test – CTK Biotech®
- LEISHMANIA Strip quick Test – CYPRESS Diagnostics®
- Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test Meridian®

- rapidità e semplicità di esecuzione
- test qualitativo

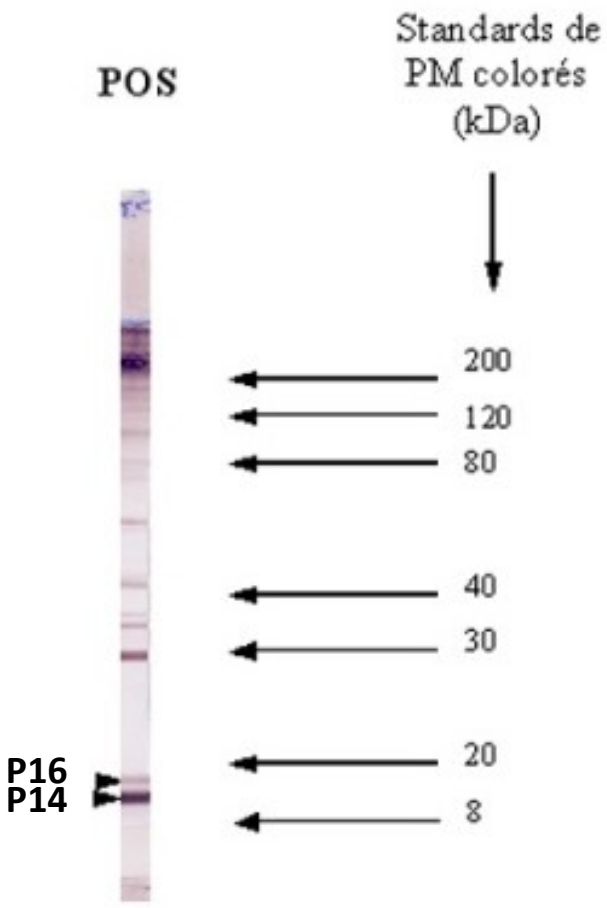
Viene consigliato da OMS per la regione europea ed è previsto che abbia elevata sensibilità

- sensibilità variabile:
  - elevata in India e America Latina
  - <70% Africa Orientale
  - 83% in Spagna

  (Bangert et al. PLoS NeglTropDis 2018)

→Alto valore predittivo positivo (WHO European Region 2017)

Sierodiagnosi di leishmaniosi viscerale: <u>Western Blot</u>



- Sensibilità molto elevata
- Svantaggi: costi elevati, identifica anche infezioni asintomatiche

- LEISHMANIA WESTERN BLOT IgG – LDBio Diagnostics® (France)

Percorso diagnostico per leishmaniasi viscerale

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

- **Non esiste un test che da solo possa essere considerato "GOLD STANDARD" per la diagnosi di leishmaniasi viscerale**
- **E' raccomandato l'uso combinato di diversi test** per aumentare la possibilità di una diagnosi corretta
- **Il test immunocromatografico rk39** ha un **elevato valore predittivo positivo** in pazienti immunocompetenti con sintomi sospetti di leishmaniasi → **andrebbe usato come test di 1° livello**
- In caso di test sierologico positivo, **i metodi parassitologici dovrebbero essere utilizzati se disponibili come test di conferma** prima di iniziare il trattamento anti-leishmania
- Se combinazione di test sierologici e parassitologici è negativa → riconsiderare la diagnosi

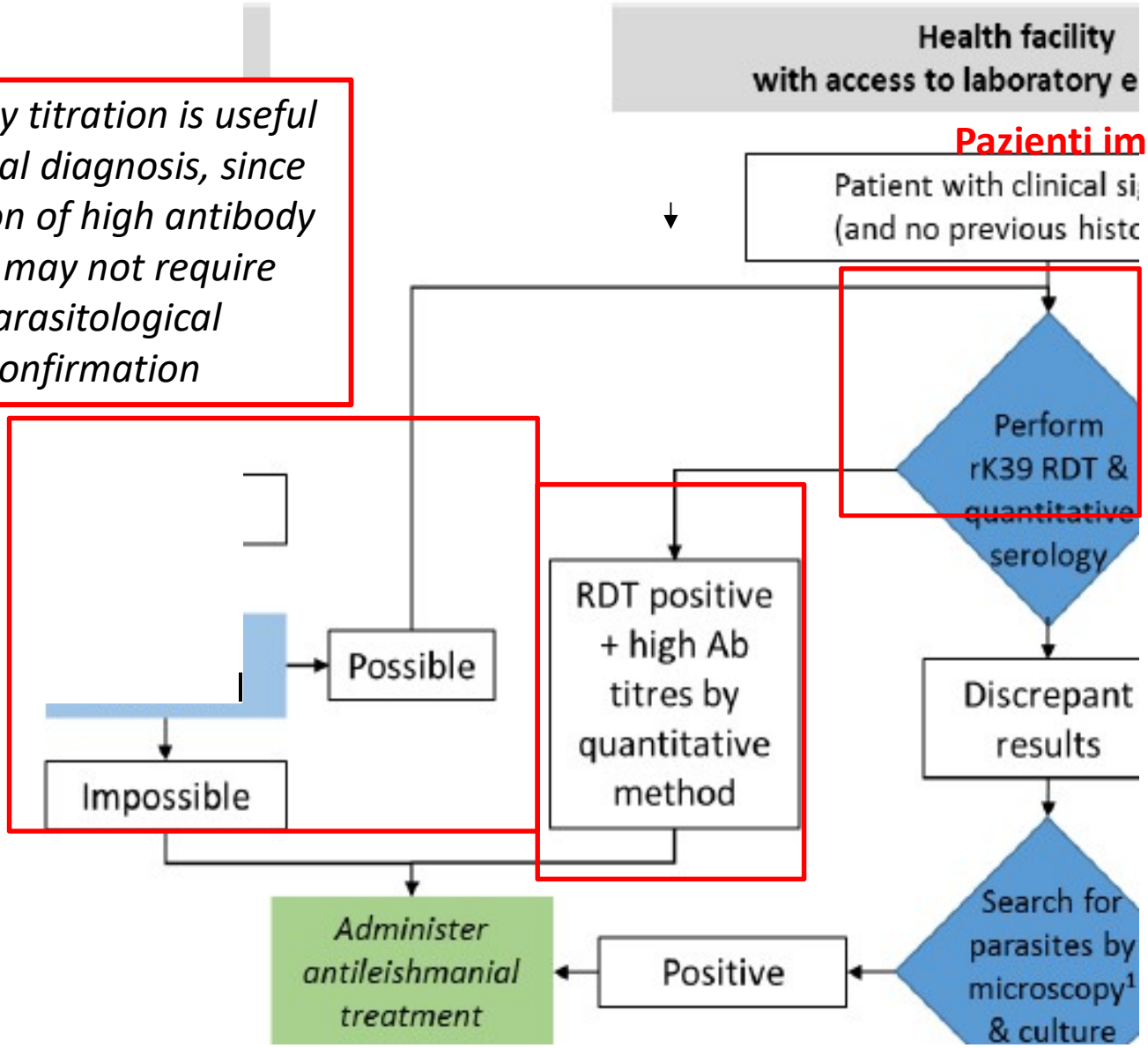
World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

Percorso diagnostico per Leishmaniasi viscerale

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

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

Antibody titration is useful for initial diagnosis, since detection of high antibody titres may not require parasitological confirmation



Diagnosi di leishmaniasi viscerale 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)

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

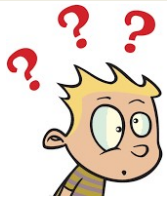
Applicazione del protocollo OMS per diagnosi di VL –Laboratorio Regionale di Riferimento Emilia-Romagna (CRREM)

70 casi di VL identificati (2013-2018)

Perform rk39 & quantitative serology

ICT rk39, sensibilità : 60% (Varani et al. PLoS ONE 2017)

Quale/i test sierologico/i?



↓

↓

Parasitological confirmation (by microscopy, culture, molecular methods)

- Test molecolari (real time PCR): sensibilità del 100% (Varani et al. PLoS ONE 2017)
- risultati sovrapponibili per sangue periferico e aspirato midollare

Serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis: evaluation of 7 serological tests

- **n=3 rk39 immunochromatographic tests (**ICT) :
  - Leishmania Dipstick Rapydtest – APACOR® (**ICT1**)
  - On Site Leishmania IgG/IgM Combo Rapid Test – CTK Biotech® (**ICT2**)
  - LEISHMANIA Strip quick Test – CYPRESS Diagnostics® (**ICT3**)

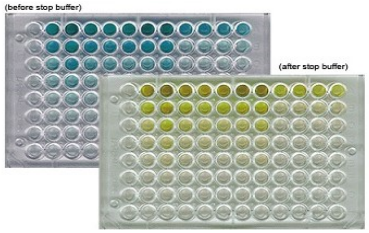
- **n=2 enzyme-linked immunosorbent assays** (ELISA):
  - LEISHMANIA ELISA IgG+IgM -VIRCELL Microbiologists®) (**ELISA1**),
  - Leishmania infantum IgG-ELISA -NOVATECH® (**ELISA2**),

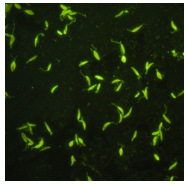
- **n=1 Western Blot** : LEISHMANIA WESTERN BLOT IgG – LDBio Diagnostics®
- **n=1 indirect immunofluorescence test (IFAT):** Leishmania-Spot IF - bioMérieux®)

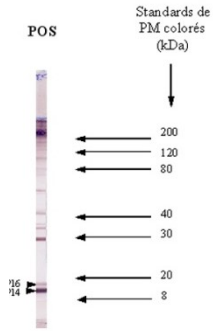
Pazienti :
- **27** casi di leishmaniasi viscerale (regione Emilia-Romagna)
- **50** casi di sospetta leishmaniasi non confermata (altra diagnosi)

Ortalli et al. submitted

Serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis: evaluation of 7 serological tests







	ICT #1	ICT #2	ICT #3	ELISA #1	ELISA #2	IFAT	WB
Sensibilità	70%	63%	52%	74%	63%	96%	96%
Specificità	96%	98%	100%	98%	100%	100%	88%

Solo pazienti immunocompetenti (n= 64)

Sensibilità	77%	73%	59%	82%	68%	100%	100%

IFAT e Western Blot: sensibilità ottimale ma non utilizzabili come test di screening

Ortalli et al. submitted

Performance of selected test combination for diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis

Test combination	Sensitivity %	Specificity %
ELISA Vircell + Apacor ICT	95.5	93
ELISA Vircell + Cypress ICT	86.4	97.7
ELISA Vircell + CTK Biotech ICT	95.5	95.3
NovaTec ELISA + Apacor ICT	90.9	95.3
NovaTec ELISA+ Cypress ICT	86.4	100
NovaTec ELISA+ CTK Biotech ICT	86.4	97.7

- ICT e ELISA utilizzabili in combinazione come test di screening per identificare leishmaniasi viscerale

Ortalli et al. submitted

Definizione di caso di leishmaniasi cutanea

"Presenza di sintomi clinici (lesione cutanea)
e
esame parassitologico positivo (microscopia, PCR, coltura)

→ Fondamentale la diagnosi microbiologica

World Health Organization
REGIONAL OFFICE FOR Europe

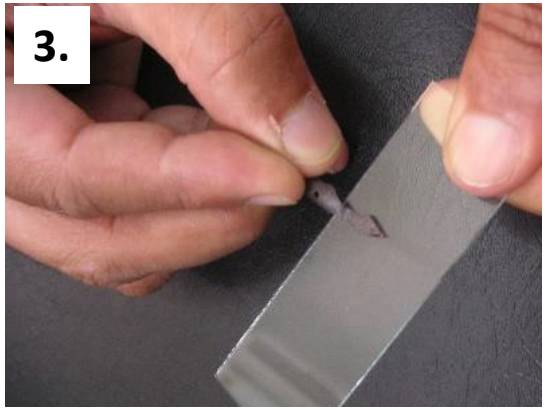
Sampling

1. Clean lesions and, when ulcerated, debride exudative crusts to a clean ulcer base;

2. Using a No. 10 scalpel blade, scrape the clean surface **at the border of the lesion** to obtain material about the size of a rice grain;

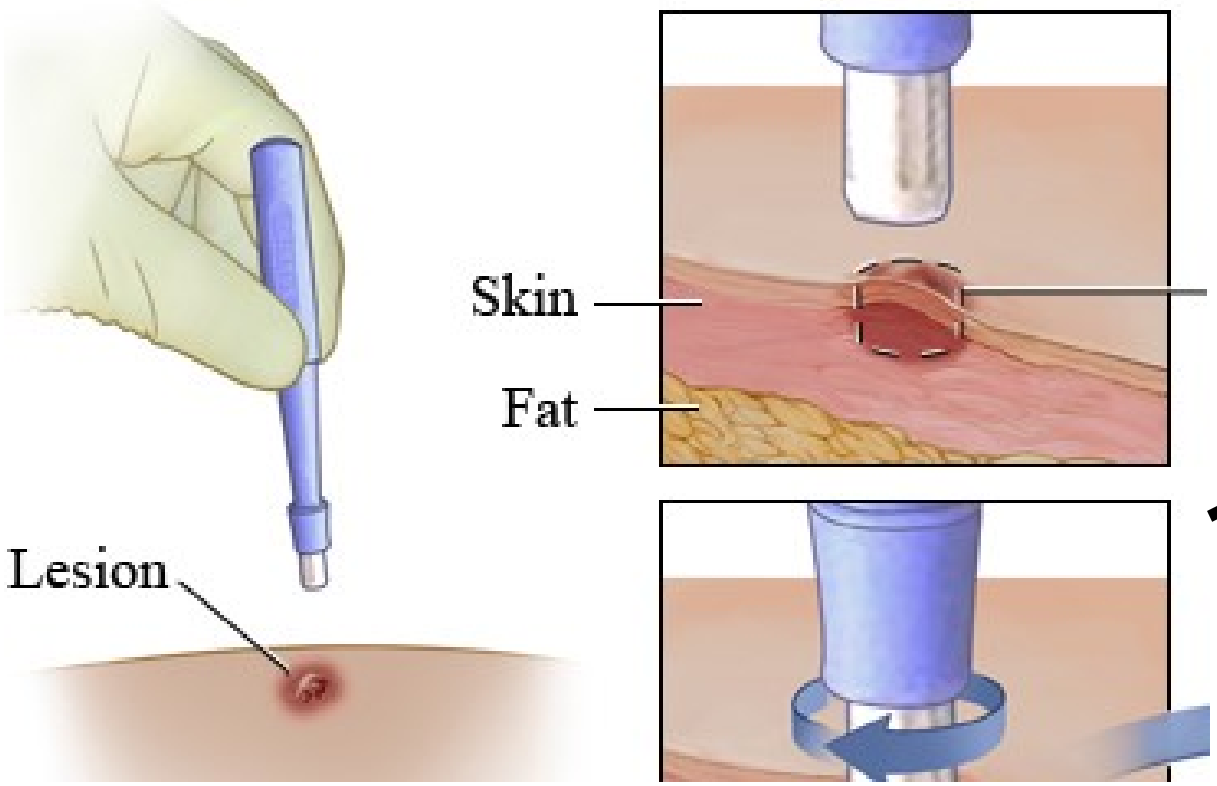
3. Depending on the testing method(s) employed,

- a. the material should then be placed on glass slides for staining and microscopic diagnosis,
- b. seeded in culture media,
- C. stored for DNA extraction and PCR testing



Sampling: punch biopsy

- Prendere materiale dal <u>bordo della lesione</u>



Inclusione in paraffina, sezione, preparazione di vetrini (ESAME ISTOLOGICO)

TEST MOLECOLARI

UO Dermatologia ,Policlinico S.Orsola Malpighi, Bologna (Dr.ssa Gaspari)

Diagnosi di leishmaniasi cutanea

- **Diagnosi diretta** su materiale prelevato dalla lesione

  -**esame istologico** (biopsie incluse in paraffina, sezionate e apposte su vetrino, colorato con ematossilina/eosina o Giemsa, colorazioni immunoistochimiche): sensibilità del 70-80%

  -**test molecolari:** sensibilità >90%

  -**esame citologico**
  -**esame colturale**
  } Sensibilità 40-90%

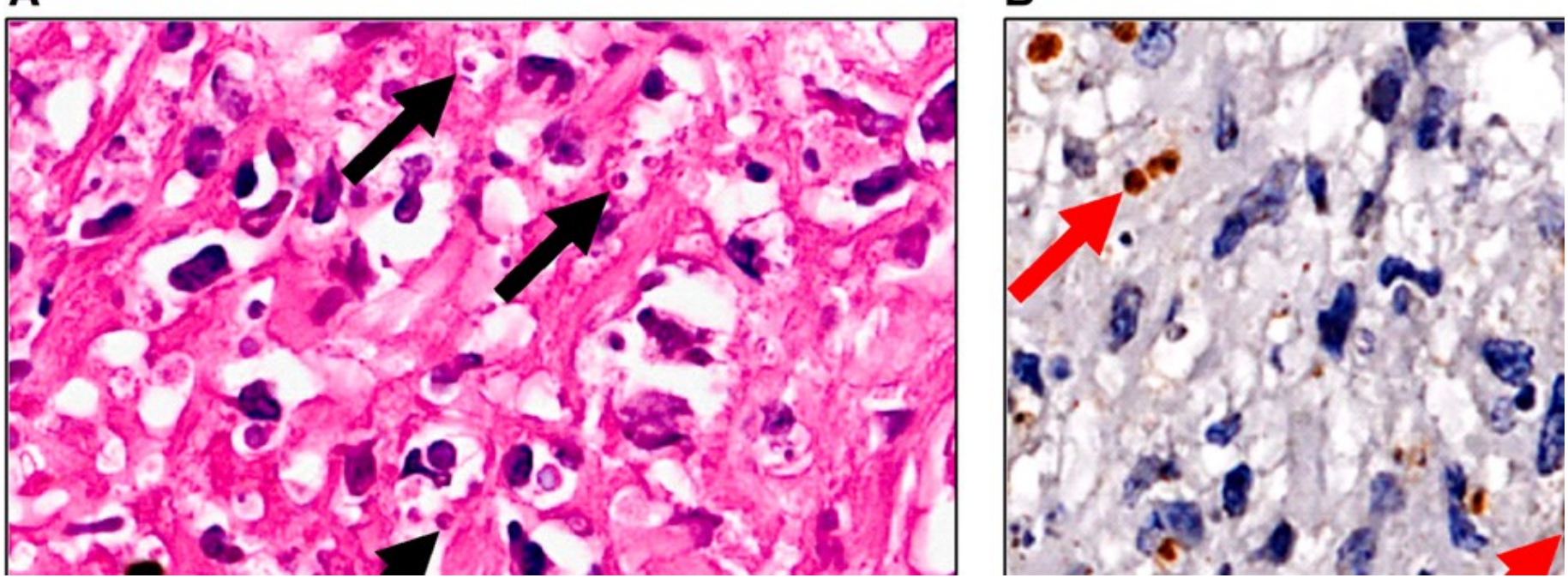
  -diagnosi di specie è importante per i casi di leishmaniasi cutanea di importazione (*L.braziliensis*, *L.panamensis*)

- **Diagnosi sierologica** non è utile in leishmaniasi cutanea, spesso risulta negativa

Leishmaniasi cutanea: Esame istologico

Colorazione Ematossilina eosina

Colorazione immunoistochimica (Ab policlonale verso Ag di Leishmania)



Saldanha et al. Am J Trop Med Hyg 2017

Applicazione protocollo OMS per la diagnosi di leishmaniasi tegumentaria –Laboratorio Regionale di Riferimento Emilia-Romagna (CRREM)

100 casi di leishmaniasi tegumentaria (2013-2018) in RER
3 province dell'Emilia-Romagna, dati su esame istologico e PCR, n=64

		Esame istologico		
		Positivo	Negativo	Totale casi
PCR	Positivo	45	18	63
	Negativo	1	-	1

-Sensibilità esame istologico= 71.4%
-Sensibilità PCR = 98.5%

Diagnosi microbiologica di leishmaniasi umana: conclusioni

✓ **Identificazione diretta**

Svantaggi

microscopica →
- Richiede aspirato midollare (metodo invasivo)
- Sensibilità non ottimale

colturale →
- Terreni home made
- Lunghi tempi di coltura
- Sensibilità non ottimale

molecolare →
- Costi elevati, laboratori ben equipaggiati
- No standardizzazione nell'identificazione e nella diagnosi di specie

✓ **Sierodiagnosi (solo per VL)**

ICT rk39, ELISA
IFAT, WB →
- Falsi negativi (20-60%) in soggetti immunocompromessi

Leishmaniasi: Diagnosi di specie

- **E' importante nelle leishmaniasi cutanee di importazione (principalmente da America Latina)**
- **Non è possibile un'identificazione di specie a livello microscopico**

- Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)
- PCR-end point →RFLP o sequenziamento
- Real-time PCR (Ozensoy Toz 2013)

- **ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer)1** Ogado Ceasar Odiwuor et al., 2011, Kuhls et al., 2005
- **HSP(heat shock protein)-70**
  Garcia 2004; Montalvo 2010; Van der Auwera , 2013
  - Sequenze geniche altamente conservate
  - E' in grado di discriminare tutte le specie più rilevanti nei sottogeneri *Leishmania* e *Viannia*
  - Può essere applicato direttamente a campioni clinici →presente in elevato numero di copie