associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2022-24

PERCORSO DIAGNOSTICO

PARASSITOSI EMATICHE E DEL SISTEMA RETICOLO ENDOTELIALE (SRE)

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi
c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Parassitosi ematiche e del sistema reticolo endoteliale (sre) Rif. 2022-24.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

REFERENTE

Annibale Raglio (*Coordinatore*) - Bergamo

ESTENSORI DEL DOCUMENTO

A cura del Comitato di Studio per la Parassitologia dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI-CoSP):

Annibale Raglio (*Coordinatore*), *Francesco Bernieri, Valeria Besutti, Serena Cavallari, Daniele Crotti, Luigi Di Matteo, Raffaele Gargiulo, Luciana Petrullo, Stefania Varani.*

Con la collaborazione di:

Carlo Severini, Daniela Boccolini, Trentina Di Muccio, Marina Gramiccia, Luigi Gradoni. (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie Infettive, Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori, Roma).

Fabrizio Bruschi[1], Valentina Mangano[2]. (Direttore del programma "Monitoraggio delle parassitosi e formulazione di algoritmi diagnostici"[1], Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa; Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana[1,2]).

REVISORI INTERNI

REVISORI ESTERNI

Con il patrocinio della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA)

SOMMARIO

INTRODUZIONE 5
1 PARTE PRIMA: MALARIA 8
1.1 DEFINIZIONE 8
1.2 EPIDEMIOLOGIA 8
1.2.1 MALARIA NEL MONDO 9
1.2.2 SITUAZIONE IN ITALIA 12
1.3 CLINICA: CENNI DI PATOGENESI, SINTOMI E SEGNI CLINICI 13
1.4 FASE PREANALITICA 15
1.5 TECNICHE DIAGNOSTICHE 16
1.5.1 MICROSCOPIA 16
1.5.2 VALUTAZIONE DELLA PARASSITEMIA 21
1.5.3 IDENTIFICAZIONE E DIAGNOSI DIFFERENZIALE DEI PLASMODI 22
1.5.4 TECNICHE IMMUNOCROMATOGRAFICHE 25
1.5.5 TECNICHE MOLECOLARI 26
1.5.6 QUANTITATIVE BUFFY COAT (QBC) 27
1.5.7 ALTRE TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE 27
1.5.8 TECNICHE SIEROLOGICHE 28
1.6 REFERTAZIONE 28
1.7 CONTROLLO DI QUALITÀ 29
1.8 SICUREZZA DEL SANGUE E DEGLI EMOCOMPONENTI 29
1.9 SICUREZZA DEI TRAPIANTI 30
1.10 ALGORITMO DIAGNOSTICO 31
2. PARTE SECONDA: BABESIOSI 33
2.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE 33
2.3 EPIDEMIOLOGIA 33
2.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI E CLINICI 34
2.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE 35
2.4.1 TECNICHE DIRETTE 35
2.4.2 IDENTIFICAZIONE 35
2.4.3 TECNICHE SIEROLOGICHE 36
2.5 REFERTAZIONE 36
2.6 ALGORITMO DIAGNOSTICO 37

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

3. PARTE TERZA: LEISHMANIOSI 38
3.1 EPIDEMIOLOGIA 38
3.2 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI 40
3.3 TECNICHE DIAGNOSTICHE 40
3.3.1 LEISHMANIOSI VISCERALE 40
3.3.2 TECNICHE SIEROLOGICHE 40
3.3.3 TECNICHE DIRETTE 42
3.3.4 DIAGNOSI DIFFERENZIALE 44
3.3.5 LEISHMANIOSI DEI TEGUMENTI 44
3.4 ALGORITMO DIAGNOSTICO 45
4. PARTE QUARTA: TRIPANOSOMIASI AFRICANA 47
4.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE 47
4.2 EPIDEMIOLOGIA 47
4.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI 48
4.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE 49
4.4.1 TECNICHE SIEROLOGICHE 49
4.4.2 TECNICHE DIRETTE 50
4.5 ALGORITMO DIAGNOSTICO 53
5. PARTE QUINTA: TRIPANOSOMIASI AMERICANA 54
5.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE 54
5.2 EPIDEMIOLOGIA 54
5.2.1 SITUAZIONE IN ITALIA 55
5.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI 55
5.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE 56
5.4.1 FASE ACUTA 56
5.4.2 FASE CRONICA 57
5.5 SICUREZZA DEL SANGUE E DEGLI EMOCOMPONENTI 58
5.6 SICUREZZA DEI TRAPIANTI 58
5.7 ALGORITMO DIAGNOSTICO 58
6. PARTE SESTA: FILARIOSI EMATICHE 61
6.1 TRASMISSIONE 61
6.2 EPIDEMIOLOGIA 61
6.2.1 FILARIOSI LINFATICHE 61
6.2.2 *LOA LOA* 61
6.2.3 *MANSONELLA* SPP. 62

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

6.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI 63
6.3.1 FILARIOSI LINFATICHE 63
6.3.2 *LOA LOA* 63
6.3.3 *MANSONELLA* SPP. 64
6.4 PERIODICITÀ 64
6.5 TECNICHE DIAGNOSTICHE 65
6.5.1 TECNICHE DIRETTE 65
6.5.2 DIAGNOSI DI SPECIE 68
6.5.3 TECNICHE SIEROLOGICHE 70
6.6 ALGORITMO DIAGNOSTICO 70
7. QUADRO RIEPILOGATIVO 73
8. APPENDICE A 75
CICLI VITALI DEI PARASSITI EMATICI E DEL SRE 75
9. APPENDICE B 85
IMMAGINI DEI VARI STADI DI SVILUPPO DEI PLASMODI UMANI 85
10. APPENDICE ETIMOLOGICA 108
11. FONTI BIBLIOGRAFICHE 117

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

ELENCO DELLE TABELLE

N. TAB	TITOLO	PAGINA
1	Principali caratteristiche morfologiche delle specie di Plasmodium	24
2	Tabella 2. Sensibilità e specificità delle tecniche sierologiche per la diagnosi di leishmaniosi	41
3	Quantificazione della carica parassitaria di Leishmania	42
4	Criteri per la stadiazione della tripanosomiasi africana	52
5	Periodicità delle microfilarie ematiche	64
6	Principali caratteristiche delle filarie ematiche	68
7	Alfabeto Greco	116

ELENCO DELLE FIGURE

N. FIG.	TITOLO	PAGINA
1	Incidenza della malaria	9
2	Andamento dell'incidenza della malaria	10
3	Andamento del tasso di mortalità da malaria	10
4	Ripartizione del globo terrestre nelle regioni dell'OMS	11
5	Allestimento dello striscio sottile	16
6	Allestimento della goccia spessa	17
7	Colorazione e pH	18
8	Algoritmo diagnostico della malaria	32
9	Distribuzione mondiale della babesiosi umana	34
10	Trofozoiti di *Babesia* spp.	35
11	Algoritmo diagnostico per la babesiosi	37
12	Paesi endemici per leishmaniosi viscerale	39
13	Paesi endemici per leishmaniosi cutanea	39
14	Amastigoti di *Leishmania* spp.	42
15	Promastigoti di *Leishmania* spp.	43
16	Algoritmo diagnostico per la leishmaniosi viscerale	46
17	Distribuzione della tripanosomiasi umana africana (HAT)	47
18	Tripomastigoti di *Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense*	50
19	Algoritmo diagnostico per la tripanosomiasi africana	53
20	Distribuzione mondiale della malattia di Chagas	55
21	Parassitemia e livelli anticorpali nella malattia di Chagas	56
22	Tripomastigote di *Trypanosoma cruzi*	56
23	Tripomastigoti di *Trypanosoma rangeli*	57
24	Algoritmo diagnostico per la malattia di Chagas in fase acuta	59
25	Algoritmo diagnostico per la malattia di Chagas in fase cronica	59
26	Algoritmo diagnostico in gravidanza	60
27	Distribuzione delle filarie linfatiche e di *Loa loa*	62
28	Distribuzione di *Mansonella* spp.	62
29	Fluttuazione della microfilariemia	65
30	Goccia spessa per microfilarie	65
31	Disegni schematici delle estremità cefaliche e caudali delle microfilarie	69
32	*Wuchereria bancrofti* estremità cefalica e caudale	69
33	*Brugia malayi* estremità caudale	69
34	*Loa loa*: estremità cefalica e caudale	69
35	*Mansonella perstans*	69
36	Algoritmo diagnostico per le filariosi ematiche; approccio diretto parassitologico	71
37	Algoritmo diagnostico per le filariosi ematiche; approccio indiretto sierologico	72
38	Quadro riepilogativo delle parassitosi ematiche	74

INTRODUZIONE

Il termine "parassitosi ematiche e del sistema reticolo-endoteliale (SRE)" raggruppa una serie di quadri clinici che hanno in comune l'essere causati da organismi parassiti, le cui forme diagnostiche si ritrovano nel sangue e/o in tutti gli organi in cui il SRE è maggiormente rappresentato, quali midollo osseo, milza, fegato, linfonodi.

Tali parassiti patogeni per l'uomo comprendono:

Plasmodi	(malaria)
Babesie	(babesiosi o babesiasi)
Leishmanie	(leishmaniosi o leishmaniasi)
Tripanosomi	(tripanosomosi o tripanosomiasi)
Filarie (microfilarie)	(filariosi o filariasi)

Il Laboratorio di Microbiologia che effettua la ricerca dei parassiti, di norma dietro specifica richiesta del medico curante (ricerca mirata), deve essere in grado di utilizzare le tecniche/metodiche più affidabili in relazione ai patogeni di cui si sospetta la presenza.

Quindi è indispensabile che il medico curante, che formula il sospetto diagnostico in base a criteri clinici (segni, sintomi e/o dati di laboratorio) e a criteri anamnestico-epidemiologici (luogo di provenienza o soggiorno in zone a rischio per specifici parassiti, ecc.), fornisca al laboratorio questi dati clinico-epidemiologici (ed eventuali fattori di rischio) di modo che lo Specialista Microbiologo possa ottimizzare l'esecuzione dei test parassitologici adottando le tecniche più idonee al caso e proporre ulteriori accertamenti con metodiche e/o metodologie diversificate, se lo ritiene necessario.

Le indagini diagnostiche per i parassiti ematici e del SRE si basano ancora in buona parte su esami microscopici (osservazioni microscopiche) e quindi su criteri di tipo morfologico. Di conseguenza è necessario che la lettura dei preparati sia effettuata da operatori esperti, che assicurino risultati di alta qualità.

Non meno esperti devono essere gli operatori nell'interpretazione dei risultati delle tecniche sierologiche o di biologia molecolare che sempre più affiancano la microscopia.

In questo documento, mirato agli aspetti diagnostici, sono anche fornite le informazioni epidemiologiche e cliniche di base che si ritiene siano indispensabili per poter effettuare una corretta diagnosi.

FOCUS

È indispensabile che il campione da esaminare sia accompagnato da informazioni clinico-epidemiologiche per poter ottimizzare l'esecuzione dei test parassitologici adottando le tecniche più idonee.

1 PARTE PRIMA: MALARIA

1.1 DEFINIZIONE

La malaria è un'infezione sistemica sostenuta da protozoi appartenenti al genere *Plasmodium* e trasmessa da zanzare femmine, ematofaghe, del genere *Anopheles*.

Si riconoscono più di cento specie, di cui quattro infettano esclusivamente l'essere umano (specie antroponotiche): *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*.

P. falciparum è la specie responsabile delle forme cliniche più gravi e cagione del maggior numero di casi e di decessi.

Sono inoltre documentati casi di malaria umana dovuti a specie zoonotiche:

- *Plasmodium knowlesi* è diffuso nel Sud Est Asiatico, ove infetta usualmente diverse specie di macachi. È in grado di infettare anche l'essere umano, in Malesia è la specie responsabile del maggior numero di casi di malaria.
- *Plasmodium cynomologi* condivide distribuzione e ospiti con *P. knowlesi,* ma è molto meno frequentemente diagnosticato nell'essere umano.
- *Plasmodium simium* è agente abitualmente infettante piccole scimmie che vivono nelle regioni sud-orientali del Brasile e per il quale sono stati documentati alcuni casi nel 2015/2016.

La conoscenza del ciclo biologico dei parassiti malarici è indispensabile per un corretto approccio diagnostico; quindi è fondamentale avere a disposizione testi o tavole di pronta consultazione su tale argomento (vedi Appendice A).

In questo documento tratteremo dei plasmodi antroponotici e di *P. knowlesi* essendo le infezioni da *P. cynomologi* e da *P. simium* del tutto sporadiche ed eccezionali.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Nonostante l'impegno profuso dal secondo dopoguerra ad oggi nella lotta contro la malaria, questa malattia è ancora stabilmente presente nelle fasce intertropicali dei due emisferi, interessando quattro continenti. Nell'emisfero settentrionale aree di endemia persistono fino al 40° parallelo Nord che interessano anche la Regione Europea dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Oggi la malaria è ancora presente in 85 Paesi con livelli di endemia diversi (figura 1).

Il continente maggiormente flagellato dalla malaria è quello africano, dove la gran parte delle aree endemiche è concentrata nei Paesi subsahariani e centrali, e dove il patogeno predominante è *P. falciparum*, la specie responsabile della quasi totalità dei casi mortali per malaria.

In buona parte degli altri continenti la specie predominante è *P. vivax*, sebbene aree di iperendemia con *P. falciparum* predominante siano presenti anche nel bacino amazzonico, nel subcontinente indiano e in alcune isole del pacifico orientale.

1.2.1 MALARIA NEL MONDO

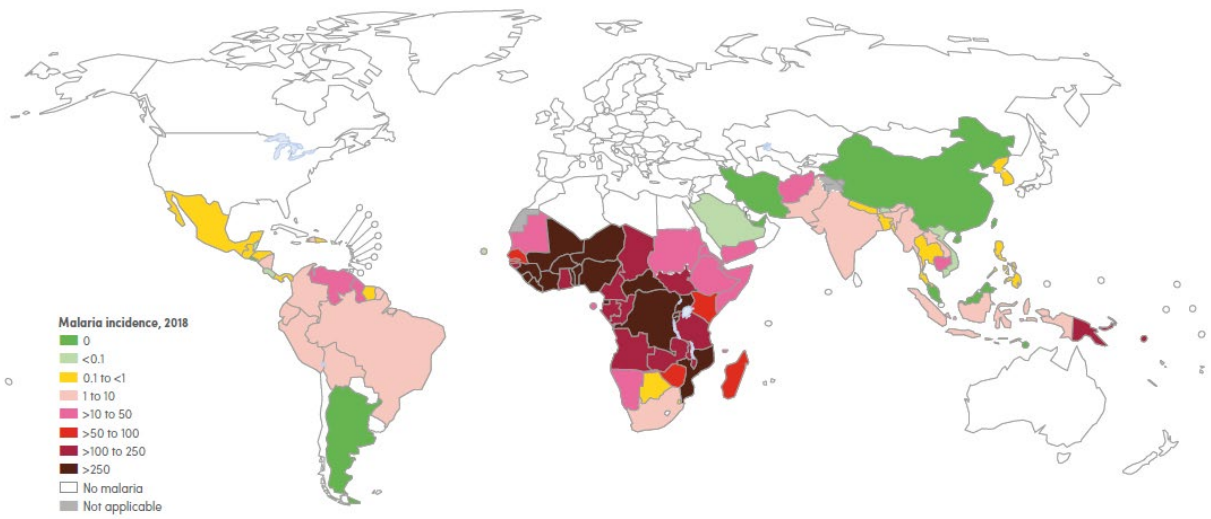
L'OMS si era data come obiettivo la riduzione del 70% dei casi di malaria nel mondo per il 2015.

I programmi e le strategie messe in atto hanno ottenuto buoni risultati con la riduzione del 75% dei casi in 57 Paesi dove la malaria è diffusa. Questo ha portato a una riduzione globale del 37%.

Purtroppo i dati relativi agli anni 2016 e 2017 mostrano una inversione di tendenza, poiché si è passati dai 214 milioni di casi del 2015 ai 231 milioni del 2107. Nel 2018 si è comunque ottenuto un lieve calo rispetto all'anno precedente con 228 milioni di casi, confermato nel 2019 con 227 milioni di casi.

Nel 2020 si è avuto un preoccupante aumento dei casi, sono infatti stimati 241 milioni di casi, 14 miloni in più rispetto all'anno precedente e 69.000 decessi in più. Circa due terzi di questi decessi aggiuntivi (47.000) sono stati collegati a interruzioni nella fornitura di prevenzione, diagnosi e trattamento della malaria durante la pandemia Covid-19.

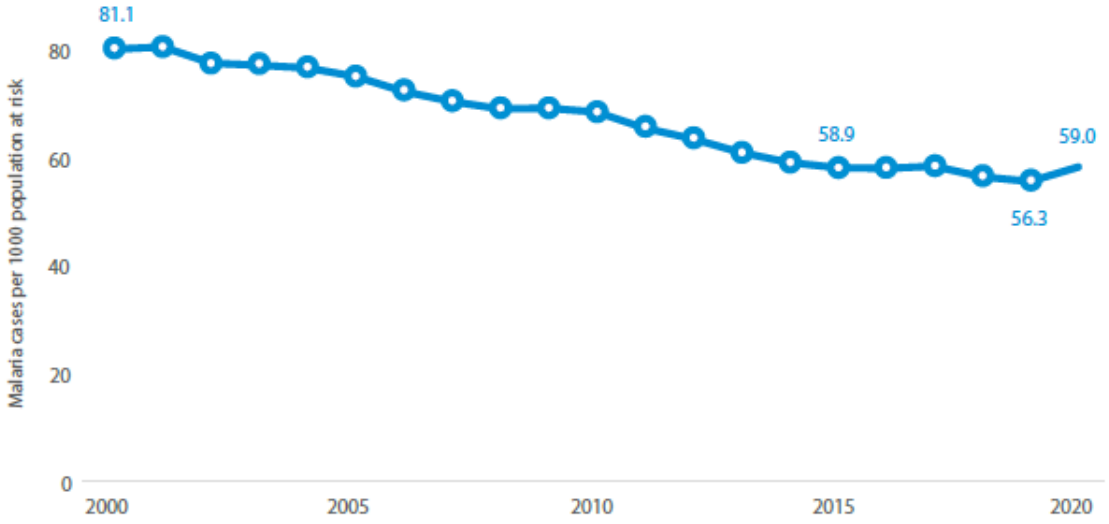
Figura 1. Incidenza della malaria



Da: WHO. *World Malaria Report* 2019

L'incidenza della malaria (numero dei casi ogni 1000 soggetti a rischio di infezione) è andata via via diminuendo dal 2000 (81,1 casi/1000) al 2015 (58,9/1000) ed ancora al 2019 (56,3 casi/1000), per poi risalire nel 2020 a 59,0 casi/1000.

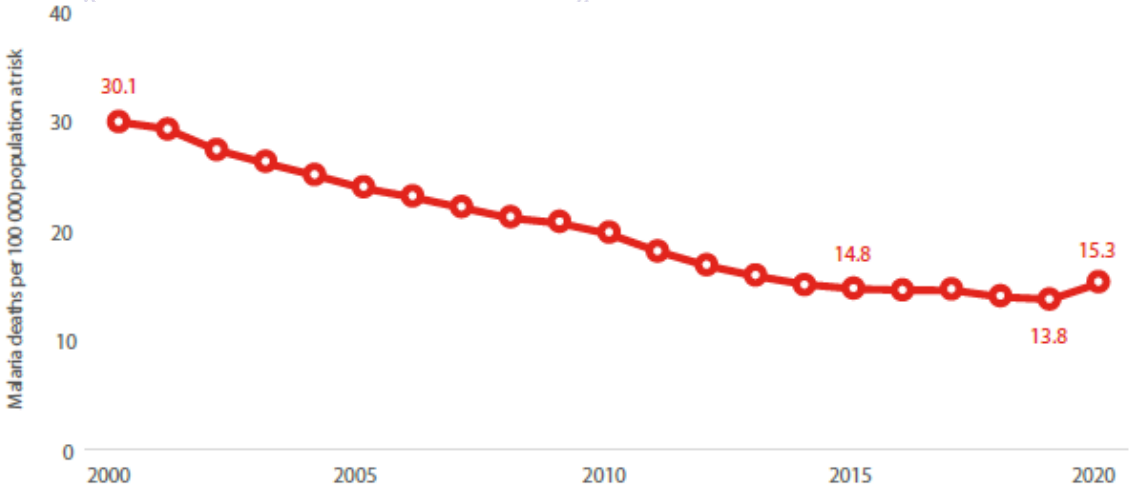
Figura 2. Andamento dell'incidenza della malaria



Da: WHO. *World Malaria Report* 2021

Analogo andamento ha avuto il tasso di mortalità (numero dei morti ogni 100.000 soggetti a rischio di infezione); dal 30,1 del 2000 al 14,8 del 2015, al 13,8 del 2019 e poi la risalita al 15,3 nel 2020.

Figura 3. Andamento del tasso di mortalità da malaria



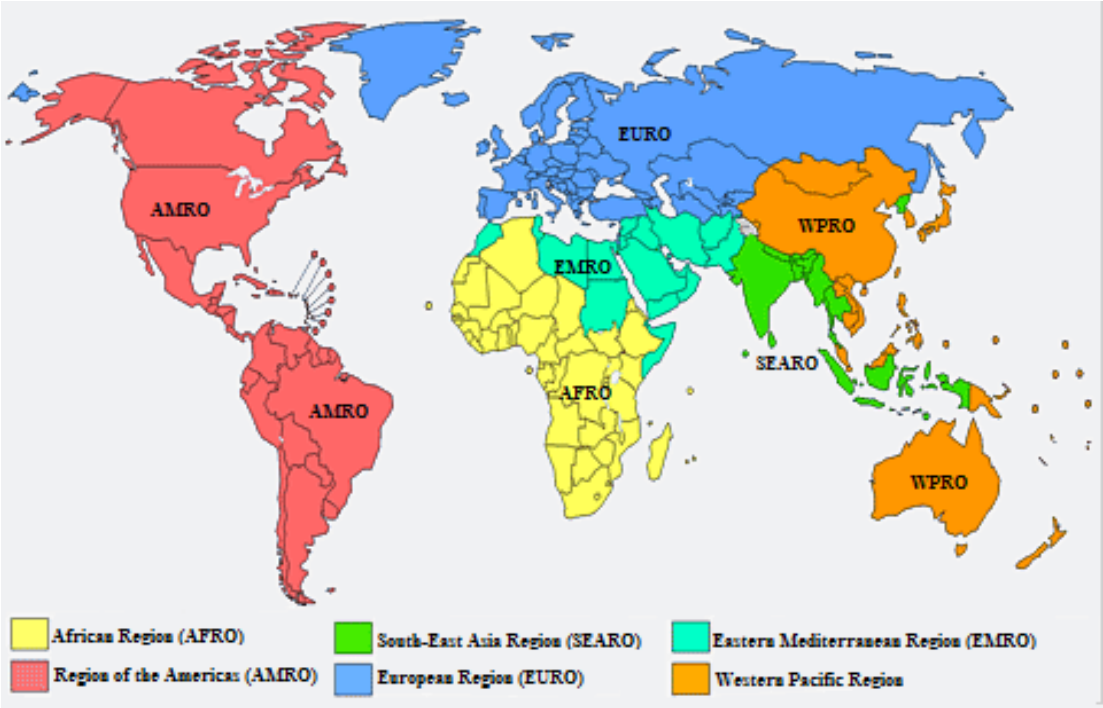
D: WHO. *World Malaria Report* 2021

Nonostante gli investimenti nei programmi di lotta alla malattia pari 3,3 miliardi di dollari nel 2020 (ma l'OMS indica per questo stesso anno sarebbero serviti investimenti per 6,8 miliardi), la malaria ancora oggi causa 627.000 morti all'anno dei quali l'80% sono bambini al di sotto dei 5 anni di età.

Dai dati emerge che la maggior parte dei casi di malattia (95%) e dei decessi (96%) sono stati registrati nella regione Africana [AFRO], (figura 4), seguita dalla regione Mediterraneo Orientale [EMRO] con il 2,4% dei casi (il 56% dei casi di questa regione sono stati riscontrati in

Sudan), dalla regione Sud-Est Asiatico [SEARO] con il 2% dei casi (l'83% dei casi di questa regione sono stati riscontrati in India), dalla regione Pacifico Occidentale [WPRO] con lo 0,7% dei casi e dalla regione delle Americhe [AMRO] con lo 0,3% dei casi. Si stima che complessivamente almeno 4 miliardi di persone siano ancora a rischio di contrarre la malattia, o comunque siano esposte all'infezione malarica in 85 Paesi o aree geografiche.

Figura 4. Ripartizione del globo nelle regioni dell'OMS



Da http://origin.who.int/about/regions/en/ (modificata)

Tuttavia grazie agli interventi messi in atto dall'OMS dal 2000 al 2020 il numero di decessi si è decisamente ridotto: del 56% (da 909 morti a 409) nella regione delle Americhe, del 47% (da 6.100 to 3.200) nella regione Pacifico occidentale, del 10% (da 13.700 a 12.300) nella regione Mediterraneo Orientale e del 75% (da 35.000 a 9.000) nella regione Sud Est Asiatico.

Nell'aprile del 2016, l'OMS ha dichiarato la Regione Europea (EURO) *malaria free,* prima regione OMS a raggiungere questo obiettivo, anche se tra il 2015 e il 2018 diversi casi autoctoni di malaria da *P. vivax* (37) sono stati riportati in Grecia.

Noi italiani, come tutti gli europei, rischiamo di contrarre la malaria solo quando ci rechiamo in zone endemiche a rischio per vacanza o per lavoro o per attività di volontariato, o come azione correlata ad attività sanitaria (puntura accidentale o trasfusione) o per trasmissione da zanzare importate mediante bagaglio o mediante carichi di merci in area aeroportuale.

Dal 2000 al 2015, la strategia OMS, basata principalmente sulla diffusione delle zanzariere da letto impregnate con insetticida e con lo spray anti-zanzare e i trattamenti con insetticidi ad azione residua nelle abitazioni, ha portato a una riduzione del 58% della mortalità fra i bambini sotto i 5 anni in Africa. Complessivamente, in questo lasso di tempo, si è avuta una riduzione dell'incidenza della malaria del 30% e del tasso di mortalità del 47%, evitando così 4,3 milioni di morti.

Nel 2015 l'OMS ha rivisto la propria strategia per l'eradicazione, esplicitata nel documento "*Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*" (aggiornato nel 2021), con la quale si prefigge di eradicare la malaria in almeno altri 35 Paesi e di ridurre il numero di morti e di nuovi casi del 90% entro il 2030 rispetto al 2015.

Per raggiungere questi obbiettivi sono però necessari investimenti molto maggiori di quelli attuali; si stima che dovrebbero essere pari a 9,3 miliardi di dollari/anno fino al 2025 per poi arrivare nel 2030 a 10,3 miliardi.

Inoltre, i contrasti sociali e geopolitici (conflitti, instabilità politica, migrazioni), i cambiamenti climatici (uragani, inondazioni) e ambientali potrebbero ulteriormente complicare il raggiungimento dei traguardi prefissati.

Il 6 ottobre 2021, con uno storico annuncio, l'OMS ha raccomandato l'uso del vaccino per la malaria RTS,S/AS01 (RTS,S) nei i bambini, a partire dal quinto mese di vita, nelle regioni subsahariane, o altre, con trasmissione della malaria da *P. falciparum* alta o moderata.

Il vaccino RTS,S, che si basa sul principale antigene di superficie dello sporozoite di *P. falciparum*, la proteina circumsporozoite (CSP), è stato approvato dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA) nel 2015.

Prima di arrivare alla raccomandazione, nel 2019, è stato implementato un programma pilota di vaccinazione in tre paesi africani (Ghana, Kenya, Malawi), su oltre 830.000 bambini con 2,4 milioni di dosi iniettate, che ha confermato la sicurezza del vaccino, ma anche la sua limitata efficacia. Si è avuta una riduzione del 40% degli episodi malarici e del 30% delle forme gravi della malattia.

Si tratta, comunque di un grande passo in avanti, ma l'OMS ci ricorda che questo vaccino contro la malaria va considerato come un intervento complementare che affianca e non sostituisce il pacchetto di interventi esistenti (uso delle zanzariere trattate con insetticida, accesso alla diagnosi, accesso alle terapie).

1.2.2 Situazione in Italia

In Italia, come nel resto dei Paesi della regione EURO la malaria è per ora presente come malattia d'importazione, ad eccezione di un caso da *P. vivax* verificatosi in Toscana, in provincia di Grosseto, nel 1997, classificato dopo accurata indagine epidemiologica come autoctono introdotto. Altri due casi di *P. vivax* sospetti autoctoni introdotti sono stati riportati nel 2009 e 2011, rispettivamente a Roma e Cosenza. Successivamente sono stati segnalati un caso di *P. ovale* a Pesaro, quattro casi in Puglia da *P. falciparum* nel 2017 e un caso a Firenze ancora da *P. falciparum* nel 2018, tutti classificati come "criptici". Da rilevare ancora il caso fatale di malaria nosocomiale avvenuto a Trento nel settembre del 2017.

Anche in Italia, come in altri Paesi europei storicamente legati tramite le colonie ai continenti ad elevata endemia malarica (Regno Unito, Francia, Spagna, Portogallo, Belgio e Olanda), si è avuto un aumento dei casi di malaria d'importazione dalla fine degli anni 80 del secolo scorso. A partire dal 1995 il numero di casi rilevati in stranieri ha superato quello dei casi dei cittadini italiani; l'aumento è legato principalmente all'aumento dei flussi migratori dai Paesi africani subsahariani verso l'Italia.

Negli italiani e negli stranieri il maggior numero di casi si rileva tra settembre e ottobre, dopo le vacanze estive, e nei primi mesi dell'anno in conseguenza del maggior flusso turistico per le vacanze di fine anno. I casi totali sono soprattutto di provenienza africana (93%) e sono prevalenti le forme da *P. falciparum* (circa l'84%), successivamente si rilevano *P. vivax* (9%), *P. ovale* (5%) e *P. malariae* (1,5%); nello 0,3% circa dei casi si sono diagnosticate forme miste.

Si ricorda, pertanto, che il primo allarme deve partire dal paziente e/o dal suo curante e poiché non si deve indugiare, al primo attacco febbrile dopo il rientro da zone a rischio (Africa, India e Sud-Est Asiatico, Centro e Sud- America, Papuasia) si impone la ricerca del parassita. Già 2-3 giorni di ritardo potrebbero essere rischiosi se non addirittura fatali.

La malaria è malattia soggetta a notifica obbligatoria e il Ministero della Salute e l'Istituto Superiore di Sanità hanno l'incarico di mantenere un Sistema di Sorveglianza Nazionale per la valutazione annuale della situazione epidemiologica dei casi importati, e per poter intervenire prontamente sul territorio in caso di sospetti eventi autoctoni come stabilito dalla circolare ministeriale del 27 dicembre 2016 " Prevenzione e controllo della malaria in Italia".
https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2016&codLeg=57366&parte=1%20&serie=null

1.3 CLINICA: CENNI DI PATOGENESI, SINTOMI E SEGNI CLINICI

La malaria è una malattia febbrile acuta. In un individuo non immune i sintomi compaiono a distanza di 7 giorni o più (sino a 14-21 gg) dalla puntura infettante della zanzara. I primi sintomi, generici ed in parte aspecifici, quali febbre, cefalea, brividi e vomito possono essere lievi e difficili da attribuire alla malaria. Se non trattata entro 24 ore, la malaria da *P. falciparum* può evolvere in una malattia grave, che in molti casi porta alla morte. Da qui l'importanza di un esame dello striscio di sangue al minimo sospetto d'infezione malarica e di una prima risposta entro 2 ore dal prelievo.

I bambini affetti da malaria grave possono andare incontro a anemia grave, sofferenza respiratoria e acidosi metabolica, malaria cerebrale. Può essere presente anche diarrea.

Nelle aree endemiche le persone possono sviluppare una parziale immunità che rende possibile l'insorgenza di infezioni asintomatiche.

Anche dolori articolari e astenia sono sintomi che, senza un corretto riscontro anamnestico, possono fuorviare ed indirizzare verso altre diagnosi (es. sindrome influenzale) e quindi favorire un atteggiamento di attesa con conseguente pericoloso ritardo nell'applicazione di un corretto trattamento.
Le manifestazioni cliniche dell'accesso malarico, di norma, compaiono in presenza di una parassitemia minima (soglia pirogena) che per *P. falciparum* è di circa 10.000 parassiti/µL (0,2%) nel paziente semi immune, ma di circa 100/µL (0,002%) nel paziente non immune; per le altre specie la soglia pirogena è di circa 100/µL.

La febbre

Non è a tutt'oggi completamente chiaro il meccanismo patogenetico della febbre. Probabilmente l'attacco febbrile è causato dalla rottura dei globuli rossi da parte degli schizonti maturi con liberazione dei merozoiti e di molecole come l'emozoina che si lega con il DNA del parassita favorendone l'ingresso nelle cellule del sistema immunitario innato; il DNA legandosi al TLR-9 (*Toll-like receptor 9*) favorisce l'attivazione della via ciclo-ossigenasica e quindi la sintesi di PGE2 (Prostaglandine E2) che agiscono a livello delle regioni ipotalamiche deputate alla termoregolazione.

Fino a quando però non si raggiungerà una sincronizzazione nella rottura delle emazie non si raggiungerà la regolare periodicità febbrile che varia a seconda della durata del ciclo eritrocitario di ciascuna specie (vedi ciclo vitale a pag. 65). Avremo quindi le cosiddette febbri "terzana" per P. *falciparum, P. vivax* e *P. ovale*, "quartana" per *P. malariae*, "quotidiana" per *P. knowlesi*.

Nell'infezione primaria non si avrà quasi mai una regolare intermittenza. Perciò in caso di sospetta infezione malarica lo striscio di sangue va eseguito anche in assenza di febbre. Se negativo andrà rifatto alla successiva puntata febbrile o dopo 12-24 ore anche in assenza di febbre.

Quadri clinici legati alla specie

Malaria cerebrale da *P. falciparum*: è caratterizzata da cambiamenti della personalità (eccitazione, stato maniacale), convulsioni, encefalite, sindrome cerebellare, alterazioni oculari fino ad emorragia retinica. Quale sia la causa di tutto ciò non è ancora chiaro. È sicuramente riconosciuta l'importanza del disporsi in pile delle emazie parassitate e la loro capacità adesiva all'endotelio dei capillari, favorita dagli elevati livelli di TNF-α.

Nell'attesa che vengano messi a disposizione tecniche di misurazione e marker più affidabili nel predire un'evoluzione a malaria cerebrale, l'unica cosa che possiamo fare è indicare l'indice di parassitemia (valori superiori al 5% delle emazie parassitate hanno valore prognostico sempre più

sfavorevole, tanto che alcuni autori ritengono utile l'exanguino trasfusione in caso di parassitemia di almeno il 10%).

P. vivax e *P. ovale*: la malaria da questi plasmodi può essere caratterizzata da recidive a lungo termine per riattivazione degli ipnozoiti nel fegato; sono possibili anche dopo 15-20 mesi. Diviene indispensabile fare diagnosi di specie corretta per utilizzare farmaci schizonticidi tessutali come la Primachina (che non va però utilizzata in soggetti con deficienza di G6PD).

P. malariae: recrudescenze sono state riscontrate anche dopo 52 anni. Sono dovute al persistere di una bassissima parassitemia di *P. malariae* stesso.

P. knowlesi: diversi casi possono essere severi e condurre a morte. Infatti, a differenza degli altri parassiti malarici, il ciclo di replicazione di *P. knowlesi* è di 24 ore, e questo può portare ad avere nel paziente parassitemie elevate in breve tempo. I pazienti con parassitemia > 50.000 parassiti/µl devono essere trattati con urgenza e attentamente monitorati fino al controllo completo dell'infezione. Studi clinici indicano che più del 10% dei pazienti con malaria da *P. knowlesi* sviluppano una malattia severa con circa l'1% di malaria cerebrale e possibile morte.

FOCUS

Al minimo sospetto d'infezione malarica (ad esempio attacco febbrile dopo il rientro da zone a rischio) si impone la ricerca dei plasmodi nel sangue.

La malaria è l'unica vera urgenza in parassitologia; il laboratorio deve essere in grado di fornire una prima risposta entro 2 ore dal prelievo.

In un soggetto non immune la malaria da *P. falciparum*, ma anche da *P. knowlesi*, se non trattata entro 24 ore dalla comparsa dei sintomi può evolvere in una malattia grave che in molti casi porta alla morte.

1.4 FASE PREANALITICA

Prelievo

Classicamente si ritiene che il prelievo andrebbe eseguito alcune ore dopo l'attacco febbrile, quando avviene la rottura degli schizonti e quindi sono presenti numerosi trofozoiti giovani all'interno delle emazie. Se questo è vero per le infezioni da *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* altrettanto non può dirsi per le infezioni da *P. falciparum* ove, a circa metà del ciclo di 48 ore, i trofozoiti devono raggiungere il circolo degli organi profondi per poter effettuare la schizogonia.

Nella pratica la ricerca s'impone quando è presente un sospetto clinico/epidemiologico di infezione, anche in assenza di febbre. Se negativa, la ricerca va ripetuta ogni 12-24 ore anche senza febbre.

Il campione ideale dovrebbe essere prelevato da capillare con puntura da polpastrello (meglio se del 4° o 5° dito) o da lobo auricolare (alluce nei neonati). Il sangue senza anticoagulante è ottimale in quanto l'anticoagulante può provocare modificazioni morfologiche dei parassiti; tuttavia con tali campioni è in genere possibile allestire solo una goccia spessa e uno striscio sottile che non sempre sono sufficienti per un corretto esame microscopico nonché per l'invio degli strisci sottili a chi di competenza (Istituto Superiore di Sanità, Roma) come indicato nella circolare ministeriale del 27 dicembre 2016 "Prevenzione e controllo della malaria in Italia".

Si propone pertanto di utilizzare un campione di sangue prelevato da vena periferica e conservato in provetta con anticoagulante (EDTA).

Il contatto per più di 4-6 ore con l'anticoagulante può portare a delle modificazioni morfologiche dei parassiti e delle emazie parassitate; ad esempio nelle infezioni da *P. vivax* e *P. ovale* le tipiche granulazioni possono non essere più visibili, le emazie possono apparire ovalizzate o sfrangiate e i gametociti maschili di tutte le specie possono exflagellare.

Inoltre si è visto che già dopo 4-6 ore il numero dei parassiti visibili può diminuire; conservando il sangue in EDTA per 24 ore a 4° C può diminuire del 50%, in alcuni casi con bassa parassitemia i parassiti potrebbero non essere evidenziati.

Per minimizzare questi effetti i prelievi devono essere trasportati in laboratorio nel più breve tempo possibile (al massimo entro 30 minuti dal prelievo) e i vetrini devono essere immediatamente allestiti appena il campione arriva in laboratorio (al massimo entro 30 minuti).

FOCUS

Il prelievo va eseguito quando vi è un sospetto clinico/epidemiologico di infezione, anche in assenza di febbre. Se negativa, la ricerca va ripetuta ogni 12-24 ore anche senza febbre.

I prelievi devono essere trasportati in laboratorio nel più breve tempo possibile, al massimo entro 30 minuti dal prelievo.

I vetrini per l'esame microscopico devono essere allestiti al massimo entro 30 minuti dall'arrivo in laboratorio.

1.5 TECNICHE DIAGNOSTICHE

1.5.1 MICROSCOPIA

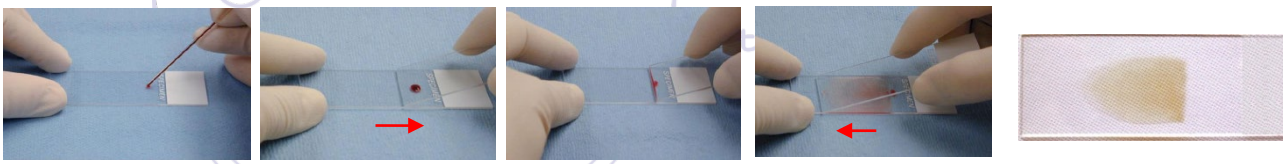
Il ciclo biologico dei parassiti malarici prevede nell'uomo una fase eritrocitaria in cui il parassita è presente nei globuli rossi ed è per questo motivo che i plasmodi vanno ricercati su preparati di sangue colorati con una colorazione panottica (Giemsa o simili).

Vengono allestiti striscio sottile e goccia spessa: lo striscio sottile ha maggiore specificità e minore sensibilità, infatti consente di identificare più agevolmente la specie e lo stadio del parassita in base alle sue caratteristiche morfologiche e a quelle dell'eritrocita parassitato, ma la ricerca del parassita avviene in un ridotto volume di sangue e la determinazione della densità parassitaria è accurata soltanto a parassitemie relativamente elevate; la goccia spessa ha invece maggiore sensibilità (mediamente di 10-15 volte superiore rispetto allo striscio sottile) in quanto il volume di sangue osservato è maggiore e i parassiti vengono concentrati, ma ha minore specificità dato che i parassiti vengono osservati in seguito a lisi delle emazie rendendo più difficoltoso il riconoscimento di caratteristiche morfologiche distintive, consente però una valutazione più accurata della parassitemia anche a basse densità parassitarie.

Striscio sottile

Si prepara depositando su un vetrino una piccolissima goccia di sangue (3-5 µL) che deve essere strisciata utilizzando il bordo di un secondo vetrino tenuto inclinato in modo da formare un angolo di 45° circa.

Figura 5. Allestimento dello striscio sottile



Da: *Centers for Diseases Control and Prevention – CDC* (modificata).

Far asciugare all'aria il preparato, quindi fissare con metanolo per circa 5-10 secondi.

Nello striscio sottile le emazie devono formare un singolo strato, non sovrapposte tra di loro, e il sangue non deve ricoprire completamente la superficie del vetrino ma deve essere possibile osservare al microscopio ottico i margini laterali e terminale dello striscio ove è più facile osservare le emazie parassitate.

Consente di studiare la morfologia dei plasmodi e delle emazie parassitate, nonché di valutare la parassitemia che viene espressa in % di emazie parassitate.

Goccia spessa

Si prepara depositando su un vetrino una piccola goccia di sangue (10-20 µL). Allargare la goccia fino ad ottenere una superficie di circa 1-1,5 cm di diametro (secondo la grandezza iniziale della goccia), utilizzando l'angolo di un altro vetrino, con movimento rotatorio e grattando leggermente la superficie del vetrino per favorire l'aderenza. Se si parte da sangue capillare, senza anticoagulante, il movimento rotatorio deve essere protratto per circa 2 minuti in modo da permettere una completa defibrinazione.

Figura 6. Allestimento della goccia spessa

Da: *Centers for Diseases Control and Prevention – CDC* (modificata).

Lasciare asciugare all'aria 18-24 ore. In caso di urgenza, se il vetrino è stato preparato con il metodo del grattamento, si può far asciugare in termostato a 37° C per 30-60 minuti.

Lo spessore della goccia spessa è soddisfacente quando è possibile leggere attraverso il preparato un testo stampato.

NON FISSARE il preparato: le emazie durante la colorazione devono lisarsi.

Questa tecnica ha il vantaggio di concentrare su una piccola superficie una gran quantità di emazie e quindi di parassiti. Non consente una differenziazione agevole delle varie specie di plasmodi in quanto la loro morfologia è alterata. Consente invece di calcolare in modo accurato la parassitemia assoluta espressa come numero di parassiti per microlitro di sangue.

È buona norma preparare più di un vetrino per lo striscio sottile e la goccia spessa, colorarne un paio e conservare gli altri non colorati in modo da ovviare ad eventuali inconvenienti che potrebbero verificarsi durante la colorazione.

Tutti i preparati vanno conservati lontano da fonti di calore, di umidità e di agenti chimici (alcool, acidi, ecc.).

Colorazione

Esistono diverse tecniche di colorazione che differiscono per le concentrazioni dei coloranti usati, le diluizioni operate e i tempi di colorazione (colorazione di Giemsa, di May-Grunwald Giemsa, di Field). Sono comunque tutte a base di eosina che colora la cromatina del parassita e le granulazioni in rosa-rosso e di blu di metilene che colora il citoplasma parassitario in azzurro.

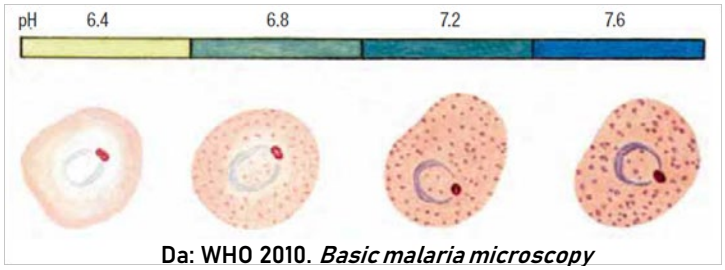
Di seguito riportiamo quella raccomandata da OMS che utilizza una soluzione di Giemsa in acqua tamponata a pH 7,2 al 3% o al 10% per le urgenze.

Si possono utilizzare diluizioni diverse considerando che più è concentrata la soluzione di Giemsa minore sarà il tempo di colorazione (Giemsa al 3%: 45-60 minuti, al 5%: 20-30 minuti, al 10%: 8-10 minuti), tenendo comunque presente che i migliori risultati si ottengono con una colorazione "lenta".

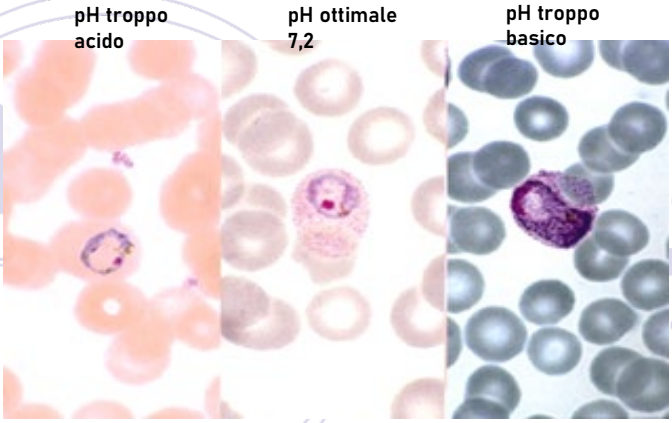
L'acqua tamponata a pH 7,2 è di importanza fondamentale per ottenere una colorazione delle emazie e dei parassiti ottimale per la diagnosi; inoltre consente di visualizzare le granulazioni nelle infezioni da *P. vivax* e di *P. ovale*, rispettivamente granulazioni di Schüffner e di James (figura 7).

Per la preparazione dell'acqua tamponata a pH 7,2 si rimanda a quanto indicato in "*Basic Malaria Microscopy-2nd ed.*" (https://www.who.int/publications/i/item/9241547820).

Figura 7. Colorazione e pH



Da: WHO 2010. *Basic malaria microscopy*



Da: *Centers for Diseases Control and Prevention – CDC* (modificata).

Al posto dell'acqua tamponata è possibile utilizzare, con ottimi risultati, acqua minerale in commercio a pH 7,2-7,3. Oltre all'acqua minerale Evian®, la prima presa in considerazione nel lavoro originale del prof. J. C. Petithory, anche in Italia sono presenti numerose acque minerali con pH idoneo.

È possibile valutare i risultati della colorazione dal colore assunto dalle emazie; rosa-grigiastro: colorazione corretta; da rosa acceso a rosso: acqua acida; da blu a verdastro: acqua basica.

Colorazione dello striscio sottile e della goccia spessa con Giemsa

La soluzione madre di Giemsa deve essere conservata in un luogo fresco al riparo dalla luce.

La soluzione di lavoro di Giemsa deve essere preparata di volta in volta e deve essere cambiata ad ogni colorazione.

Può essere riutilizzata unicamente se si sono colorati pochi vetrini (2-4), in questo caso deve essere utilizzata in giornata conservandola al riparo dalla luce.

La colorazione deve avvenire per immersione e non per deposizione del colorante sul vetrino.

- In un cilindro graduato o in una provetta tipo Falcon da 50 mL miscelare:
  - Giemsa al 3%: 1,5 mL di colorante di Giemsa in 48,5 mL di acqua tamponata.
  - Giemsa al 10%: 5 mL di colorante di Giemsa in 45 mL di acqua tamponata.
- Trasferire la soluzione in una vaschetta per colorazioni tipo Coplin da 50 mL.

N.B. Al fine di ridurre le impurità contenute nel colorante di Giemsa, che depositandosi sul vetrino possono rendere difficile la lettura del preparato stesso, è opportuno filtrare la soluzione con appositi filtri per siringa (pori 0.45µm) o con carta bibula.

- Immergere i vetrini nella vaschetta contenente la soluzione di Giemsa.
- Colorare per 45-60 minuti (Giemsa al 3%) oppure 8-10 minuti (Giemsa al 10%).
- Lavare i vetrini immergendoli per alcuni secondi in una vaschetta contenente acqua tamponata o di fonte. Il lavaggio della goccia spessa deve essere particolarmente delicato.
- Porre i vetrini ad asciugare tenendoli in posizione verticale.

FOCUS

Per la colorazione di Giemsa è fondamentale l'utilizzo di acqua tamponata pH 7,2.

La soluzione di lavoro (Giemsa al 3% o 5% o 10%) deve essere sostituita ad ogni colorazione.

Osservazione microscopica: striscio sottile

Si osserva lo striscio a piccolo ingrandimento (obiettivo 10x) per individuare le zone ove le emazie sono disposte su un unico strato, poi si esamina attentamente lo striscio usando l'obiettivo 100x ad immersione.

Si osservano almeno 200 campi microscopici; l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) raccomanda almeno 400 campi prima di refertare come negativo un preparato.

Durante l'osservazione microscopica si deve seguire un percorso ben definito (in modo da disegnare una cornice greca) per evitare di girare intorno ad una medesima area, continuando ad osservare sempre i medesimi campi microscopici. La lettura va effettuata da operatori esperti, che assicurino risultati di alta qualità. L'esperienza di valutazioni esterne della qualità (con frequenza di risultati errati anche del 10-30%) conferma l'alto rischio di errori nell'ambito di queste indagini.

Lo sfondo del preparato deve apparire privo di detriti grossolani e le emazie di colore rosa grigiastro. I leucociti neutrofili presentano nuclei color viola scuro e granuli ben definiti. Le emazie parassitate da *P. vivax* o *P. ovale* appaiono punteggiate dalle granulazioni (*dots*) di Schüffner e di James, mentre quelle parassitate da *P. falciparum* possono contenere delle piccole macchie (*clefts*) dette di Maurer.

Osservazione microscopica: goccia spessa

Si osserva il preparato a piccolo ingrandimento (obiettivo 10x) per individuare le zone ove siano presenti numerosi leucociti. Poi si utilizza l'obiettivo ad immersione (100x) e si esamina attentamente il preparato. L'OMS raccomanda di osservare almeno 100 campi microscopici prima di refertare il campione come negativo, ma nei pazienti non immuni può essere necessario esaminare almeno 300 campi se non l'intero vetrino. Per fare ciò un microscopista esperto impiega almeno 10 minuti.

Lo sfondo del preparato deve apparire di colore grigio chiaro, a causa della lisi delle emazie, e privo di detriti grossolani. I nuclei dei leucociti, che non vengono lisati come i globuli rossi, appaiono di colore viola scuro. I parassiti malarici appaiono con cromatina rosso scuro e citoplasma azzurro pallido.

Limiti di sensibilità dell'esame microscopico

Quando i preparati sono letti da un microscopista esperto in media la sensibilità dello striscio sottile è di circa 100 parassiti per μL di sangue (≈ 0,002%), mentre quella della goccia spessa è di circa 10-20 parassiti per μL di sangue (≈ 0,0002%).

Nei casi di bassissima parassitemia possono insorgere delle difficoltà nella rilevazione microscopica dei parassiti.

Basse parassitemie sono presenti in tre condizioni cliniche:

1. infezione malarica in individui semi-immuni che sviluppando una vigorosa reazione immunitaria impediscono una schizogonia massiva;
2. infezione malarica in soggetti non immuni in corso di profilassi o in seguito a trattamento incompleto o solo parzialmente efficace;
3. infezioni da *P. falciparum* iper-sincronizzate: sono casi molto rari in cui lo striscio periferico può essere negativo, con parassitemia al di sotto della soglia, perché la maggior parte dei plasmodi sono allo stadio di schizonte, sequestrati nei capillari degli organi interni e quindi assenti nel circolo periferico, oppure perché vi è appena stata emolisi massiva dovuta alla rottura degli schizonti stessi e dell'emazia che li conteneva.

In questi casi una rapida diagnosi di malaria è fondamentale, perché un risultato falsamente negativo può condurre all'exitus o, nel caso al punto uno, a forme croniche.

FOCUS

Prima di considerare negativo un campione osservare:

- **200-400 campi microscopici per lo striscio sottile;**
- **100-300 campi microscopici per la goccia spessa.**

associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

1.5.2 VALUTAZIONE DELLA PARASSITEMIA

La valutazione della parassitemia, ovvero del numero di parassiti presenti nel sangue, è indispensabile nelle infezioni da *P. falciparum* e *P. knowlesi* per due motivi:

– la gravità dell'infezione è correlata al numero di emazie parassitate. Ad esempio, per *P. falciparum* una parassitemia del 2% (≈ 100.000/µL) è già considerata indice di infezione grave, valori superiori al 5% (≈ 250.000/µL) hanno un significato prognostico sfavorevole;

– è necessario verificare l'efficacia del trattamento ed evidenziare possibili farmacoresistenze. La conta dei parassiti deve essere effettuata quotidianamente fino alla scomparsa dei parassiti.

La parassitemia può essere determinata sia sulla goccia spessa espressa in valore assoluto, sia sullo striscio sottile espressa in percentuale.

L'OMS raccomanda di determinare la parassitemia sulla goccia spessa espressa in valore assoluto (Nr parassiti/µL).

In genere nella quotidiana pratica clinica viene però utilizzato il calcolo della parassitemia in percentuale effettuata sullo striscio sottile; va comunque tenuto presente che tale metodo di calcolo è abbastanza accurato solo quando la parassitemia è relativamente elevata (>5.000/µL pari a circa >0,1%).

I principali programmi di Valutazione Esterna della Qualità come ad esempio UKNEQAS o VEQ Regioni Toscana-Lombardia prevedono di norma l'invio del solo striscio sottile e pertanto la parassitemia deve essere espressa in percentuale di emazie parassitate.

Calcolo della parassitemia in relazione ai leucociti: goccia spessa

A piccolo ingrandimento (obiettivo 10x) si sceglie una zona del preparato ove siano presenti numerosi leucociti. Utilizzando l'obiettivo 100x si contano separatamente i leucociti e i parassiti osservati nei diversi campi microscopici. Se dopo aver contato 200 leucociti sono stati contati anche 10 o più parassiti si può procedere al calcolo della parassitemia. Viceversa se dopo aver contato 200 leucociti il numero dei parassiti osservati è 9 o meno, allora si prosegue l'osservazione microscopica fino a contare 500 leucociti registrando contestualmente il numero di parassiti incontrati. A questo punto si può calcolare il numero di parassiti presenti in un microlitro di sangue applicando la seguente formula:

(Nr Parassiti Contati/Nr Leucociti Contati) x Leucociti/µL = Parassiti per µL

Se non si conosce il numero di leucociti/µL è possibile calcolare approssimativamente presumendo 8.000 leucociti/µL.

Calcolo della parassitemia in relazione alle emazie: striscio sottile

Si conta il numero di emazie parassitate su un totale di emazie che varia da almeno 1.000 a 2.000 o più a seconda dei casi e si esprime la parassitemia in percentuale (%):

(Nr Emazie Parassitate/Nr Emazie Contate) x 100 = Parassitemia %

Se la parassitemia è alta (>1%) è possibile esaminare solo 1.000 emazie; se è bassa (<1%) si dovranno esaminare 2.000 RBC o più. Più elevato è il numero di emazie contate, più preciso è il

calcolo della parassitemia. Le emazie poliparassitate vengono contate come una sola emazia infetta, mentre i gametociti non si contano.

Conoscendo il numero di emazie/µL del paziente è possibile convertire la percentuale nel numero di parassiti/µL applicando la formula: (% emazie parassitate x nr emazie/µL)/100. Se non si conosce il

numero delle emazie/µL è possibile calcolare approssimativamente presumendo 5.000.000 emazie/µL.

FOCUS

La valutazione della parassitemia è indispensabile nelle infezioni da *P. falciparum* e da *P. knowlesi*

1.5.3 IDENTIFICAZIONE E DIAGNOSI DIFFERENZIALE DEI PLASMODI

La diagnosi differenziale dei plasmodi si effettua su striscio sottile. In alcuni casi è possibile identificare la specie anche dalla goccia spessa.

Munirsi sempre di un buon atlante di immagini; anche le tavole a colori edite dall'OMS offrono un valido supporto per la diagnosi.

Per la corretta diagnosi di specie bisogna tener presente i seguenti punti fondamentali:

a) i plasmodi sono parassiti endocellulari che compiono l'intero ciclo di sviluppo prima negli epatociti e poi nei globuli rossi;

b) con la colorazione di Giemsa, effettuata al giusto pH (7,2), l'emazia si colora omogeneamente in rosa o rosa grigio, mentre il parassita presenta il citoplasma azzurro-grigio e la cromatina del nucleo assume varie sfumature di rosso;

c) nel citoplasma del plasmodio può esservi presenza di pigmento giallo-bruno o bruno scuro (emozoina);

d) durante il ciclo di sviluppo il parassita assume forme e dimensioni diverse;

e) nel citoplasma delle emazie parassitate possono esservi granulazioni rossastre più o meno fini;

f) la forma, la grandezza e il colore delle emazie parassitate possono variare. Il parassita può indurre delle modificazioni nell'emazia che lo contiene e questa può diventare ipertrofica, assumere forme ovali o allungate, decolorarsi o presentare sfrangiature.

Nel sangue periferico si possono riscontrare i seguenti stadi di sviluppo dei plasmodi: trofozoiti giovani e maturi, schizonti in via di sviluppo e maturi, gametociti immaturi e maturi. Sono tutti intraeritrocitari.

In tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche morfologiche delle specie di *Plasmodium*, in Appendice B sono riportati disegni e immagini fotografiche dei vari stadi di sviluppo delle specie.

TROFOZOITI possono assumere forme diverse:

– ad anello (*ring form*): il citoplasma presenta un vacuolo più o meno grande. La massa cromatinica (nucleo) forma il castone dell'anello e può essere unica o doppia; nell'emazia il trofozoite è situato in posizione centrale o periferica (forme marginali), a volte appiattito sul bordo. I trofozoiti ad anello sono forme precoci dei plasmodi malarici;

– ameboide: il citoplasma è irregolare e sfrangiato in fini pseudopodi, il nucleo è più o meno periferico. Questi trofozoiti sono forme in maturazione del plasmodio malarico.

– compatta: il citoplasma è più abbondante, mentre il vacuolo è molto ridotto o scomparso; il nucleo è sempre periferico. Sono forme mature o quasi mature dei trofozoiti malarici.

SCHIZONTI: sono plasmodi in fase di replicazione, all'interno dei quali si vedono i singoli merozoiti. A volte i nuclei (merozoiti) circondano una massa di pigmento centrale dando al parassita la classica forma a "rosetta" (*P. malariae*). All'interno dell'emazia i merozoiti possono variare da 4 a 32 a seconda della specie e del grado di maturazione.

GAMETOCITI: sono forme molto grandi che tendono ad occupare tutto, o quasi, il globulo rosso che spesso viene deformato. Nei gametociti femminili (macrogametociti) il citoplasma è di colore blu con varie sfumature e il nucleo è formato da una grossa massa di cromatina compatta, nei gametociti maschili (microgametociti) il nucleo di colore dal rosa/rosso al lilla occupa buona parte del parassita. Nel citoplasma di entrambi sono presenti granuli di pigmento.

Tabella 1. Principali caratteristiche morfologiche delle specie di *Plasmodium*

	P. falciparum	*P. vivax*	*P. ovale*	*P. malariae*	*P. knowlesi*
EMAZIE PARASSITATE	Grandezza normale. A volte presenti macchie di Maurer. Poliparassitismo frequente.	Grandezza aumentata. Granulazioni di Schüffner. Poliparassitismo non raro.	Grandezza normale o leggermente aumentata. Frequenti forme ovali e/o fimbriate. Granulazioni di James. Poliparassitismo non raro.	Grandezza normale o diminuita Poliparassitismo eccezionale.	Grandezza normale o leggermente diminuita. Granulazioni di Sinton e Mulligan. Poliparassitismo frequente.
TROFOZOITI GIOVANI (forme ad anello)	Piccoli, sottili. Spesso 2 o più trofozoiti per emazia. Frequenti le forme marginali e/o appiattite sul bordo dell'emazia. Spesso 2 masse cromatiniche.	Grandi con contorni irregolari. 1 grossa massa cromatinica, a volte 2. Raramente 2 forme per emazia.	Abbastanza grandi con contorni netti (compatto). Nucleo abbastanza grande.	Compatti, contorni netti. Una grande massa cromatinica.	Piccoli sottili. Possibili 2 o più trofozoiti per emazia. Occasionalmente forme marginali sul bordo dell'emazia. 1- 2 grandi masse cromatiniche.
TROFOZOITI ANZIANI	Più grandi del trofozoite giovane, in genere compatti. Presenza di macchie di Maurer e, raramente, di grani di pigmento.	Grandi, forma ameboide. Citoplasma frammentato con piccoli grani di pigmento.	Grandi, rotondi, non d'aspetto ameboide. Grossi grani di pigmento bruno.	Compatti, rotondi o ovali, a volte in banda equatoriale (aspetto caratteristico). Molto pigmento bruno.	Compatti, occasionalmente in banda equatoriale. Molto pigmento bruno.
SCHIZONTI MATURI	Rari nel sangue periferico, ove sono segno di infezione grave. 8-20 usualmente 16 merozoiti (nei vasi profondi).	16-24 merozoiti. Pigmento fine e sparso.	12-16 usualmente 8 merozoiti. Pigmento bruno.	6-12 merozoiti usualmente 8, spesso disposti a rosetta attorno a una massa di pigmento giallo-bruno	Fino a 16 usualmente 10 merozoiti disposti a volte a rosetta attorno a una massa di pigmento giallo-bruno.
GAMETOCITI	A forma di "falce"; rare le forme rotonde/ovali. Macrogametocita (colore azzurro) con pigmento abbondante concentrato; pigmento più diffuso nel microgametocita (colore rosa, lilla).	Grandi di forma rotondo-ovale. Pigmento in granuli diffuso sia nel macro sia nel microgametocita. Colori simili a quelli di *P. falciparum*.	Rotondi più piccoli di *P. vivax*, di frequente difficili da distinguere dai trofozoiti anziani. Le altre caratteristiche (pigmento, colore) simili a *P. vivax*.	Piccoli, tondo-ovali, compatti. Le altre caratteristiche (pigmento, colore) simili a *P. vivax*.	Possono riempire tutta l'emazia, tondo-ovali, compatti. Le altre caratteristiche (pigmento, colore) simili a *P. vivax*.
PARASSITEMIA	Può essere molto elevata. In caso di accesso pernicioso fino a 20% (1.000.000/µL) o più.	Non troppo elevata. Mediamente 0,4% (20.000/µL), molto di rado più di 2%.	Non troppo elevata. Mediamente 0,4% (20.000/µL), molto di rado più di 1%.	Bassa. Mediamente 0,1% (5.000/µL), molto di rado più di 1%.	Elevata. può arrivare al 4-5% (≈ 250.000/µL) o più.
FORME OSSERVABILI NEL SANGUE PERIFERICO	Trofozoiti; Gametociti. Nell'accesso pernicioso anche Schizonti.	Trofozoiti; Schizonti; Gametociti.	Trofozoiti; Schizonti; Gametociti.	Trofozoiti; Schizonti; Gametociti.	Trofozoiti; Schizonti; Gametociti.

1.5.4 TECNICHE IMMUNOCROMATOGRAFICHE

Sono stati sviluppati test diagnostici rapidi (*Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) che utilizzano tecniche immunocromatografiche per evidenziare antigeni (Ag) malarici presenti nel sangue periferico per mezzo di anticorpi monoclonali.

Gli RDTs attualmente presenti sul mercato hanno come *target* una o più di tre proteine di *Plasmodium*: la proteina II ricca di istidina (HRP2), l'aldolasi e la lattato deidrogenasi plasmodiale (pLDH). La HRP2 è specifica di *P. falciparum* mentre l'aldolasi e il pLDH sono espresse in tutti e cinque i plasmodi umani e consentono, in linea di principio, il rilevamento di tutti loro (Pan-aldolasi e Pan-pLDH). Inoltre, la selezione di epitopi specifici per specie ha permesso lo sviluppo di anticorpi che riconoscono specificamente pLDH di *P. falciparum* (Pf-pLDH), pLDH di *P. vivax* (Pv-pLDH) o, collettivamente, pLDH di *P vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (Pvom-pLDH). I RDTs basati su HRP2 sono il principale tipo di prodotto per il rilevamento di *P. falciparum*, mentre il rilevamento specifico di *P. vivax*, la seconda specie di malaria più diffusa nell'uomo, richiede l'uso di RDTs basati su Pv-pLDH.
Dal 2006 l'OMS ha promosso un programma di valutazione atto a comparare l'efficacia dei test diagnostici rapidi disponibili sul mercato. Sono valutate: la stabilità termica a un'umidità ambientale elevata e la sensibilità a due densità parassitarie, debole la prima (200 plasmodi/µL) e più elevata la seconda (2.000 o 5.000 plasmodi/µL). In base alle *performance* viene assegnato un punteggio.
Le *performance* variano enormemente da un prodotto all'altro quando la parassitemia è debole (200 plasmodi/µL pari a circa lo 0,004%) soprattutto per *P. vivax*, mentre la maggioranza dei prodotti mostrano un punteggio elevato quando presenti da 2.000 a 5.000 plasmodi/µL (circa lo 0,04-0,1%).
Inoltre i test che ricercano l'antigene HRP2 di *P. falciparum* hanno dato i punteggi più alti.
Questi test non richiedono particolare strumentazione, i risultati sono disponibili in poco tempo (15 minuti), hanno un controllo positivo integrato per svelare eventuali errori di procedimento e possono risultare un ausilio diagnostico utile in situazioni di urgenza, quando è importante sapere nel più breve tempo possibile se un caso di malaria diagnosticato clinicamente è dovuto a *P. falciparum* o ad altre specie di plasmodi. Ricordiamo comunque che questi test rapidi devono essere sempre affiancati ad un esame microscopico. L'antigene HRP2 rimane presente nel sangue per 2-6 settimane dopo la terapia ed è rilevabile anche quando l'esame microscopico risulta negativo; quindi un test che ricerca solo o anche HRP2 non è efficace per il monitoraggio del trattamento della malaria.
Si possono avere risultati falsamente positivi in presenza di fattore reumatoide o anticorpi anti nucleo, ma anche se presenti anticorpi anti *Leishmania* o anti-Dengue.
Diversi studi segnalano la presenza, in zone endemiche quali Sud America (Amazzonia), India, Eritrea, Congo, Ghana, Ruanda di ceppi di *P. falciparum* con una delezione nei geni che codificano per pfhrp2 o pfhrp3.
Ne consegue che con i test che utilizzano unicamente anticorpi anti Ag HRP2 si possono avere falsi negativi.
Altre cause di falsa negatività possono essere la parassitemia molto bassa (<200 plasmodi/µL) o molto alta (effetto prozona).
Sebbene, come sopra detto, i test pan-plasmodiali in linea teorica evidenzino le infezioni da tutti i plasmodi umani, una recente meta analisi ha mostrato come i kit che oltre ad anticorpi specifici per *P. falciparum* (HRP2 o Pf-pLDH) incorporano anche anticorpi anti pan-plasmodiali (Pan-pLDH o Pan-aldolasi) abbiano una scarsa sensibilità nelle mono infezioni

da *P. knowlesi* (tra il 2% e il 48% nei vari studi); anche nelle mono infezioni da *P. ovale* e da *P. malariae* la sensibilità è risultata scarsa.
I dati attuali indicano pertanto che le prestazioni degli RDTs disponibili per rilevare infezioni da *P. knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale* siano ancora basse.

FOCUS

I test diagnostici rapidi in immunocromatografia devono essere sempre affiancati ad un esame microscopico.

Non utilizzare test che ricercano HRP2 per il monitoraggio della terapia.

1.5.5 TECNICHE MOLECOLARI

L'uso delle tecniche molecolari per la malaria può essere a grandi linee suddiviso in quatto ruoli:

1. rilevazione qualitativa o quantitativa dei parassiti;
2. identificazione di specie e determinazione delle infezioni miste;
3. genotipizzazione per distinguere tra recrudescenze e reinfezioni e per scopi epidemiologici;
4. rilevazione di mutazioni associate a resistenza ai farmaci antimalarici.

In questo documento non ci occupiamo della genotipizzazione e della rilevazione di marcatori di farmacoresistenza, che sono analisi attualmente di competenza di Istituti di Ricerca o di Centri di Riferimento, in particolare dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma.
Le tecniche molecolari più sensibili sono basate sull'amplificazione di determinate regioni del DNA dei plasmodi con la reazione a catena della polimerasi (PCR = *Polymerase Chain Reaction*)) o con reazione isotermica (LAMP = *Loop mediated isothermal amplification*). La PCR, la *Nested*-PCR e la *Real time* PCR (Rt-PCR monoplex o multiplex) consentono la diagnosi differenziale delle cinque specie di plasmodi umani utilizzando come bersaglio il gene che codifica per una piccola subunità dell'RNA ribosomiale. Tutte queste tecniche però trovano ancora scarsa applicazione nella diagnostica di routine. I principali limiti sono costituiti dalla necessità di operare in laboratori attrezzati, con personale specializzato e con costi ancora piuttosto elevati. Tuttavia l'elevata sensibilità e specificità, nonché la semplicità di interpretazione e riproducibilità dei risultati rendono queste tecniche uno strumento estremamente valido soprattutto per la diagnosi in presenza di basse parassitemie (parassitemie sub microscopiche) e per la corretta diagnosi di infezioni miste.
Attualmente sul mercato sono disponibili diversi kit commerciali per la diagnosi molecolare di malaria, ma manca ancora un metodo standardizzato per l'estrazione del DNA dai campioni e per la valutazione della densità parassitaria.
Le tecniche molecolari sono le tecniche diagnostiche più sensibili.
I kit Rt-PCR attualmente in commercio in Italia hanno una sensibilità analitica (LOD = *Limit Of Detection*) da <1 a 2 parassiti/µL e permettono sia lo screening per la diagnosi delle quattro specie antroponotiche di *Plasmodium*, sia la diagnosi di specie mediante l'uso di sequenze nucleotidiche specie specifiche. Nelle migliori condizioni i tempi di refertazione sono comunque di circa 2-3 ore e i test disponibili non forniscono informazioni clinicamente utili sull'entità della parassitemia.
Di recente è stata messa in commercio, non ancora in Italia, anche una Rt-PCR che include *primers* specifici per *P. knowlesi* e che consente lo screening per le cinque specie.
La LAMP ha una sensibilità analitica (LOD) da <1 a 2 parassiti/µL (a seconda delle specie e del protocollo diagnostico utilizzato) e permette la diagnosi di *Plamodium* spp.; include

primers specifici per *P. knowlesi* e consente quindi uno screening per le cinque specie che possono infettare l'uomo. I tempi di refertazione sono di circa 50-60 minuti.
Non commercializzato in Italia, esiste un test LAMP che consente anche la diagnosi di *P. falciparum.*
I test molecolari, sia la PCR sia la LAMP, rimangono tuttavia positivi per qualche settimana anche dopo una terapia che ha portato alla guarigione. Di conseguenza questi, come succede per gli RDTs, non sono utili per il monitoraggio del trattamento anti-malarico. L'unica tecnica diagnostica che permette il *follow up* della malattia è la microscopia.
In nessun caso le tecniche immunocromatografiche (RDTs) o le tecniche molecolari (PCR, Rt-PCR, LAMP) possono essere considerate alternative all'esame microscopico con goccia spessa e striscio sottile.

FOCUS

Le tecniche molecolari sono le tecniche diagnostiche più sensibili.

Non sono idonee per il monitoraggio della terapia.

Non sono alternative all'esame microscopico (striscio sottile e goccia spessa).

1.5.6 QUANTITATIVE BUFFY COAT (QBC)

Si utilizza un capillare di vetro contenente anticoagulante e arancio di acridina che rende fluorescenti i nuclei dei leucociti e dei parassiti malarici. Il sangue viene fatto penetrare per capillarità e contemporaneamente viene inserito un galleggiante di opportuno peso. Dopo centrifugazione si stratificano le varie cellule del sangue mentre il galleggiante si posiziona tra i leucociti e le emazie parassitate. Il tubo viene osservato al microscopio a fluorescenza e le emazie parassitate sono facilmente evidenziabili; i nuclei dei parassiti sono di colore verde, il citoplasma di colore rosso. La sensibilità del QBC è paragonabile o lievemente superiore a quella della goccia spessa, mentre la lettura risulta un po' più facile. Il QBC può sostituire la goccia spessa, ma non lo striscio sottile.

1.5.7 ALTRE TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE

Citofluorimetria

Numerosi analizzatori automatici per ematologia utilizzano la tecnologia della citometria a flusso in fluorescenza. Questi strumenti sono in grado di fornire dei citogrammi bidimensionali o tridimensionali che sono suggestivi per un'infezione da plasmodi.
La messa in evidenza di quadri sospetti deve essere sempre seguita dall'esecuzione, come conferma, di un esame microscopico con striscio sottile e goccia spessa esaminato da operatori esperti.
Con una parassitemia compresa tra 100 e 1.000 parassiti/µL la sensibilità per *P. vivax* è del 100%, per *P. falciparum* è del 58,3%; raggiunge il 100% con una carica parassitaria >1.000 parassiti/µL.
La specificità valutata su persone sicuramente senza malaria è del 100%, ma nei pazienti sottoposti a trattamento anti-malarico è solo del 57,9%. Questa bassa specificità non permette di utilizzare la citofluorimetria per il *follow-up* post trattamento.

Rilevazione dell'emozoina (TMeK)

Le forme asessuate intraeritrocitarie di *Plasmodium* spp. si nutrono principalmente di emoglobina degradandone la parte proteica e producendo come sottoprodotto eme libero, la parte prostetica dell'emoglobina. Essendo molto tossico l'eme deve essere neutralizzato dal parassita; quindi nel vacuolo digestivo del parassita stesso viene convertito in emozoina (il pigmento della malaria) che è essenzialmente un polimero dell'eme, ricco di ferro (Fe^{3+}) e

che presenta proprietà magnetiche. L'emozoina liberata nel circolo ematico dopo la rottura delle emazie è rapidamente eliminata dal fegato e dalla milza.
La tecnica diagnostica TMeK, che sembra molto promettente, si basa sulle proprietà magnetiche dell'emozoina contenuta nelle emazie parassitate.
Una piccola goccia di sangue (7 µL) viene raccolta su un vetrino e poi posta a contatto con un *microchip* in silicio che contiene alcuni concentratori magnetici ed elettrodi di dimensioni micrometriche. Le emazie infette contenenti emozoina vengono attratte sui concentratori magnetici, mentre le emazie sane e gli altri elementi corpuscolati (leucociti, piastrine ecc.) sedimentano. La rilevazione avviene mediante misura della variazione di impedenza elettrica in corrispondenza di ciascun concentratore. Questa tecnica permette anche il conteggio delle emazie parassitate e sembra utilizzabile anche per il *follow-up* post trattamento. Il test ha un tempo di esecuzione di 7 minuti.

I produttori dichiarano una sensibilità analitica (LOD) di 10 parassiti/µL, una sensibilità relativa del 100% e una specificità del 75% su sangue venoso e del 100% su sangue capillare.
È interessante rilevare che si tratta di una tecnologia sviluppata in Italia (Politecnico di Milano) da ricercatori italiani e che TMeK è stato brevettato al fine di proteggere la proprietà intellettuale dell'invenzione, ma adottando una strategia di sfruttamento senza fini di lucro attento alle esigenze sociali dei Paesi ove verrà utilizzato (brevetto sociale).
Una limitazione del test è rappresentata dal fatto che i *microchip* vanno conservati a -20° C – -50° C.
Trattandosi di un test pan-plasmodiale per poter definire la specie è comunque necessario eseguire un esame microscopico con striscio sottile e goccia spessa.

1.5.8 TECNICHE SIEROLOGICHE

I test sierologici servono per determinare una precedente esposizione a *Plasmodium* spp., non sono utili per diagnosticare una sospetta infezione da malaria.
Le tecniche più diffuse sono IFI (Immunofluorescenza indiretta) e ELISA (*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*).
In zone non endemiche per malaria l'uso prevalente dei test sierologici è lo screening dei donatori di sangue effettuato di norma con ELISA.
Recenti studi di confronto hanno evidenziato una scarsa concordanza nei risultati tra diversi kit ELISA in commercio, di conseguenza uno stesso donatore potrebbe essere escluso o meno dalla donazione di sangue a seconda del test utilizzato nel laboratorio del centro trasfusionale di afferenza (vedi oltre "Sicurezza del sangue e degli emocomponenti").

1.6 REFERTAZIONE

Il laboratorio deve riferire l'esito degli esami effettuati (microscopia, test rapidi ecc.) specificando:
1. la presenza o assenza del parassita malarico;
2. la specie identificata;
3. l'indice di parassitemia, indispensabile per *P. falciparum* e *P. knowlesi.*

L'identificazione di specie anche se in alcune condizioni è difficile (bassa parassitemia, interferenza sulla morfologia per profilassi o terapie non adeguate, infezioni miste) va sempre fatta.
Infatti nel caso di *P. falciparum*, ma anche di *P. knowlesi*, si può avere evoluzione dell'infezione in forme gravi o complicate.
Sono noti casi di pazienti che da discrete condizioni passano in poche ore ad uno stato di coma; l'unica cosa possibile per predire questa condizione è riferire l'indice di parassitemia

monitorandolo ogni 6-8 ore durante il primo giorno di terapia e quotidianamente fino alla scomparsa dei parassiti.
Nel caso di *P. vivax* e *P. ovale* la corretta identificazione di specie consente ai clinici di instaurare una terapia adeguata per prevenire le recidive dovute alla riattivazione degli ipnozoiti nel fegato.

1.7 CONTROLLO DI QUALITÀ

Controllo di qualità interno (CQI)

In parassitologia microscopica il CQI si basa sul controllo del processo. In sostanza non si controlla la rispondenza del prodotto (il risultato analitico) a requisiti predefiniti mediante un campionamento statistico, ma si sorvegliano le condizioni del processo in cui il risultato analitico viene prodotto, controllandone la rispondenza a requisiti prefissati e scelti in maniera tale da permettere di ottenere un prodotto di qualità adeguata.
Quando possibile è comunque molto utile inserire nelle serie analitiche dei controlli positivi e/o dei controlli negativi.
Per quanto riguarda la diagnostica microscopica della malaria le principali condizioni analitiche da tenere sotto controllo nella verifica del processo sono:

- verifica dei tempi di trasporto dei campioni;
- verifica dei tempi di allestimento dei campioni;
- manutenzione del microscopio;
- uso di vetrini puliti e perfettamente sgrassati;
- corretto spessore dei preparati (striscio sottile e goccia spessa);
- inpiego di acqua tamponata a pH 7,2.
- uso e conservazione dei coloranti (Giemsa):

Valutazione Esterna della Qualità (VEQ)

Secondo le norme vigenti sia a livello nazionale che in numerose regioni italiane la partecipazione a programmi di VEQ è obbligatoria.
In parassitologia, inoltre, la partecipazione ad uno o più programmi di VEQ è di fondamentale importanza anche per l'addestramento del personale. Infatti è solo attraverso campioni di VEQ che per molti laboratori, che eseguono un limitato numero di esami, è possibile osservare con frequenza regolare le diverse specie plasmodiali nonché altri parassiti ematici e del RSE.

1.8 SICUREZZA DEL SANGUE E DEGLI EMOCOMPONENTI

Con il Decreto Ministeriale del 2/11/2015 "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" è stato introdotto l'obbligo di un test sierologico, prima della donazione, per i soggetti a rischio di aver contratto l'infezione.
Il decreto infatti nell'allegato III specifica che:

1. soggetti che hanno vissuto per un periodo di 6 mesi o più (continuativi) in zona endemica in qualsiasi momento della loro vita (questi soggetti non possono donare fino a quando non venga effettuato uno specifico test immunologico, con esito negativo, in quanto a rischio di essere diventati portatori asintomatici del parassita malarico):

- devono essere sospesi dalle donazioni per almeno 6 mesi dall'ultimo soggiorno di qualsiasi durata in zona ad endemia malarica;
- possono essere accettati come donatori se risulta negativo un test immunologico per la ricerca di anticorpi anti malarici, eseguito almeno 6 mesi dopo l'ultima visita in area ad endemia malarica;

- se il test risulta ripetutamente reattivo, il donatore è sospeso per 3 anni; successivamente può essere rivalutato e accettato per la donazione se il test risulta negativo.

2. soggetti che hanno sofferto di malaria, soggetti che hanno sofferto di episodi febbrili non diagnosticati compatibili con la diagnosi di malaria, durante un soggiorno in area ad endemia malarica o nei 6 mesi successivi al rientro:

- devono essere sospesi dalle donazioni per almeno 6 mesi dalla cessazione dei sintomi e dalla sospensione della terapia;
- possono essere accettati come donatori se risulta negativo un test immunologico per la ricerca di anticorpi anti malarici, eseguito almeno 6 mesi dopo la cessazione dei sintomi e la sospensione della terapia;
- se il test risulta ripetutamente reattivo, il donatore è sospeso per 3 anni; successivamente può essere rivalutato e accettato per la donazione se il test risulta negativo.

3. Tutti gli altri soggetti che hanno visitato un'area ad endemia malarica e che non hanno sofferto di episodi febbrili o di altra sintomatologia compatibile con la diagnosi di malaria durante il soggiorno o nei 6 mesi successivi al rientro:

- possono essere accettati come donatori se sono passati almeno 6 mesi dall'ultima visita in un'area ad endemia malarica e se risultano negativi a un test immunologico per la ricerca di anticorpi anti malarici;
- se il test risulta ripetutamente reattivo il donatore è sospeso per 3 anni; successivamente può essere rivalutato e accettato per la donazione se il test risulta negativo;
- se il test non viene effettuato, il soggetto può donare se sono passati almeno 12 mesi dall'ultima visita in un'area ad endemia malarica.

1.9 SICUREZZA DEI TRAPIANTI

Il documento "Protocollo per la valutazione di idoneità del donatore di organi solidi" edito dal Centro Nazionale Trapianti nell'Allegato A fornisce la seguente raccomandazione: "Si raccomanda l'effettuazione della ricerca dei plasmodi malarici in donatori di etnia africana per i quali non sia possibile escludere un recente soggiorno nel Paese d'origine. In ogni caso l'etnia e la provenienza geografica del donatore deve essere sempre comunicata ai centri trapianto per consentire loro la messa in atto di indagini tese a diagnosticare precocemente eventuali problematiche che dovessero sviluppare i riceventi".

1.10 ALGORITMO DIAGNOSTICO

La diagnosi di malaria è una diagnosi di urgenza; devono perciò essere adottate tecniche che permettano una diagnosi accurata nel più breve tempo possibile.

In figura 8 viene proposto un algoritmo diagnostico suddiviso in due parti.

Nella parte destra è previsto l'utilizzo dell'emoscopia (striscio sottile e goccia spessa o QBC come alternativa alla goccia spessa) più l'utilizzo di un test rapido (RDT) per la ricerca degli antigeni dei plasmodi. Nella parte sinistra l'utilizzo di un test di biologia molecolare più l'emoscopia.

Gli attuali tempi di esecuzione della maggior parte delle PCR in commercio non sono compatibili con la diagnosi di urgenza, questa tecnica dovrebbe quindi essere utilizzata, oltre che per gli scopi già indicati, come tecnica per l'approfondimento diagnostico.

Nell'algoritmo si propone l'uso di un test rapido di biologia molecolare (BMR), ad esempio la LAMP, che fornisca il risultato al massimo in un'ora.

BMR più emoscopia

1. Eseguire il test rapido in biologia molecolare e contemporaneamente allestire lo striscio sottile e la goccia spessa. Colorare lo striscio sottile. La goccia spessa può essere colorata in un secondo tempo quando ben asciutta.
2. Se entrambi i test sono negativi refertare assenza di plasmodi. Se i sintomi persistono ripetere l'esame a distanza di 12 e 24 ore.
3. Se entrambi i test sono positivi procedere con l'identificazione di specie e la quantificazione della parassitemia, quindi refertare.
4. Se vi è discordanza nei risultati (biologia molecolare positiva e emoscopia negativa) si deve approfondirne la causa.

- Riesaminare accuratamente i vetrini. Con la goccia spessa potrebbero essere evidenziate basse parassitemie.
- Valutare le notizie cliniche, ad esempio paziente in trattamento o già trattato negli ultimi 15-30 giorni con antimalarici (la biologia molecolare, come gli RDTs, non è da utilizzare nel *follow-up*) oppure eventuali assunzioni di farmaci non antimalarici che possano mascherare la presenza di plasmodi nel sangue.
- Ripetere l'esame a distanza di 12 e 24 ore. Parassitemie non ancora microscopicamente rilevabili potrebbero aumentare dopo alcune ore.
- Se disponibile eseguire una Rt-PCR, se non disponibile inviare il campione a un centro di riferimento.

Il risultato discordante va comunque segnalato.

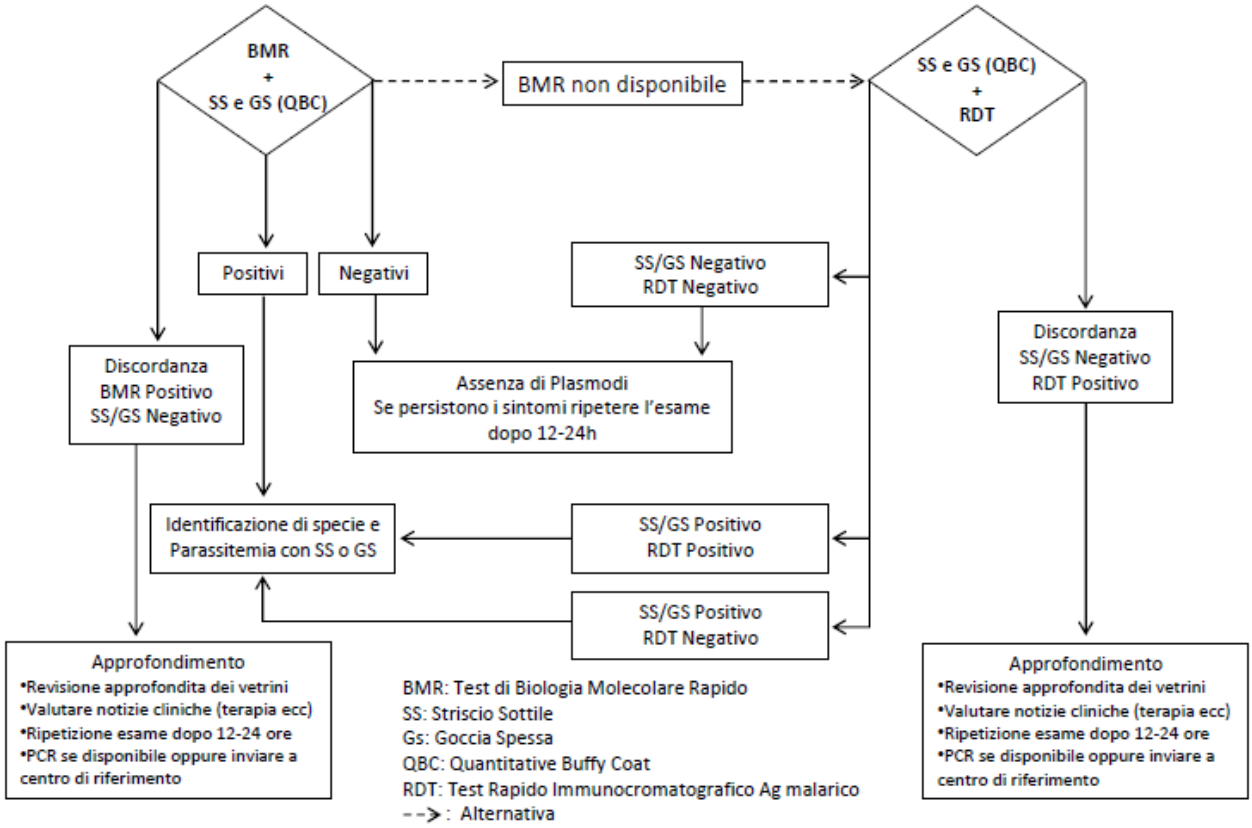
Emoscopia più RDT

1. Allestire lo striscio sottile e la goccia spessa. Eseguire il test rapido per la ricerca degli antigeni malarici e contemporaneamente colorare lo striscio sottile. La goccia spessa può essere colorata in un secondo tempo quando ben asciutta.
2. Se entrambi i test sono negativi refertare assenza di plasmodi. Se i sintomi persistono ripetere l'esame a distanza di 12 e 24 ore.

3. Se entrambi i test sono positivi procedere con l'identificazione di specie e la quantificazione della parassitemia, quindi refertare.
4. Se l'emoscopia è positiva e l'RDT è negativo procedere all'identificazione di specie e alla quantificazione della parassitemia, quindi refertare.
5. Se vi è discordanza nei risultati (emoscopia negativa e RDT positivo) si deve approfondirne la causa. Vedi punto 4 di "BMR più emoscopia".

Il risultato discordante va sempre segnalato.

Figura 8. Algoritmo diagnostico per la malaria



Da: SPILF. *Prise en charge et prévention du paludisme d'importation*. 2017 (modificata).

2. PARTE SECONDA: BABESIOSI

La babesiosi è una zoonosi causata da protozoi del genere *Babesia*, appartenenti allo stesso Phylum (Apicomplexa) e alla stessa Classe (Aconoidasida) dei Plasmodi, capaci di parassitare le emazie dei mammiferi.

2.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE

Il genere *Babesia* comprende almeno 60 specie riconosciute più circa 300 *Babesia* spp. ancora senza un nome di specie (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi) che infettano animali selvatici e domestici. Particolarmente importante dal punto di vista economico è l'infezione nei bovini, ma numerosi altri animali possono essere infettati e fungere da serbatoio (cavalli, cani, gatti, cervi, roditori).

Nell'uomo sono state riconosciute come principale causa di babesiosi quattro specie: *B. microti*, *B. divergens*, *B. duncani*, *B. venatorum*, ma sono segnalati anche rari casi causati da babesie geneticamente correlate come: *B. crassa* like, *B. microti* like, *B. divergens* like, *B. bovis.*

Viene trasmessa attraverso il morso di zecche tra le quali *Ixodes scapularis* negli USA, *I. ricinus* e *I. dammini* (sinonimo di *I. scapularis*) in Europa, *I. persulcatus* e *I. ovatus* in Asia. *I. scapularis* e *I. dammini* possono trasmettere anche la malattia di Lyme (causata da *Borrelia burdgorferi*).

Occasionalmente può essere trasmessa anche con trasfusioni di sangue e trapianti di organo e raramente per via placentare al neonato.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

La maggior parte dei casi al mondo si riscontra negli USA dove dal 2011 la babesiosi è malattia notificabile a livello nazionale. Sono segnalati circa 2.000 casi/anno principalmente da *B. microti*, nella parte orientale del Paese, e in misura molto minore (circa 20 casi) da *B. duncani* nella parte occidentale. Sono segnalati anche sporadici casi da *B. divergens* like.

In Europa la babesiosi umana è una malattia piuttosto rara; dopo il primo caso diagnosticato nel 1957 in ex Jugoslavia in un paziente splenectomizzato, a tutt'oggi sono stati segnalati circa 50 casi (Austria, Francia, Germania, Inghilterra, Irlanda, Italia, Norvegia, Polonia, Portogallo, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia), principalmente causati da *B. divergens* e, molto meno, da *B. bovis*. Sono segnalati anche sporadici casi da *B. microti* e *B. venatorum*.

In Asia (Corea del Sud, Giappone, Repubblica Popolare di Cina e Taiwan), le specie maggiormente coinvolte sono *B. venatorum* e *B. crassa* like.

Casi isolati di babesiosi umana sono stati riportati in Canada e Australia (*B. microti*), in Egitto, Mozambico, Sud Africa (*Babesia* spp.), in Messico, Cuba, Colombia e Brasile (*Babesia* spp.).

Infine un recente studio ha evidenziato una significativa presenza di anticorpi anti *B. microti* nella popolazione di un distretto della Tanzania.

In figura 9 viene illustrata la distribuzione mondiale della babesiosi.

2.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI E CLINICI

Le manifestazioni cliniche della babesiosi possono variare da forme asintomatiche a forme fulminanti con conseguente decesso a seconda della specie coinvolta e dello stato immunitario del paziente.

Nel paziente immunocompetente, nei casi sintomatici da *B. microti*, dopo un periodo di incubazione di 1-6 settimane dalla puntura della zecca si instaura un graduale stato di malessere e affaticamento e quindi una combinazione di sintomi aggiuntivi, i più comuni dei quali sono febbre intermittente alta fino a 40° C, brividi, sudorazione, anoressia, mal di testa e mialgia.

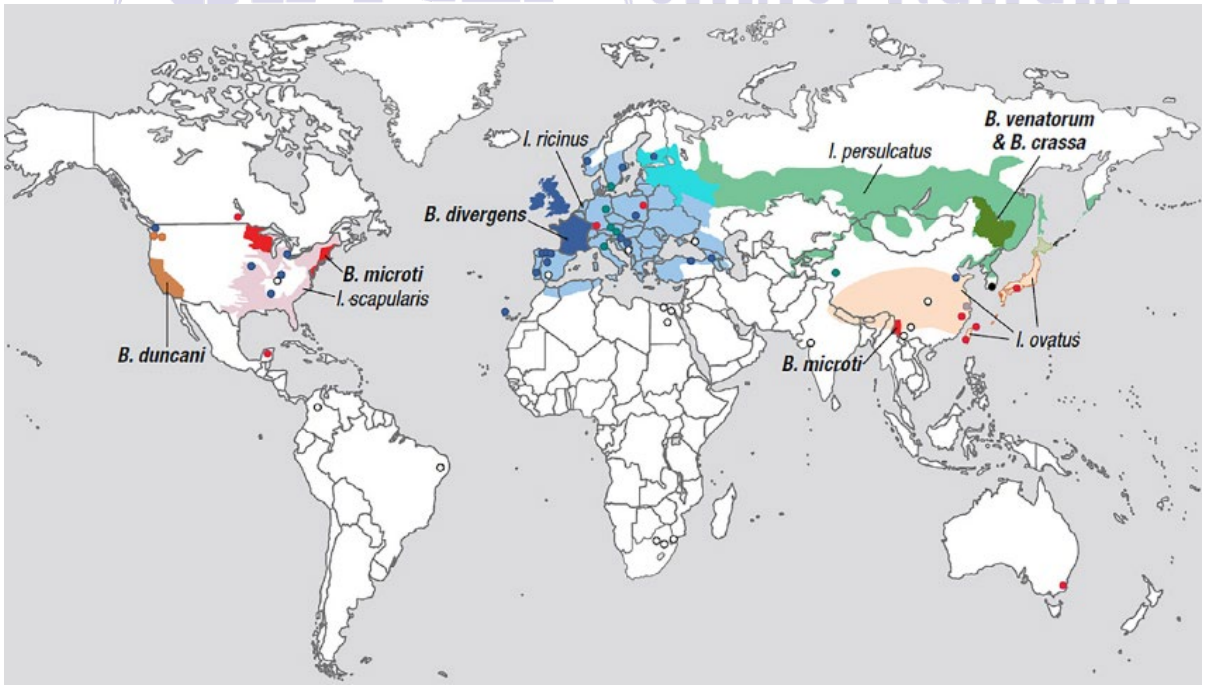
Può essere presente splenomegalia e epatomegalia da lievi a moderate e gli esami ematologici evidenziano un'anemia emolitica da lieve a moderata, trombocitopenia, reticolocitosi e enzimi epatici elevati.

Quadri simili sembrano dare le infezioni da *B. duncani* negli USA e da *B. venatorum* in Europa.

La babesiosi grave più di frequente si manifesta nei pazienti immunocompromessi, in particolare quelli con età avanzata, prematurità neonatale, HIV/AIDS, tumori maligni, terapia immunosoppressiva o splenectomizzati.

In Europa, ove *B. divergens* è la forma più diffusa, la letalità può essere molto elevata (42%).

Figura 9. Distribuzione mondiale della babesiosi umana



Da: Krause PJ. *Human babesiosis*. 2019

2.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE

Appare fondamentale la conoscenza della storia del paziente: viaggi effettuati, esposizione in aree di endemia o infestate da zecche, trasfusioni recenti, splenectomia, stato immunologico.

2.4.1 TECNICHE DIRETTE

La tecnica diagnostica di elezione è l'esame dello striscio sottile anche se è comunque consigliabile eseguire pure una goccia spessa.

Striscio sottile: vedi TECNICHE DIAGNOSTICHE della malaria.

Goccia spessa: vedi TECNICHE DIAGNOSTICHE della malaria.

Colorazione: vedi TECNICHE DIAGNOSTICHE della malaria.

Osservazione microscopica: vedi TECNICHE DIAGNOSTICHE della malaria.

Calcolo della parassitemia in relazione alle emazie: vedi TECNICHE DIAGNOSTICHE della malaria.

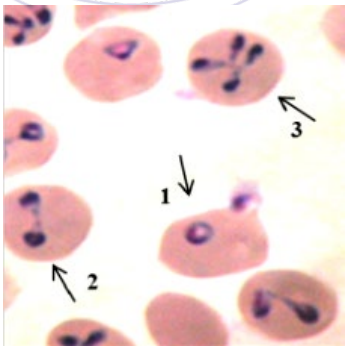
2.4.2 IDENTIFICAZIONE

Negli strisci sottili i trofozoiti sono all'interno delle emazie e possono apparire a forma di anello, di anello allungato, a racchetta, piriformi (da cui il nome di piroplasmi). Il citoplasma è vacuolato ed i parassiti possono avere una, due o quattro masse cromatiniche. Spesso sono presenti più trofozoiti nella stessa emazia in quanto si duplicano per gemmazione (forme a "8"), alcuni trofozoiti sono disposti a coppie formanti un angolo acuto. Gli stadi maturi hanno la forma a tetrade con la cromatina compatta e sono disposti a formare come una "Croce di Malta".

È possibile anche trovare babesie in posizione extra eritrocitaria, spesso tra loro raggruppate.

La parassitemia è in genere elevata e varia a seconda della specie e dello stato immunitario del paziente; nei pazienti splenectomizzati infettati da *B. divergens* può raggiungere l'80%.

Figura 10. Trofozoiti di *Babesia* spp.



1) **Forma ad anello**
2) **Forma a "8"**
3) **Forma a "Croce di Malta"**

Da: Ord RL *et al. Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis, and Treatment*. 2015

Diagnosi differenziale con la malaria

Le forme ad anello delle babesie possono essere confuse con i trofozoiti ad anello di *P. falciparum*; tuttavia la presenza di anelli pleomorfi (a goccia, allungati, a pera), le dimensioni (i trofozoiti di *Babesia* spp. sono più piccoli di quelli di *P. falciparum*), la disposizione (spesso a coppie e/o a tetradi: "Croce di Malta") e l'assenza di altre forme del parassita (schizonti, gametociti) consentono di formulare una diagnosi. Le emazie parassitate non sono ingrandite, non hanno pigmento, non presentano granulazioni e molto spesso sono poliparassitate.

Diagnosi molecolare

La Real time PCR ha una sensibilità analitica (LOD) compresa tra 0,1 e 10 parassiti/µL e permette anche la speciazione. Dato l'estrema rarità della babesiosi in Europa la PCR è da ritenersi esame ad esclusivo appannaggio di Centri di Riferimento. L'approccio molecolare, specie con il sequenziamento, ha consentito di individuare nuove varianti e/o specie di *Babesia* in infezioni sia negli USA che in Europa.

In medicina veterinaria sono state messe a punto tecniche LAMP che hanno dimostrato buone sensibilità e specificità.

2.4.3 TECNICHE SIEROLOGICHE

Sono stati sviluppati numerosi test sierologici (ELISA, Immunoblot) sia per la medicina veterinaria sia per quella umana, ma tuttora il test di riferimento rimane l'Immunofluorescenza indiretta (IFA) con *B. microti* come antigene e che ha una sensibilità del 88-96% e una specificità del 90-100%.

Un singolo test IgG positivo per *Babesia* non è in grado di distinguere l'infezione attiva da quella passata, sebbene un titolo anticorpale ≥1:1024 o la presenza di IgM con titolo ≥1:64 sia significativo per un'infezione in atto.

Un incremento di quattro volte del titolo anticorpale nei sieri acuti e convalescenti conferma l'infezione da *Babesia*.

La cross-reattività con altre specie di *Babesia* è variabile, per cui in Europa (*B. divergens*), ma anche nell'ovest degli USA (*B. duncani*), sono possibili risultati falsi negativi.

Negli USA, negli Stati in cui è presente babesiosi, la sierologia è utilizzata per lo screening dei donatori di sangue.

2.5 REFERTAZIONE

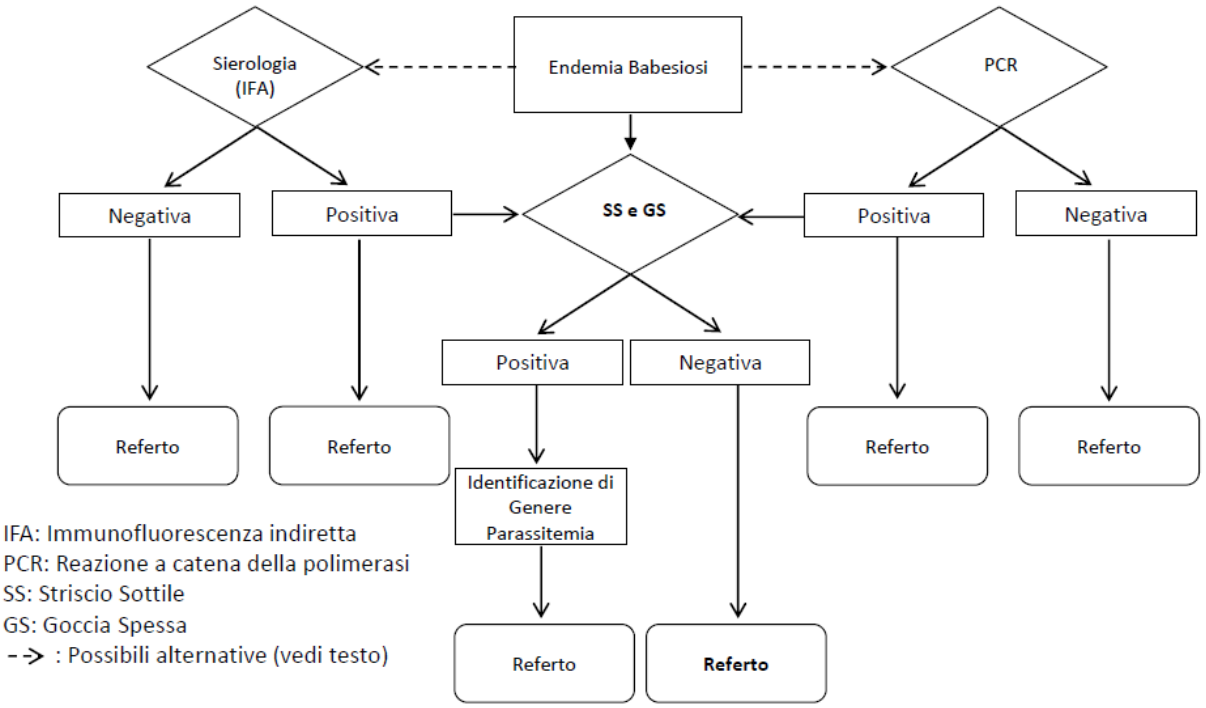
Il laboratorio deve riferire l'esito dell'esame microscopico specificando:

1. la presenza o assenza di *Babesia* species;
2. l'indice di parassitemia.

2.6 ALGORITMO DIAGNOSTICO

1. Eseguire striscio sottile e goccia spessa.
2. Se negativi refertare.
3. Se positivi procedere con l'identificazione di genere e con la quantificazione della parassitemia, quindi refertare.
4. In alternativa, se disponibile, come primo passo eseguire un test sierologico (o una PCR).
5. Se la sierologia (o PCR) è negativa refertare.
6. Se la sierologia (o PCR) è positiva eseguire striscio sottile e goccia spessa.
7. Se positivi procedere con l'iden\tificazione di genere e la quantificazione della parassitemia, quindi refertare.

Figura 11. Algoritmo diagnostico per la babesiosi



3. PARTE TERZA: LEISHMANIOSI

Le leishmanie sono parassiti che presentano due stadi morfologici: la forma amastigote, endocellulare, aflagellata che vive e si moltiplica dentro il fagolisosoma delle cellule del sistema macrofagico dell'ospite mammifero e la forma promastigote libera e flagellata che vive nell'intestino dell'insetto vettore.

Le leishmanie vengono classificate in due principali sottogeneri: sottogenere *Leishmania* e sottogenere *Viannia*. Il sottogenere *Leishmania* comprende specie presenti nel Vecchio e Nuovo Mondo: complesso *L. donovani*, complesso *L. tropica*, complesso *L. major*, per citarne alcuni.

Il sottogenere *Viannia* comprende specie presenti solo nel Nuovo Mondo: complesso *L. braziliensis* e complesso *L. guyanensis*.

3.1 EPIDEMIOLOGIA

Nord e Sud America, Africa, Asia ed Europa sono i continenti in cui è presente la leishmaniosi con endemicità nelle zone tropicali, subtropicali e temperate di circa 100 Paesi. La distribuzione geografica delle leishmaniosi è in relazione alla specie dell'insetto vettore. I vettori delle leishmanie sono flebotomi del genere *Phlebotomus* nel Vecchio Mondo e *Lutzomya* nel Nuovo Mondo (solo le femmine sono ematofaghe e ospitano i promastigoti), mentre gli ospiti serbatoio sono oltre l'uomo anche mammiferi domestici e/o selvatici.

Raggruppando il parassita, la patologia ad esso correlata, i serbatoi, i vettori e la distribuzione geografica distinguiamo queste cosiddette entità nosogeografiche principali:

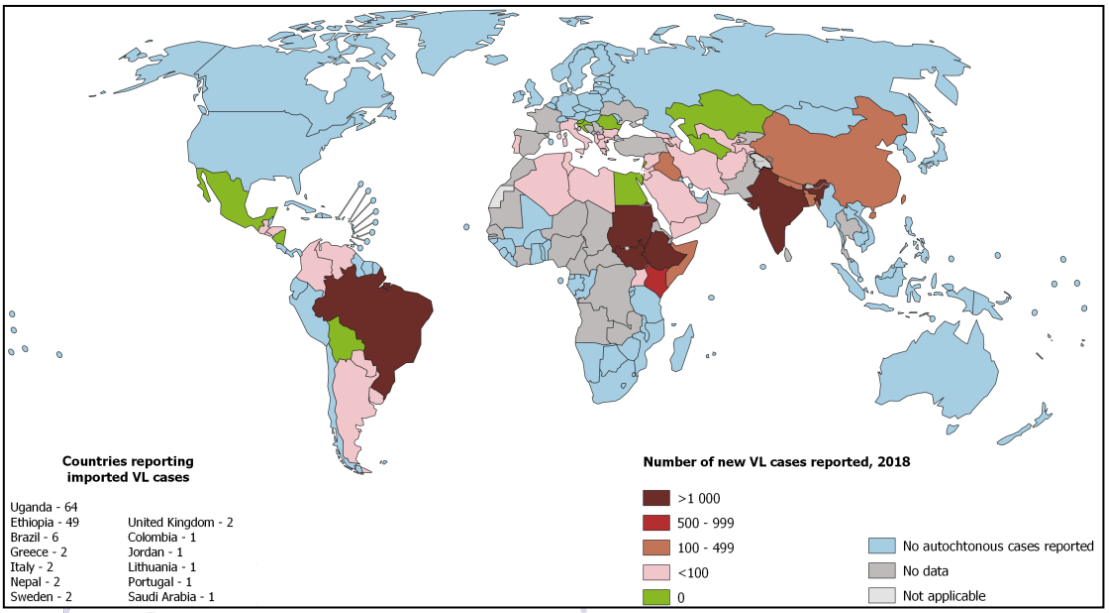
1. leishmaniosi viscerale antroponotica causata dalla specie *L. donovani* e concentrata in India, Bangladesh, Nepal e Africa Orientale, è trasmessa mediante il vettore da uomo a uomo e non ha serbatoi animali;
2. leishmaniosi viscerale zoonotica distribuita in numerose regioni del mondo tra cui tutti i Paesi che affacciano sul Mediterraneo. In Italia le regioni più colpite sono Sicilia, Campania e Lazio, tuttavia negli ultimi 20 anni la leishmaniosi umana ha visto un'estensione verso settentrione, includendo Liguria, Emilia-Romagna, Lombardia, Piemonte e Trentino. La leishmaniosi viscerale zoonotica è inoltre endemica in Medio Oriente (Giordania, Siria, Iran, Iraq, Arabia Saudita, Yemen), Asia Centrale, Pakistan, Cina, Nord America e America Latina. La specie in causa è *L. infantum*, e i serbatoi sono rappresentati dal cane domestico, dalle volpi e dagli sciacalli. In America Latina è presente *L. chagasi* che in base a studi genetici è risultata essere identica a *L. infantum*. *L. chagasi* e *L. infantum* sono quindi sinonimi.

   L. infantum è responsabile anche di una forma cutanea e di una forma mucosa; si tratta di forme endemiche lungo le coste mediterranee (anche in Italia) e probabilmente diffuse in tutte le regioni in cui è presente questa specie di *Leishmania*;
3. leishmaniosi cutanea antroponotica causata da *L. tropica* e distribuita in Turchia, India, Siria, Giordania, Libano, Yemen, Iran, Iraq, Afghanistan, Pakistan, Nord Africa e isole greche.
4. leishmaniosi cutanea zoonotica diffusa in tutta l'Africa del Nord e in Medio Oriente, è causata da *L. major* ed ha come serbatoio il ratto delle sabbie (*Meriones shawi*), mentre il vettore è *Phlebotomus papatasi*;
5. leishmaniosi cutanea e muco-cutanea del Nuovo Mondo. Si tratta di forme zoonotiche diffuse in Centro e Sud America, causate da diverse specie (*L. guyanensis, L. panamensis,*

L. braziliensis, L. amazonensis, L. mexicana) i cui serbatoi sono vari tipi di animali (bradipi, formichieri, procioni, scimmie, opossum, roditori selvatici).

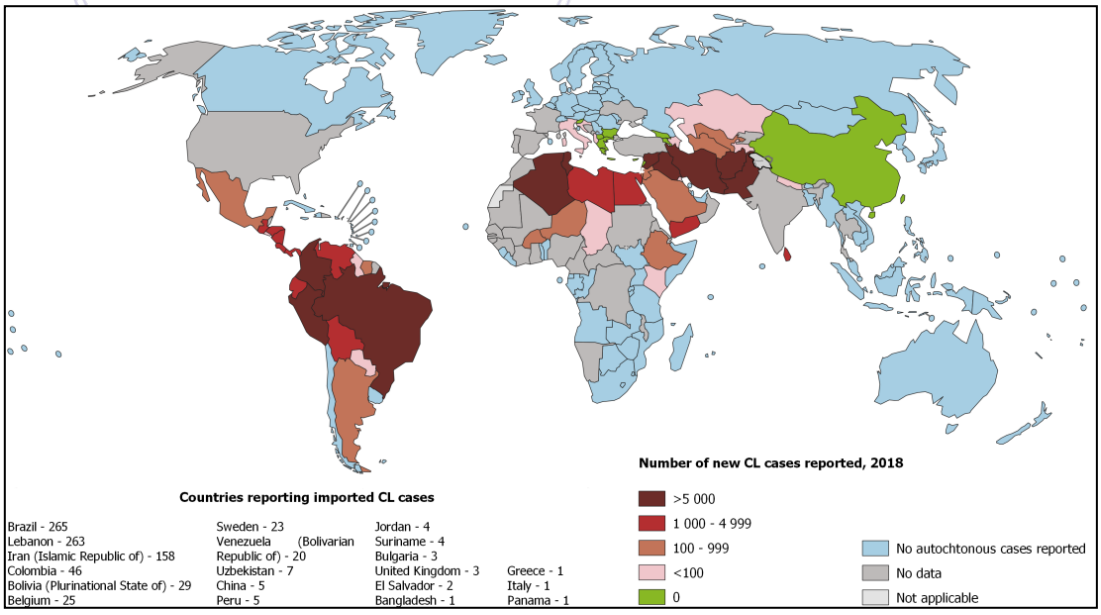
In figura 12 è riportata la situazione, a livello mondiale, dell'endemia della leishmaniosi viscerale; in figura 13 quella dell'endemia della leishmaniosi cutanea.

Figura 12. Paesi endemici per leishmaniosi viscerale (2018)



Da: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/

Figura 13. Paesi endemici per leishmaniosi cutanea (2018)



Da: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/

3.2 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI

La leishmaniosi comprende molte sindromi cliniche che possono essere distinte in tre forme: forma cutanea, forma muco-cutanea o forma mucosa e forma viscerale che sono la risultante dell'infezione dei macrofagi nel derma, nella mucosa naso-faringea e del sistema reticolo endoteliale, rispettivamente. In tutte queste forme l'infezione può essere asintomatica o dare origine a manifestazioni cliniche evidenti. La leishmaniosi viscerale ha un lungo periodo d'incubazione (mediamente 2-8 mesi), i segni e sintomi principali includono febbre persistente, splenomegalia, calo ponderale, pancitopenia. La leishmaniosi viscerale se non trattata è sempre letale.

Per una descrizione dettagliata dei vari quadri clinici si consiglia la consultazione di testi specifici.

3.3 TECNICHE DIAGNOSTICHE

3.3.1 LEISHMANIOSI VISCERALE

La definizione di caso di leishmaniosi viscerale (LV) redatta dall'OMS indica: "un paziente che presenta sintomi clinici, con esame parassitologico positivo, microscopia, coltura o reazione a catena della polimerasi (PCR) e/o sierologia positiva".

La diagnosi di LV viene fatta combinando informazioni anamnestiche con manifestazioni cliniche e diagnosi di laboratorio. Poiché attualmente non esiste un singolo test *gold standard* per la diagnosi

di LV, si raccomanda l'uso di più test diagnostici per aumentare la probabilità di una diagnosi corretta.

3.3.2 TECNICHE SIEROLOGICHE

I metodi sierologici prevedono la ricerca di IgG (o Ig totali) specifiche per *Leishmania* su siero. Vengono di sotto elencate le principali tecniche sierologiche utilizzate per la diagnosi di leishmaniosi viscerale.

- Test diagnostici rapidi immunocromatografici (*Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) che ricercano principalmente anticorpi diretti verso l'antigene ricombinante rK39. Tre meta analisi indicano una sensibilità combinata pari al 93,9% (*range* 87,7-97,1) e una specificità combinata del 90,6% (*range* 66,8-97,9) la prima; una sensibilità combinata pari al 92% (*range* 91,49-92,92) e una specificità combinata del 95% (*range* 94,30-95,48) la seconda; una sensibilità combinata pari al 91,9% (*range* 84,8-96,5) e una specificità combinata del 92,4% (r*ange* 85,6-96,8) la terza. La sensibilità e la specificità variano a seconda delle aree geografiche, ad esempio sono più basse (85,3%) in Africa Orientale (Sudan, Etiopia, Kenya, Uganda). Inoltre, recenti dati (2018) ottenuti in Europa Meridionale (Spagna) indicano, nel paziente HIV negativo, una sensibilità dell'83,1%, una specificità del 100%, un valore predittivo positivo (PPV) del 100% e un valore predittivo negativo (NPV) del 93,6%. Piu bassi sono i valori nei pazienti HIV positivi con l'eccezione del NPV che è del 100%.

Dato l'elevato PPV, l'OMS raccomanda l'RDT per rK39 come test di screening per la diagnosi di leishmaniosi, in particolare nella Regione Europea (EURO).

- Immunofluorescenza indiretta (IFA). Il test IFI offre la possibilità di osservare una titolazione anticorpale utile per monitorare il successo della terapia e evidenziare eventuali recidive. Presenta alcuni svantaggi: può risultare positiva in soggetti con infezione asintomatica, ma a bassi titoli, o all'opposto falsamente negativa, principalmente in soggetti immunodepressi, specie in caso di infezione da HIV (20-60% dei casi). IFI ha mostrato una

sensibilità del 87-100% e una specificità del 77-100%. Sono segnalate reattività crociate in pazienti con tubercolosi, toxoplasmosi, malaria, tripanosomiasi, febbre tifoide, brucellosi.

- ELISA (*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*).

I test ELISA, così come IFI, sono test quantitativi che nei pazienti immunocompetenti mostrano elevata specificità e una sensibilità variabile a seconda degli antigeni utilizzati: più elevata con antigeni crudi (80-100%) e ricombinanti K39 (75-98%), molto più bassa (37%) con alcune molecole antigeniche (molecole di 116 kDa, 72 kDa, 66 kDA) ricombinanti. Con l'utilizzo di antigeni crudi sono state segnalate cross reazioni con toxoplasmosi, tubercolosi e tripanosomiasi. Bisogna inoltre ricordare che, nonostante vari studi riportino un'accuratezza diagnostica di test sierologici molto elevata (sensibilità e specificità vicine al 100%), è difficile comparare tali risultati e riportarli alle diverse realtà dei singoli laboratori, anche considerando la variabilità delle specie e ceppi circolanti nelle diverse aree geografiche.

La titolazione degli anticorpi è utile sia per la diagnosi iniziale (vedi oltre: Algoritmo diagnostico), sia per il *follow-up* del paziente, poiché il trattamento efficace è seguito da un costante declino dei titoli per un lungo periodo.

- Immunoblotting (IB). È una tecnica molto sensibile (90-98%) e specifica (88-100%). Per l'alta specificità potrebbe essere utile per lo screening sierologico specialmente in caso di discrepanza tra il test rK39 e un test ELISA.

La tabella 2 riporta le sensibilità e specificità delle tecniche sierologiche comunemente utilizzate per la diagnosi di leishmaniosi.

Tabella 2. Sensibilità e specificità tecniche sierologiche comunemente utilizzate per la diagnosi di leishmaniosi

Metodo	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Note
IFI	87–100*	77–100	Positivo nelle prime fasi dell'infezione e non rilevabile da sei a nove mesi dopo la cura.
ELISA	Vedi testo	Vedi testo	La sensibilità e la specificità sono fortemente influenzate dall'antigene utilizzato.
IB	90–98 *	88–100	Fornisce risposte anticorpali dettagliate a vari antigeni.
ICT K39	83–94*	91-95	Rapido, poco costoso e facilmente eseguibile.

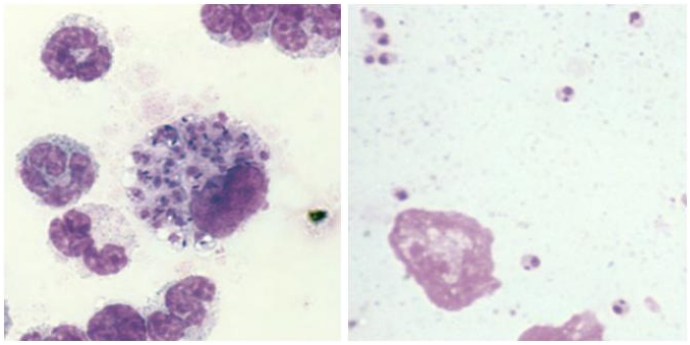
* La sensibilità è ridotta in pazienti immunocompromessi

3.3.3 TECNICHE DIRETTE

a) Esame microscopico diretto. Il campione migliore per la diagnosi microscopica diretta è l'aspirato splenico che ha una sensibilità del 93-99%, ma di norma l'esame viene eseguito da aspirato midollare che presenta una sensibilità del 53-86%.

Apposizioni o strisci di frustoli di midollo osseo deposti su vetrino vengono colorati con Giemsa ed osservati al microscopio. Gli amastigoti sono dei corpuscoli sferici o ovoidali, lunghi 1-5 □m e larghi 1-2 □m. Il citoplasma è azzurro grigio, il nucleo è rotondo, rosso porpora, spesso eccentrico, il chinetoplasto è puntiforme o bastoncellare, rosso porpora. Le leishmanie si trovano nel citoplasma dei monociti-macrofagi, il loro numero può variare da uno a una dozzina, spesso si possono trovare amastigoti al di fuori dei macrofagi per la rottura delle cellule (figura 14).

Figura 14 .Amastigoti di *Leishmania* spp. in un monocita a sinistra e liberi a destra



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

La diagnosi differenziale è da porre con *Histoplasma capsulatum*. Le cellule di questo fungo infatti possono essere confuse con amastigoti di *Leishmania* o di *Trypanosoma cruzi*. La differenza fondamentale risiede nell'assenza del chinetoplasto in *H. capsulatum*, che invece deve essere sempre osservato per diagnosticare gli amastigoti di *Leishmania*.

La carica parassitaria può essere quantificata su una scala da 0 (assenza di parassiti in 1.000 campi microscopici) a 6+ (oltre 100 parassiti per campo microscopico) osservando il preparato in immersione a 1.000x (Tabella 3).

Tabella 3. Quantificazione della carica parassitaria di *Leishmania*

6+	Oltre 100 amastigoti per campo
5+	10-100 amastigoti per campo
4+	1-10 amastigoti per campo
3+	1-0 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

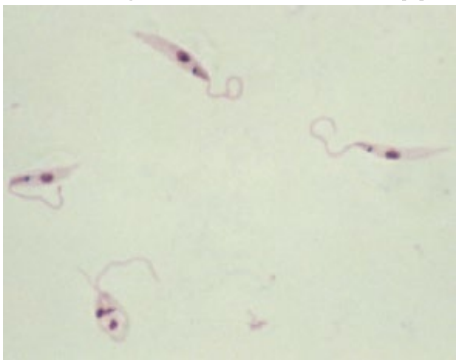
Da Gradoni L *et al*. *Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European region*. WHO, 2017 (tradotta)

Una quantificazione accurata della carica parassitaria aumenta la sensibilità del rilevamento dei parassiti, fornisce una misura obiettiva della velocità di risposta al trattamento e distingue rapidamente i *responder* lenti e i non *responder* alla terapia.

b) Esame colturale. L'aspirato splenico o il midollo osseo o alcune gocce di *buffy coat* da sangue periferico vengono inoculate in provette di idoneo terreno colturale (Novy-McNeal-Nicolle) o altri terreni simili a base di agar sangue. I terreni non sono disponibili in commercio, ma devono essere preparati in laboratorio necessitando di sangue fresco di coniglio. La coltura richiede tempi lunghi (da 1 a 4 settimane) e deve essere controllata settimanalmente per verificare l'eventuale presenza di promastigoti (figura 15). La sensibilità è di circa il 60-85%, ma dipende strettamente dalla carica parassitaria del campione insemenzato. L'isolamento del ceppo di *Leishmania* è utile, oltre che per la diagnosi di malattia, anche per la tipizzazione isoenzimatica o molecolare del ceppo isolato, sia per fini epidemiologici, sia per valutare le eventuali sequele e/o manifestazioni secondarie della malattia determinate da alcune specie, nonché per la scelta del trattamento.

c) Tecniche molecolari (PCR). Negli ultimi decenni sono stati sviluppati metodi basati sulla PCR per il rilevamento di *Leishmania* e l'identificazione delle specie. Tuttavia, nonostante i

Figura 15. Promastigoti di *Leishmania* spp. da coltura



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

numerosi saggi descritti, finora non vi è consenso sui metodi e *target* molecolari, né esistono linee guida internazionali.

Sono stati descritti numerosi *target* per saggi PCR convenzionali e in *Real time* (Rt-PCR). Il DNA del chinetoplasto (kDNA) e quello codificante le proteine ribosomiali della subunità minore (SSUrDNA), sono i più comunemente utilizzati per la diagnosi di *Leishmania* a livello di genere, data la loro natura altamente conservata e l'alto numero di copie nel genoma del parassita. Per la diagnosi di LV, l'aspirato di midollo osseo è considerato il campione elettivo, tuttavia Rt-PCR che utilizzano i *target* sopramenzionati mostrano risultati paragonabili anche su sangue periferico intero. Il *buffy coat* del sangue periferico è consigliato nei pazienti immunodepressi. Oltre che per la diagnosi, la PCR quantitativa su sangue periferico (Rt-PCR), può essere utile nei pazienti immunodepressi (specie in caso di infezione da HIV) per il monitoraggio della parassitemia in corso di terapia.

I test diretti (esame microscopico, esame colturale, PCR) dovrebbero essere appannaggio di centri specializzati o di centri di riferimento.

I laboratori periferici, che di norma non hanno una sufficiente esperienza in materia di diagnosi di *Leishmania*, dovrebbero limitarsi ad effettuare lo screening con i test sierologici (RDT rK39, ELISA, IFI ed eventualmente IB).

3.3.4 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La diagnosi differenziale di LV comprende principalmente ma non esclusivamente: febbre tifoide, malaria, tubercolosi disseminata, brucellosi, istoplasmosi, schistosomiasi epatosplenica, splenomegalia malarica iperreattiva, malattia da graffio di gatto, endocardite batterica subacuta, linfoma, malattie mieloproliferative, sindrome emofagocitica ed altre malattie autoimmuni (quali Lupus eritematosus, anemia emolitica, epatite autoimmune), malattia di Castleman o cirrosi con ipertensione portale. La leishmaniosi linfonodale può simulare la malattia da graffio di gatto, il linfoma, la toxoplasmosi, la mononucleosi o la tubercolosi linfonodale.

FOCUS

L'esame microscopico, l'esame colturale, la PCR dovrebbero essere appannaggio dei centri specializzati/riferimento.

I laboratori con minor esperienza dovrebbero limitarsi a eseguire i test sierologici (RDT rK39, ELISA, IFI ed eventualmente IB).

3.3.5 LEISHMANIOSI DEI TEGUMENTI

Si definisce come leishmaniosi cutanea, mucosa o muco-cutanea il caso di un paziente con sintomi clinici (lesione cutanea o muco-cutanea) e con una conferma diagnostica da esame parassitologico positivo (e solo per leishmaniosi muco-cutanea da esame sierologico positivo).

1) La diagnosi di **leishmaniosi cutanea** si effettua mediante:

   a) esame microscopico su biopsia cutanea dopo colorazione Giemsa (sensibilità: 40-80%). Il prelievo deve essere eseguito al bordo lesione dove è possibile trovare gli amastigoti di *Leishmania* spp. e non al centro della lesione dove solitamente si accumula materiale necrotico.

   b) PCR su biopsia cutanea (sensibilità >90%); anche test molecolari su *scraping* della lesione hanno dimostrato alta sensibilità.

   La diagnosi sierologica (ELISA, IFI) non è utile in caso di sospetta leishmaniosi cutanea causa l'elevato numero di falsi negativi. Maggiore sensibilità ha mostrato l'IB.

2) La diagnosi di **leishmaniosi muco-cutanea** o **mucosa** si effettua mediante:

   a) esame microscopico su biopsia dopo colorazione con Giemsa (sensibilità: 30-60%);

   b) PCR su biopsia cutanea (sensibilità: 70-100%);

   c) test sierologici. Per le forme muco-cutanee, gli ELISA con antigene solubile mostrano una sensibilità di circa l'80%; maggiore è la sensibilità dei test che utilizzano antigeni ricombinanti (95-100%). Particolarmente utile è risultato anche l'IB.

3.4 ALGORITMO DIAGNOSTICO

La diagnosi di leishmaniosi viscerale, in pazienti immunocompetenti con clinica compatibile con un quadro di leishmaniosi viscerale, viene eseguita in prima istanza con la messa in evidenza degli anticorpi specifici con metodi sierologici (figura 16).

1) Come test di screening l'OMS raccomanda un test RDT rK39 che in Europa ha un alto valore predittivo positivo. In caso di risultato positivo a tale test e in presenza di elevato livello anticorpale rilevato con un secondo test quantitativo (ELISA o IFI) la leishmaniosi viscerale è altamente probabile e l'OMS raccomanda, qualora possibile, una conferma parassitologica prima di iniziare un trattamento anti-*Leishmania*. Tale conferma può essere eseguita mediante un test diretto quale la PCR, da eseguire su aspirato midollare, sangue periferico intero o *buffy coat* del sangue periferico (quest'ultimo da preferire negli immunodepressi) o tramite l'osservazione microscopica e/o la coltura dell'aspirato midollare.

Se non sono disponibili test diretti e non è possibile inviare i campioni a un centro di riferimento, considerare l'avvio di un trattamento anti-*Leishmania*.

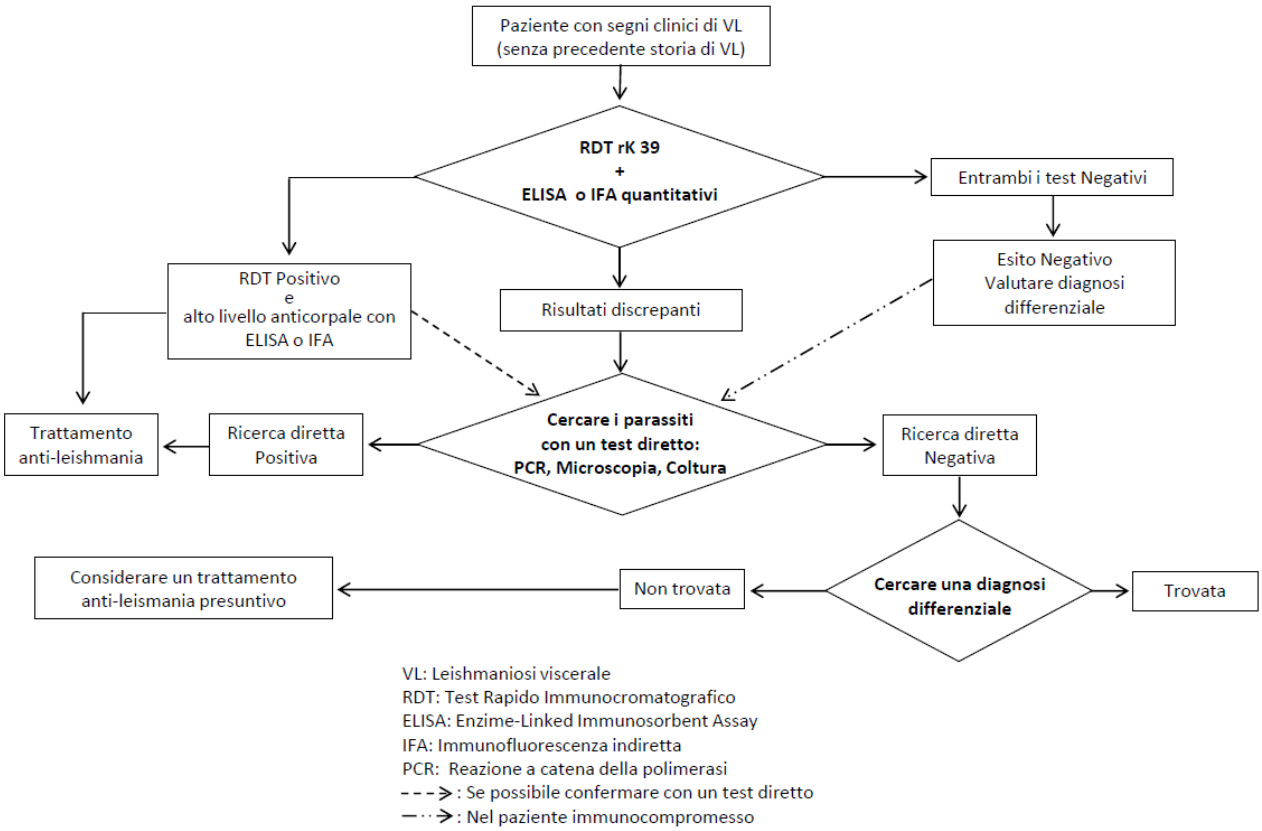
2) In caso di risultati discordanti (es. RDT negativo e ELISA o IFI positivo) è necessario eseguire un test diretto per confermare la diagnosi di leishmaniosi viscerale. Se confermata iniziare il trattamento anti-*Leishmania*.

3) In caso di pazienti immunocompetenti con risultati di screening sierologici negativi, la probabilità di LV è molto bassa (valore predittivo negativo molto alto). È quindi necessario prendere in considerazione una diagnosi differenziale.

4) In caso di pazienti immunocompromessi con risultati di screening sierologici negativi, causa la diminuita sensibilità di ELISA e IFI bisogna considerare di procedere comunque con test diretti.

5) Nel caso di risultati negativi ai test diretti nel paziente immunocompetente, va cercata una diagnosi differenziale. Se non trovata e persiste il forte sospetto di LV prendere in considerazione la possibilità di intraprendere un trattamento anti-*Leishmania* presuntivo.

Figura 16. Algoritmo diagnostico per la leishmaniosi viscerale



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

Ente del Terzo Settore

4. PARTE QUARTA: TRIPANOSOMIASI AFRICANA

4.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE

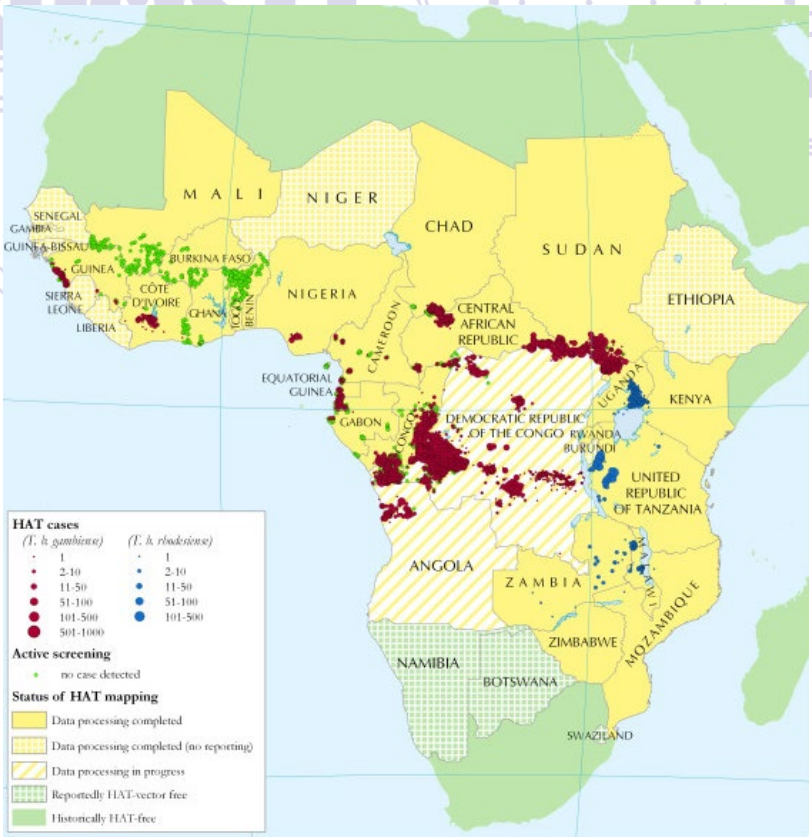
Ci sono due sottospecie di *Trypanosoma brucei* che causano malattia nell'uomo: *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*. Questi protozoi emoflagellati sono tra di loro morfologicamente indistinguibili, hanno cicli vitali simili, ma differiscono per distribuzione geografica (la demarcazione geografica netta tra le zone di endemia delle due sottospecie corrisponde ad un prolungamento ideale della valle del Rift), per specie di vettore e patogenicità. Sono trasmessi all'uomo attraverso la puntura di mosche infette del genere *Glossina* (mosca tsè tsè).

Maschio e femmina delle Glossine compiono il pasto ematico e possono trasmettere l'infezione, anche se in aree endemiche solo una piccola percentuale (1%) di mosche tsè tsè è infetta da tripanosomi umani. Raramente sono descritti casi di trasmissione tramite emotrasfusione, per via transplacentare e per contatto sessuale.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

Le zone geografiche di distribuzione della tripanosomiasi umana sono comprese nell'Africa subsahariana.

Figura 17. Distribuzione della tripanosomiasi umana africana (HAT)



Da Simarro PP *et al. The Atlas of human African trypanosomiasis*. Int. J. Health Geogr. 2010

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 (da sola concorre per il 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. I soggetti a rischio sono gli abitanti delle zone rurali, lavoratori delle piantagioni di caffè, pescatori.

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 e Zambia. Il serbatoio animale è rappresentato da animali selvatici, bovini e altri animali da allevamento (zoonosi) ed è trasmesso dalle *Glossine* 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, raccoglitori di miele, ma anche turisti che visitano i parchi nazionali dei Paesi endemici.

Attualmente la popolazione a rischio per le due sottospecie è stimata in circa 65 milioni di persone.

Dopo le epidemie degli anni 70 e 90 dello scorso secolo, gli interventi dell'OMS, i Programmi Nazionali per il Controllo della Malattia del Sonno (NSSCPs: *National Sleeping Sickness Control Programmes*) e gli interventi di Organizzazioni Non Governative (ONG) hanno portato a una forte riduzione dell'infezione. Nel 1998 erano stati riportati almeno 40.000 nuovi casi, nel 2008 erano scesi sotto i 10.000 e nel 2018 ne sono stati riportati solo 997. Dal 2000 al 2018 si è avuta una riduzione del 95%.

L'OMS nel 2012 aveva fissato l'obiettivo di ridurre l'impatto della malattia del sonno a un livello in cui cessasse di essere un problema di salute pubblica entro il 2020. Uno degli indicatori per monitorare il raggiungimento di questo obiettivo era la riduzione del numero annuale di nuovi casi di tripanosomiasi africana a meno di 2.000 entro il 2020. Questo obiettivo è stato raggiunto, aprendo così la strada all'obiettivo per il 2030: l'eliminazione totale della trasmissione di *T. b. gambiense* per raggiungere zero casi.

4.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI

Il decorso clinico della tripanosomiasi africana ha due stadi. Nel primo stadio (stadio emolinfatico) il parassita si trova in circolo e non ha ancora invaso il sistema nervoso centrale (SNC). Quando i tripanosomi attraversano la barriera emato-encefalica e infettano il SNC si ha il secondo stadio (stadio neurologico). La velocità di progressione della malattia è differente nelle due sottospecie di tripanosomi, lenta per *T. b. gambiense* e rapida per *T. b. rhodesiense*, anche se sono stati descritti casi di infezione fulminante da *gambiense* e infezioni croniche da *rhodesiense*. In tutti e due i casi la malattia, se non trattata, conduce al coma e alla morte.

In entrambe le forme nel sito della puntura dell'insetto i parassiti proliferano e dopo 5-15 giorni, occasionalmente, si forma un nodulo o un'ulcera denominata tripanoma o *chancre* che si risolve spontaneamente entro poche settimane. I tripanomi nei pazienti africani sono rari, al contrario che nei pazienti di origine europea, in particolare in quelli infetti da *T. b. rhodesiense*.

- L'infezione da *T. b. gambiense* ha una progressione lenta e un andamento cronico. Dopo un periodo asintomatico più o meno lungo possono comparire sintomi aspecifici intermittenti come febbre, cefalea, artro-mialgie, astenia, prurito. Possono anche verificarsi

edemi transitori al volto e agli arti e in circa il 50% dei casi può essere presente una linfoadenopatia cervicale (segno di Winterbottom). La splenomegalia e più raramente l'epatomegalia sono altri segni aspecifici. La fase emolinfatica è in grado di durare da mesi ad anni.

In genere dopo 1-2 anni si palesa il coinvolgimento del SNC con cambio di personalità, demenza, apatia, disturbi del linguaggio, insonnia notturna e sonnolenza diurna (malattia del sonno), cefalea costante, gravi alterazioni motorie, paralisi, coma e, in assenza di terapia efficace, morte nel giro di circa tre anni.

- L'infezione da *T. b. rhodesiense* ha una progressione rapida a volte fulminante. Nel giro di 1-3 settimane dal morso infettante compaiono febbre, malessere, dolori muscolari e articolari, linfoadenopatia loco-regionale. Dopo 3-4 settimane dall'infezione il parassita invade il SNC con decadimento mentale, demenza precoce, apatia, cefalea, alterazioni del ritmo sonno-veglia e problemi neurologici. La maggior parte delle morti (>80%) avviene entro sei mesi dall'esordio della malattia.

Diagnosi differenziale

Malattie come la malaria, la febbre enterica, la meningite tubercolare e l'infezione da HIV possono avere sintomi simili a quelli della tripanosomiasi africana e spesso essere coinfezioni.

4.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE

Nelle aree di endemia la diagnosi di infezione da *T. b. gambiense* prevede un percorso in tre fasi: sierologia (screening), conferma diagnostica e stadiazione.

Per *T. b. rhodesiense* non esistono test sierologici affidabili quindi la diagnosi si basa essenzialmente su metodi diretti. La conferma diagnostica è relativamente semplice poiché i tripanosomi nel flusso sanguigno sono di frequente numerosi.

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

4.4.1 TECNICHE SIEROLOGICHE

Esistono tecniche sierologiche che ricercano anticorpi anti tripanosoma, per una diagnosi più precoce sul siero e più tardiva su liquor.

La tecnica più utilizzata è il test di agglutinazione diretta (CATT: *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*) in uso ormai da 40 anni. Nel siero sono significativi solo titoli elevati (≥ 1:16), mentre nel liquor è significativa anche una risposta anticorpale a titolo molto basso. Il test è fornito da OMS e non è disponibile in Italia.

Recentemente è stato messo a punto un test rapido immunocromatografico (RDT) commercializzato anche in Italia.

Sebbene CATT e RDT siano altamente sensibili e quindi molto utili sia per lo screening delle popolazioni a rischio, sia per diagnosi individuali, essi non sono specifici al 100% e soprattutto quando la prevalenza della malattia è bassa il loro valore predittivo positivo (PPV) diventa criticamente basso. Ad esempio, con una specificità del 98% e una prevalenza dello 0,1%, il PPV è solo del 4,5%. Attualmente, nella maggior parte dei focolai di malattia del sonno la prevalenza è di gran lunga inferiore allo 0,1% e i test sierologici producono circa 99 risultati falsi positivi per ogni vero positivo. Di conseguenza è indispensabile confermare la diagnosi per mezzo dell'evidenziazione dei tripanosomi (vedi Tecniche dirette).

Sono anche state messe a punto anche tecniche di agglutinazione al latex, in immunofluorescenza e ELISA che sono però tecniche sviluppate *in house* e al momento non presenti sul mercato italiano.

4.4.2 TECNICHE DIRETTE

La ricerca diretta dei tripanosomi è eseguita sulla lesione cutanea iniziale, sull'aspirato linfonodale, su sangue periferico, su midollo osseo e su liquor utilizzando tecniche diverse, più o meno sensibili. Il riscontro di tripanosomi su uno o più campioni dipende dallo stadio della malattia e dalla specie

in quanto la carica parassitaria è più elevata in *T. b. rhodesiense* raggiungendo valori fino a 10.000 tripanosomi/mL, mentre è più bassa in *T. b. gambiense* sia nel sangue che nel liquor con valori che possono essere inferiore al limite di rilevazione dei metodi parassitologici più sensibili (circa 100 tipanosomi/mL).

Ricerca nella lesione cutanea iniziale

Si disinfetta la superficie della lesione e si aspira con siringa con ago sottile il materiale sieroso, oppure si opera una scarificazione della lesione cutanea. Il materiale può essere esaminato a fresco osservando i tripomastigoti mobili oppure dopo colorazione con Giemsa.

Ricerca su aspirato linfonodale

Durante lo stadio precoce dell'infezione da *T. b. gambiense*, più che da *T. b. rhodesiense*, i tripanosomi possono essere osservati esaminando al microscopio il liquido ottenuto dall'aspirato dei linfonodi cervicali. Si esegue l'osservazione a fresco a piccolo ingrandimento (obiettivi 10x e 40x). La sensibilità varia tra il 40 e l'80% ed è più alta durante il primo stadio della malattia.

Ricerca nel sangue periferico

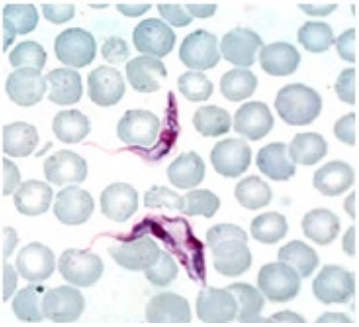
A causa dell'intermittenza dell'infezione, la parassitemia a livello ematico può variare, dunque è consigliabile effettuare diversi prelievi, saggiandoli con metodiche differenti.

Osservazione microscopica a fresco

Si pone una goccia di sangue tra vetrino portaoggetto e vetrino coprioggetto, utilizzando l'obiettivo 40x: in caso di positività si osserveranno dei microrganismi allungati, fusiformi, con membrana ondulante e flagello, molto mobili che spostano le emazie. Sono lunghi da 10 a 20 µm.

È una tecnica scarsamente sensibile.

Figura 18.Tripomastigoti di *T. b. gambiense/rhodesiense* In basso una forma in fase finale di divisione



Striscio sottile

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, spesso 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.

Goccia spessa

Si procede come già descritto per la malaria, si colora con Giemsa (o colorazione analoga).

L'aspetto del parassita è più contratto e non sempre si evidenzia la membrana ondulante.

Centrifugazione in Tubi Capillari (CTC)

La CTC si basa sul principio per cui la densità dei tripanosomi è simile a quella dei leucociti e quindi dopo centrifugazione si possono concentrare tra lo strato di emazie e il plasma (*buffy coat*). Si usano capillari con anticoagulante, simili a quelli per il microematocrito, dopo averli riempiti per capillarità si chiudono le estremità, si centrifuga nell'apposita microcentrifuga, e si osserva al microscopio, a livello del *buffy coat*, prima ad ingrandimento 10x e poi eventualmente a 40x o 60x.

Quantitative Buffy Coat (QBC)

La tecnica QBC, già descritta per la ricerca dei plasmodi malarici, prevede l'uso di tubi capillari con anticoagulante e arancio di acridina. Ha dimostrato avere eccellente sensibilità per la diagnosi di tripanosomiasi africana.

Tripla centrifugazione

È una tecnica molto semplice e di buona sensibilità.

Centrifugare 10 mL di sangue a 200 g per 3 minuti. Trasferire il surnatante, compreso il *buffy coat*, in una seconda provetta e centrifugare a 280 g per 5 minuti. Trasferire il surnatante, compreso il *buffy coat*, in una terza provetta e centrifugare a 540 g per 10-15 minuti.

Esaminare il fondello dove si sono concentrati gli eventuali tripomastigoti presenti nel sangue. È possibile allestire preparati fissati da colorare con Giemsa.

Ricerca nel midollo osseo

Nel caso di esami ripetutamente negativi con persistenza del dubbio diagnostico è consigliabile ricercare i parassiti a livello del midollo osseo, allestendo strisci sottili colorati con Giemsa.

Ricerca nel liquor

Dopo una valutazione ematico/linfonodale, si può eseguire la ricerca su liquor per valutare l'eventuale localizzazione nel SNC. Il liquor ottenuto da puntura lombare viene centrifugato (10 minuti a 900 g) e il sedimento osservato subito al microscopio. La presenza delle cosiddette cellule di Mott (plasmacellule contenenti numerosi grandi inclusi eosinofili) è patognomonica per la tripanosomiasi.

È importante esaminare il campione tempestivamente, al massimo entro 15 minuti, per l'estrema labilità degli elementi parassitari. In alternativa si possono allestire preparati fissati da colorare con Giemsa.

Doppia centrifugazione del liquor

È la tecnica più sensibile per la ricerca dei tripanosomi nel liquor.

Dopo aver centrifugato il liquor (vedi sopra) riempire con il sedimento un capillare per ematocrito. Chiudere le estremità e centrifugare nell'apposita microcentrifuga a 13.000-15.000 g per 10 minuti. Porre il capillare sotto il microscopio e osservare a 10x e quindi a 40x o 60x.

È importante esaminare il campione tempestivamente, al massimo entro 15 minuti, per l'estrema labilità degli elementi parassitari.

Stadiazione

La determinazione dello stadio della malattia è estremamente importante in quanto le terapie per il primo e il secondo stadio sono tra di loro differenti. È effettuata con l'esame del liquor prelevato con puntura lombare.

Secondo i criteri indicati da OMS, i pazienti con ≤ 5 leucociti/µL e assenza di tripanosomi nel liquor sono considerati al primo stadio mentre pazienti con tripanosomi nel liquor o con >5 leucociti/µL nel liquor sono considerati al secondo stadio (vedi tabella 4).

Tabella 4. Criteri per la stadiazione della tripanosomiasi africana

Ricerca tripanosomi nel liquor	Conteggio dei leucociti nel liquor	
	0-5/µL	>5/µL
Negativa	Primo stadio (Emo-linfatico)	Secondo stadio (Meningo-encefalico)
Positiva	Secondo stadio (Meningo-encefalico)	Secondo stadio (Meningo-encefalico)

Da: WHO. *Control and surveillance of human African trypanosomiasis*. 2013 (modificata)

Essendovi diverse altre infezioni o condizioni morbose che possono causare aumento dei leucociti nel liquor sono stati proposti anche altri criteri di valutazione per i casi in cui i tripanosomi sono assenti dal liquor: >20 leucociti/µL oppure >5 leucociti/µL e presenza di tripanosomi in qualunque altro liquido biologico (sangue, linfonodi, midollo osseo) o, infine, >5 leucociti/µL con elevate immunoglobuline della classe M (produzione intratecale di IgM).

Tecniche molecolari

Le tecniche di PCR da utilizzare in sostituzione del rilevamento microscopico dei parassiti sono oggetto di numerose ricerche, ma nella pratica clinica i risultati devono essere interpretati con cautela. Non sono tecniche standardizzate, soffrono di scarsa riproducibilità e non sono utili per la determinazione dello stadio e per il *follow-up* post trattamento; inoltre sono incompatibili con le strutture diagnostiche dei Paesi endemici.

Sembra molto promettente la tecnica LAMP che è altamente sensibile e specifica e che può essere facilmente eseguita anche ove vi sia una scarsa esperienza di biologia molecolare. In commercio, non in Italia, vi è un kit LAMP per *T. b. gambiense*.

FOCUS

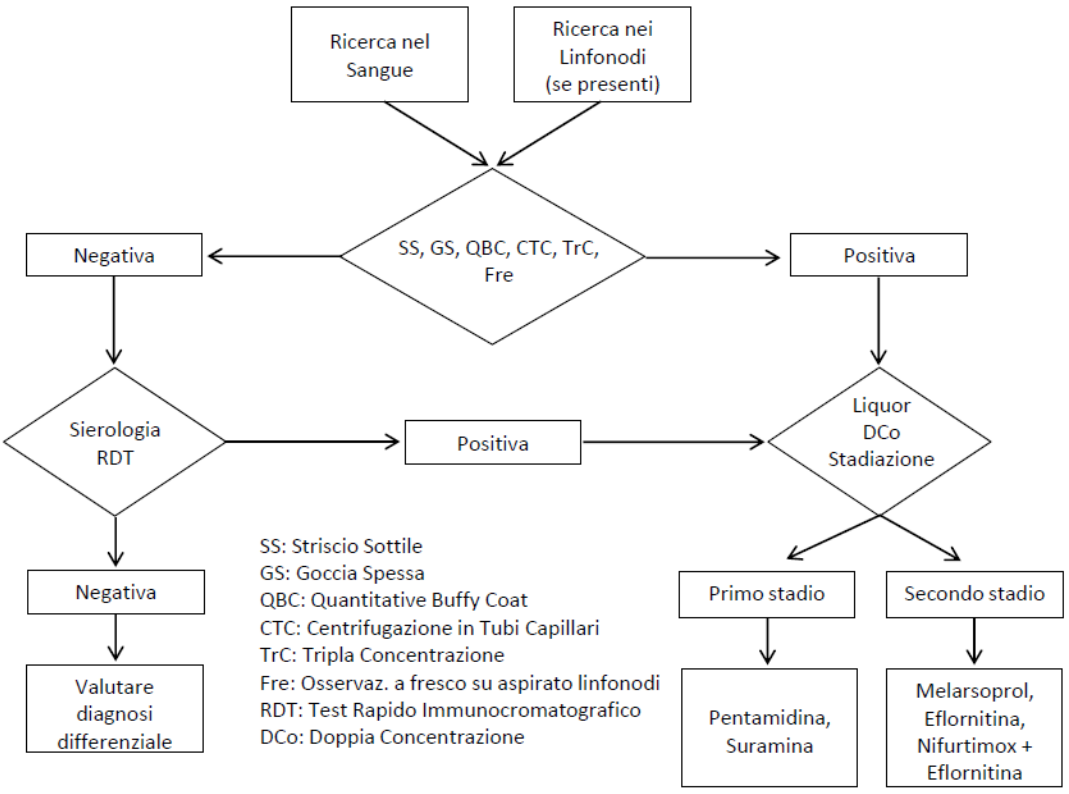
La diagnosi della tripanosomiasi africana è estremamente complessa e richiede personale molto esperto, è quindi preferibile sia eseguita presso laboratori specializzati e/o centri di riferimento.

4.5 ALGORITMO DIAGNOSTICO

In Italia, come del resto in tutte le aree non endemiche, non vi è la necessità di uno screening sierologico, di conseguenza la diagnosi si effettua a partire da test diretti e utilizzando la sierologia come ausilio diagnostico.

1. Effettuare una ricerca diretta nel sangue. Oltre allo striscio sottile eseguire almeno due tecniche di concentrazione tra quelle indicate nel diagramma di flusso. Se presenti linfonodi ingrossati ricercare i tripanosomi anche nell'aspirato linfonodale.
2. Se la ricerca è positiva effettuare la ricerca anche nel liquor con la tecnica della doppia centrifugazione. Determinare lo stadio della malattia.
3. Se la ricerca è negativa eseguire un test sierologico; in Italia è presente sul mercato un test immunocromatografico.
4. Se la sierologia è positiva effettuare la ricerca anche nel liquor con la tecnica della doppia centrifugazione. Determinare lo stadio della malattia.
5. Se la sierologia è negativa prendere in considerazione una diagnosi differenziale.

Figura 19. Algoritmo diagnostico per la tripanosomiasi africana



5. PARTE QUINTA: TRIPANOSOMIASI AMERICANA

5.1 EZIOLOGIA E TRASMISSIONE

L'agente eziologico della tripanosomiasi americana o malattia di Chagas è il *Trypanosoma cruzi*. Questo tripanosoma infetta diverse specie di mammiferi, compreso l'uomo, ed è trasmesso principalmente da emitteri ematofagi della sottofamiglia *Triatominae*. Questi insetti in genere vivono nelle fessure dei muri o del tetto di case mal costruite nelle aree rurali o suburbane. Normalmente si nascondono durante il giorno e diventano attivi di notte quando si nutrono di sangue di mammifero, incluso il sangue umano. Di solito mordono un'area esposta della pelle come il viso. Durante l'assunzione del pasto, l'insetto defeca e con le feci trasmette il tripanosoma che penetra attraverso la lesione del morso o qualunque altra lesione cutanea, attraverso gli occhi o la bocca, quando la persona grattandosi involontariamente li contamina con le feci.

Vie alternative di infezione sono: trasmissione congenita, trasfusione di sangue o suoi derivati, trapianto d'organo, via alimentare per assunzione di cibi e bevande contaminati, incidenti di laboratorio.

Anche un'altra specie, il *Trypanosoma rangeli*, può essere trasmessa all'uomo dalle triatomine, ha in parte la stessa zona di endemia del *T. cruzi*, ma è considerata non patogena per i mammiferi, uomo compreso.

5.2 EPIDEMIOLOGIA

La malattia di Chagas è una zoonosi il cui serbatoio è rappresentato da roditori, armadilli e opossum. Cani, gatti e capre svolgono un ruolo come serbatoio per le triatomine domestiche.

T. cruzi è endemico in 21 Paesi del continente americano dal Messico all'Argentina con l'esclusione delle isole caraibiche. In queste aree geografiche circa 6-7 milioni di persone risultano infette. L'infezione ha un andamento cronico con elevata morbosità, il 20–30% dei pazienti cronici soffriranno di gravi danni cardiaci e/o intestinali, ed è causa di più di 10.000 morti per anno (OMS-2010).

Con l'inurbamento delle popolazioni rurali e l'incremento della povertà urbana in diversi Paesi latino americani, la malattia di Chagas si è trasformata da malattia solo rurale in malattia anche urbana.

La prevalenza è molto variabile da Paese a Paese; i Paesi ove essa è più elevata sono la Bolivia (22.8%), il Guatemala (3.9%) e il Perù (3.8%). Anche all'interno dei vari Paesi essa varia da zona a zona essendo più elevata nelle zone rurali che nelle città. Ad esempio in Bolivia la prevalenza varia dal 1,54% al 64,5%, in Perù dallo 0,06% al 14,9%, ma anche in Paesi ove la prevalenza complessiva è più bassa come il Messico (0,6%) la variabilità è elevata (da 0,36% a 20,0%).

Nelle zone di endemia il tasso di trasmissione congenita varia dal 1% al 10%.

Negli ultimi decenni l'infezione è stata sempre più riscontrata anche in aree non endemiche come USA, Canada, Europa, Australia, Giappone. La causa principale della diffusione è legata alle migrazioni dal Centro-Sud America, ma sono anche possibili infezioni in viaggiatori di ritorno da zone endemiche e in bambini adottati.

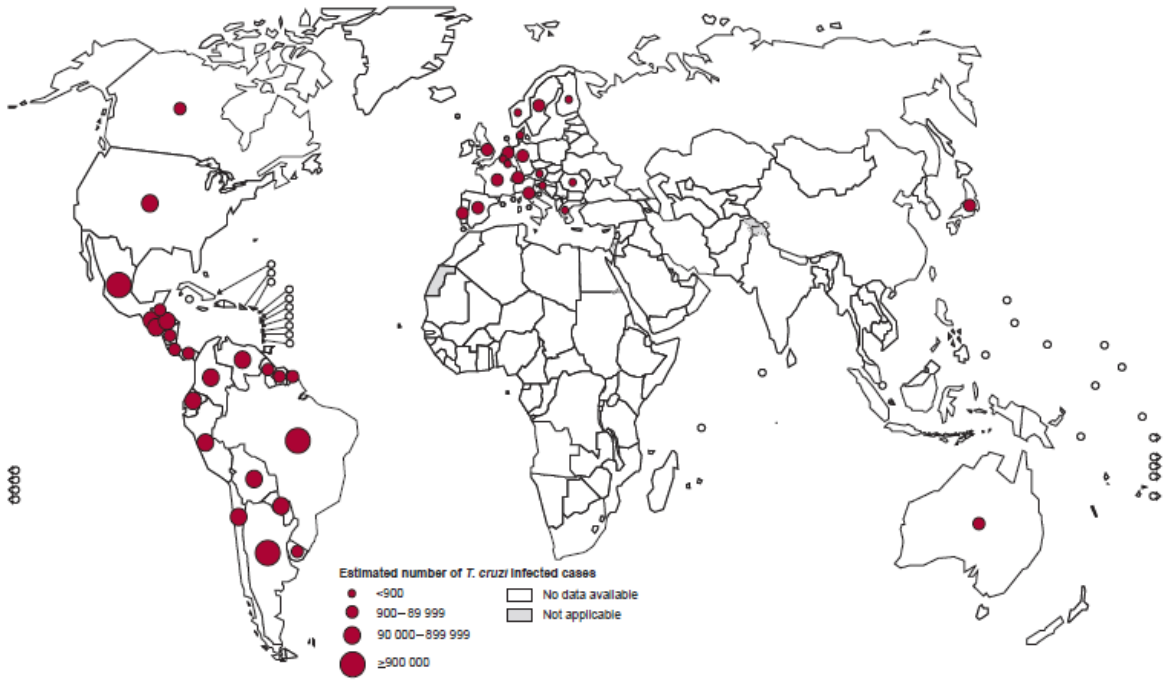
5.2.1 Situazione in Italia

In Italia, come del resto in tutta Europa, i casi di tripanosomiasi americana sono fortemente sottostimati. Nel nostro Paese vi sono almeno circa 380.000 immigrati, tra regolari e irregolari, provenienti da Paesi latino americani endemici per Chagas (ECDC 2011) In base ai *range* di prevalenza dei rispettivi Paesi di origine si stima che vi siano da 6.500 a 12.000 persone infette da *T. cruzi* con un *range* di prevalenza da 1,7% 3,1%.

Dai rari studi effettuati in Italia emerge un indice di mancata diagnosi del 98-99%.

Non si hanno dati certi riguardo la trasmissione congenita della malattia di Chagas in Italia, ma è stimato che, su circa 3.300 nascite per anno, 55-70 siano i parti di donne latino americane infettate e che quindi vi siano 1-6 nascite di bambini infettati con *T. cruzi* (1 caso su 1.000 parti).

Figura 20. Distribuzione mondiale della malattia di Chagas (Paesi endemici e non endemici)



Da: https://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1

5.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI

La malattia di Chagas ha un'incubazione di 4-14 giorni ed è caratterizzato da due fasi distinte: acuta e cronica.

Fase acuta

Ha una durata di 2-4 mesi e nel 95% dei casi non presenta segni o sintomi. Nel restante 5% possono essere presenti segni correlati al sito di inoculazione: il "segno di Romaña" che è una tumefazione unilaterale bipalpebrale dovuta alla penetrazione del parassita a livello congiuntivale e il "chagoma" che è un nodulo sottocutaneo sollevato, eritematoso edematoso, indolore o moderatamente doloroso che corrisponde alla zona di puntura dell'insetto.

I sintomi che possono essere presenti in questa fase sono febbre, astenia, linfoadenopatia, artralgia, epatosplenomegalia e miocardite con o senza tachicardia.

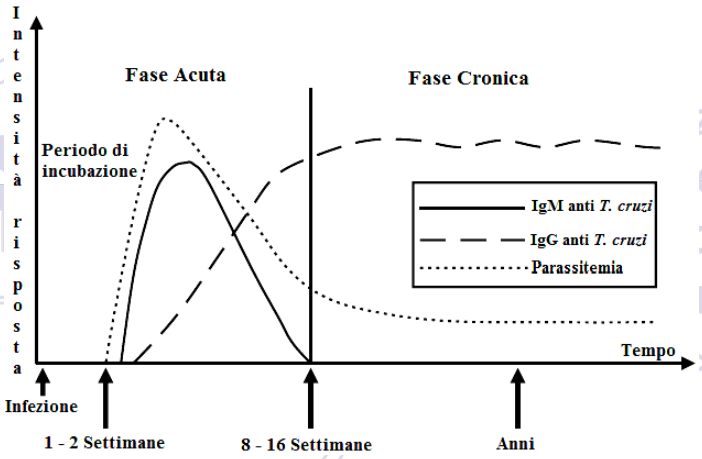
Durante la fase acuta sono reperibili nel sangue i tripomastigoti di *T. cruzi* (figura 21).

Fase cronica

La fase cronica è caratterizzata da un lungo periodo di latenza clinica (fase asintomatica o indeterminata) che in circa il 30% dei pazienti dura tutta la vita mentre i restanti pazienti nell'arco di un periodo di 10-30 anni possono sviluppare una o più manifestazioni cliniche (fase sintomatica o determinata) che nella maggior part dei casi interessano il cuore (cardiopatia cronica con aritmia, insufficienza cardiaca, cardiomegalia), l'esofago (megaesofago), il colon (megacolon) e il sistema nervoso.

Durante la fase cronica la parassitemia è molto bassa e in genere non rilevabile con l'esame microscopico, sono invece presenti anticorpi (figura 21).

Figura 21. Parassitemia e livelli anticorpali nella malattia di Chagas



Da: Rassi A Jr *et al. American Trypanosomiasis (Chagas Disease)*. Infect Dis Clin North Am. 2012 (Modificata)

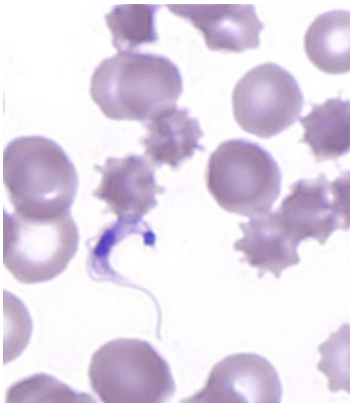
5.4 TECNICHE DIAGNOSTICHE

5.4.1 FASE ACUTA

Nella fase acuta la diagnosi si basa, oltre che sugli eventuali segni clinici, sulla dimostrazione dei tripomastigoti nel sangue e, sia pur in misura minore per la parziale presenza di anticorpi, su test sierologici (vedi fase cronica).

I tripomastigoti di *T. cruzi* hanno la forma di C o di U, sono lunghi in media 20 µm (da 12 a 30 µm), hanno un nucleo centrale mai in divisione a differenza di quelli africani, un chinetoplasto a volte sub terminale grande rispetto a quello dei tripomastigoti africani e un flagello che sporge libero dalla parte opposta al chinetoplasto. La membrana ondulante non è così evidente come in quelli africani (figura 22).

Figura 22. Tripomastigote di *T. cruzi*

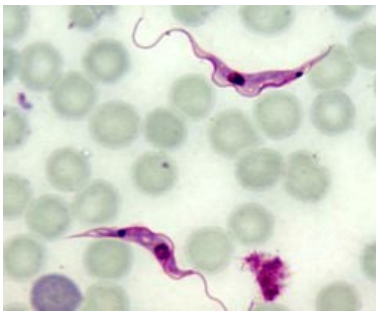


A causa della sovrapposizione geografica di *T. cruzi* e di *T. rangeli* (non patogeno) e le non infrequenti coinfezioni è necessario saper differenziare i tripomastigoti delle due specie.

I tripomastigoti di *T. rangeli* sono più lunghi (in media 30 µm, da 25 a 37 µm) e più grandi, hanno un nucleo allungato centrale, un chinetoplasto subterminale piccolo e una membrana ondulante ben evidente (figura 23).

Figura 23.

Tripomastigoti di *T. rangeli*



Da:https://blogs.biomedcentral.com/blog/tag/trypanosoma-rangeli/

La ricerca diretta nel sangue periferico, oltre che con i metodi già descritti per i tripanosomi africani quali microscopica a fresco, striscio sottile, goccia spessa, CTC, QBC, tripla concentrazione e per i quali si rimanda alla specifica parte, può essere eseguita anche con il metodo di Strout, raccomandato dall'OMS, che ha dimostrato una buona sensibilità.

Metodo di Strout

Raccogliere 3-5 mL in una provetta senza anticoagulante. Far coagulare il sangue (1-2 ore a 37° C), se sono presenti parassiti questi migrano fuori dal coagulo.

Centrifugare a bassa velocità (50-100 g). Eliminare il coagulo e trasferire il siero in un'altra provetta a fondo conico. Centrifugare di nuovo a bassa velocità per eliminare eventuali emazie rimaste. Trasferire il siero in una nuova provetta e centrifugare a 500-600 g per 5-10 minuti.

Esaminare al microscopio il sedimento "a fresco". Può anche essere strisciato, fissato e colorato con Giemsa. Conservare il siero per possibili esami sierologici.

5.4.2 Fase cronica

Nella fase cronica i tripomastigoti circolanti sono rari e a livelli molto al di sotto della soglia che ne permetterebbe l'evidenziazione con l'esame microscopico.

È possibile utilizzare tecniche dirette come la xenodiagnosi o l'emocoltura (con terreni analoghi a quelli utilizzati per *Leishmania* spp.) che, sebbene specifiche, hanno però una scarsa sensibilità (20-50%). Per questo motivo e per la loro complessità vengono ormai raramente utilizzate.

La diagnosi, in questa fase, è quindi affidata ad indagini sierologiche quali ELISA, IFI, Emoagglutinazione indiretta, Test diagnostici rapidi (*Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) in immunocromatografia.

La sensibilità e specificità delle indagini sierologiche risentono della tipologia di antigene utilizzato.

Utilizzando antigeni crudi sono possibili cross reazioni con le infezioni da *Leishmania*, che non sono presenti con l'uso di antigeni ricombinanti.

Tecniche molecolari

La PCR convenzionale, pur avendo una specificità praticamente del 100%, mostra ancora dei limiti nella sensibilità (50-90%). Allo stato attuale non può essere considerato un valido strumento, nella pratica clinica, per la diagnosi dell'infezione cronica; l'approccio sierologico ha una performance migliore.

I pochi kit in commercio, per la diagnosi con *Real time* PCR, mostrano una sensibilità non ottimale, inoltre anche a livello di ricerca vi sono molti differenti approcci (metodi di estrazione, *target* amplificati) con conseguente mancanza di procedure standardizzate.

Promettente sembra la tecnica LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*), ma a tutt'oggi non vi sono kit commerciali.

5.5 SICUREZZA DEL SANGUE E DEGLI EMOCOMPONENTI

Con il Decreto Ministeriale del 2/11/2015 "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" è stato introdotto l'obbligo di un test sierologico, prima della donazione, per i soggetti a rischio di aver contratto l'infezione.

Il decreto infatti nell'allegato III specifica che: "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 cruzi* negativo".

5.6 SICUREZZA DEI TRAPIANTI

Il documento "Protocollo per la valutazione di idoneità del donatore di organi solidi" edito dal Centro Nazionale Trapianti, nell'Allegato A prevede che: "Alla luce del crescente numero di soggetti latino-americani immigrati nel nostro Paese, è opportuno attenersi alle seguenti raccomandazioni operative:

- Per i potenziali donatori nati o che abbiano vissuto per periodi prolungati o che siano nati da madre originaria di uno dei Paesi dove la malattia di Chagas è endemica, è opportuno attuare lo screening sierologico, il cui risultato sia disponibile indicativamente entro 10 giorni dal trapianto al fine di effettuare un monitoraggio e un eventuale trattamento efficace e tempestivo del ricevente.
- Il CNT potrà essere di supporto ai CRT/CIR nell'individuare i laboratori di riferimento cui far effettuare in tempo utile le indagini sierologiche e/o parassitologiche.
- I donatori viventi sieropositivi dovranno essere sottoposti a trattamento specifico per 30 giorni prima della donazione.
- Tutti i riceventi di organi da donatori sieropositivi per Chagas dovranno essere sottoposti a monitoraggio sierologico e parassitologico con test diretti (Strout) e/o PCR. Controverso è l'uso della profilassi post trapianto e la maggior parte dei centri si limita al monitoraggio parassitologico. I riceventi per i quali venisse documentata la trasmissione dell'infezione dovranno essere trattati con Benznidazolo per 60-90 giorni".

5.7 ALGORITMO DIAGNOSTICO

Fase acuta

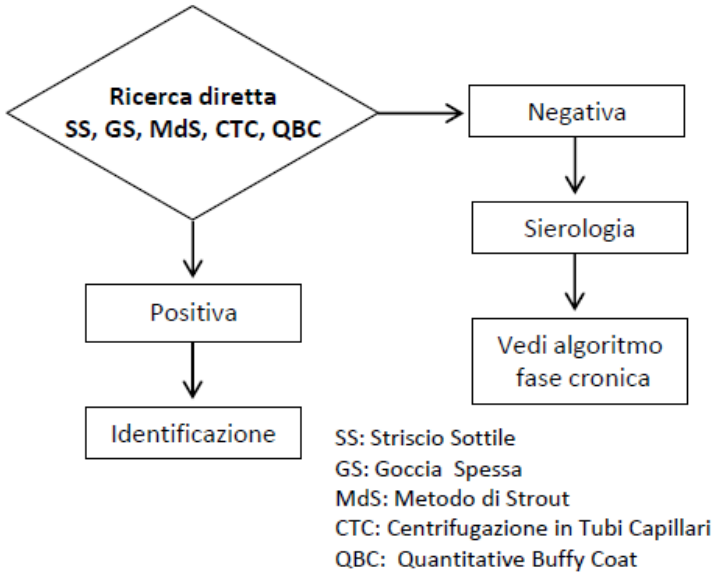
Nei Paesi, come il nostro, ove non è presente la trasmissione vettoriale oltre i possibili casi di origine trasfusionale o da trapianto, i rari casi di malattia di Chagas in fase acuta possono riguardare gli immigrati latino americani di recentissimo arrivo, i viaggiatori di ritorno da zone di endemia, i neonati da madre positiva per malattia di Chagas (vedi "Gestione della infezione in gravidanza" a pag. 52).

1. Oltre che allo striscio sottile eseguire uno o, meglio, più metodi di concentrazione. Si raccomanda l'uso del metodo di Strout. Se eseguiti il Quantitative Buffy Coat (QBC) o la

Concentrazione in Tubi Capillari (CTC) utilizzare più tubi capillari per esaminare una maggior quantità di sangue.

2. Se la ricerca diretta è positiva eseguire l'identificazione (diagnosi differenziale con *T. rangeli*).
3. Se la ricerca diretta è negativa eseguire test sierologici (vedi algoritmo fase cronica).

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

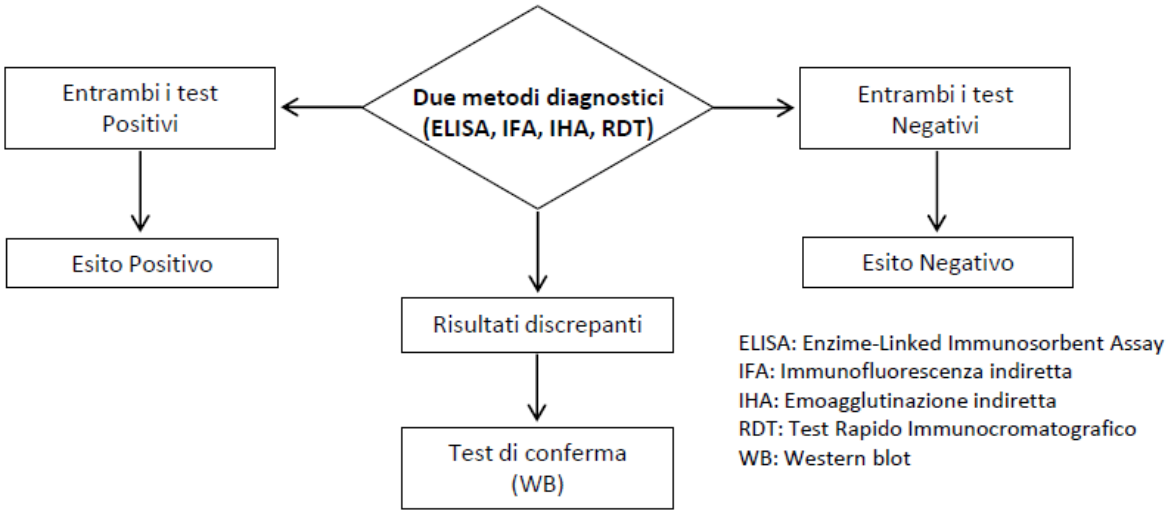


ione logi liani
Ente del Terzo Settore

Fase cronica

Per la diagnosi della malattia di Chagas in fase cronica, ad oggi, è indicata l'esecuzione come screening di almeno due test sierologici, uno con antigene crudo e uno con antigene ricombinante, e di confermare gli eventuali esiti discordanti con Western blot (figura 25) che si è dimostrato avere alte sensibilità (98-100%) e specificità (>98%).

Figura 25. Algoritmo diagnostico per la malattia di Chagas in fase cronica



Da: Gomes YM *et al. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved?* Mem Ist Oswaldo Cruz, 2009 (modificata)

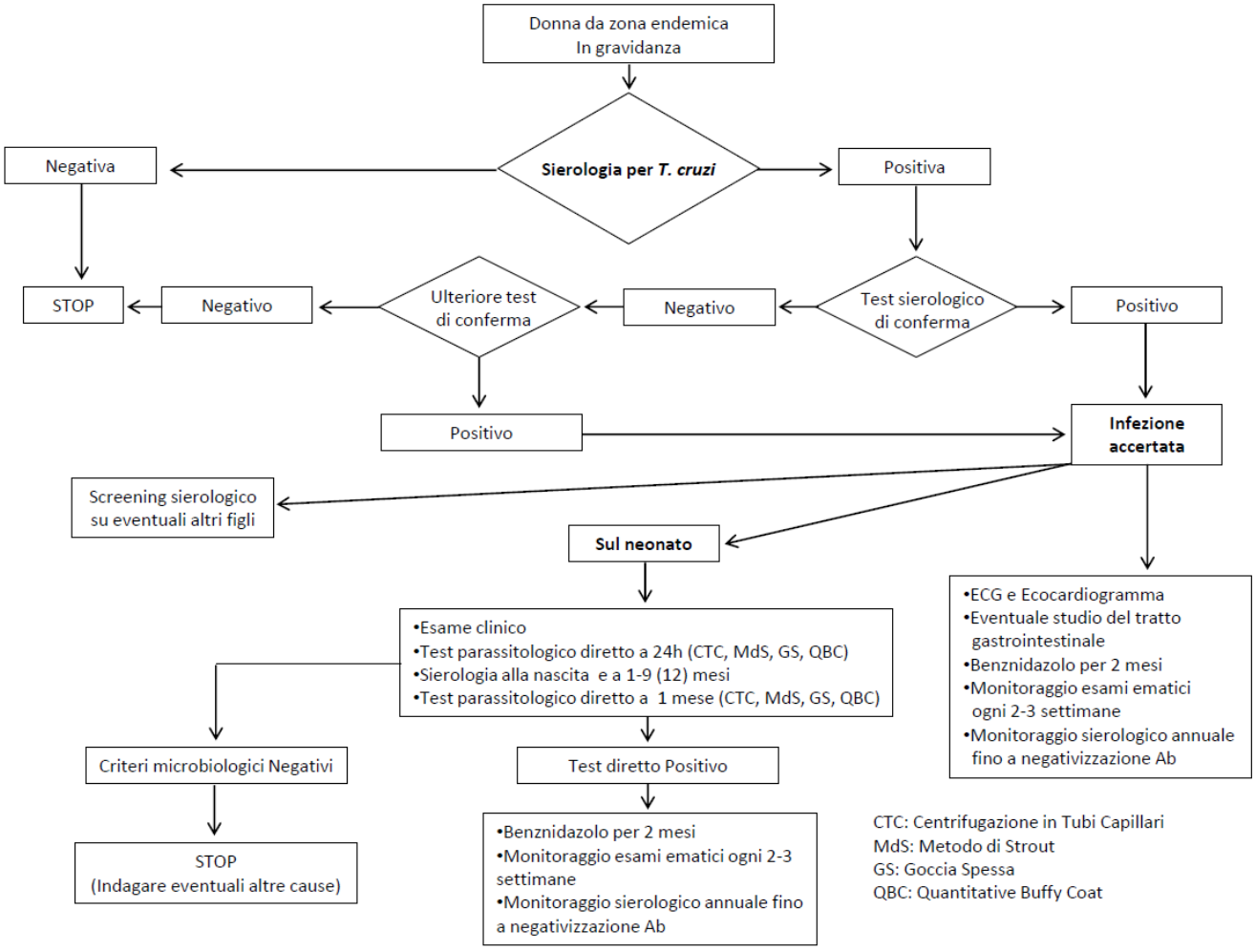
Prevenzione e gestione della infezione in gravidanza

Come ricordato in "Epidemiologia", *T. cruzi* può essere trasmesso dalla madre al feto, è pertanto necessario eseguire una diagnosi prenatale.

In particolare, nel 2019, l'OMS ha pubblicato le nuove raccomandazioni per la prevenzione della malattia di Chagas congenita dove vengono riconosciuti 5 gruppi a rischio: ragazze adolescenti, donne in età fertile, donne in gravidanza, neonati/bambini nati da madri infette, fratelli e sorelle o parenti di madri infette. Per questi 5 gruppi a rischio viene indicato lo screening per sierologia per *T. cruzi*. Se la sierologia è positiva, per tutti, esclusi i neonati da madri infette, viene indicato il trattamento.

Per i neonati da madre positiva è necessario eseguire il monitoraggio come indicato di seguito nell'algoritmo e in caso di positività all'esame diretto si esegue il trattamento.

Figura 26. Algoritmo diagnostico in gravidanza



6. PARTE SESTA: FILARIOSI EMATICHE

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

Una più corretta classificazione è quella che si basa sulla localizzazione dei vermi adulti nell'ospite parassitato.

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

In questa sede non vengono trattate altre tre filarie sottocutanee: *Onchocerca volvulus* causa dell'oncocercosi, *Dracunculus medinensis* causa della dracunculosi o "malattia del verme della Guinea" e *Mansonella streptocerca* ritenuta non patogena.

Va però ricordato che eccezionalmente anche nelle infezioni da *O. volvulus* è possibile riscontrare microfilaremia. L'oncocercosi o "cecità dei fiumi" (per la complicanza dovuta alla cheratite sclerosante) è endemica non solo in Africa, ma anche in Yemen ed in Sud America ove, al 2021, anche grazie al Programma di Eliminazione dell'Oncocerchosi nelle Americhe (OEPA) promosso dal *Carter Center*, sono rimasti solo due piccoli focolai nella regione amazzonica popolata dagli indios Yanomami (sud del Venezuela e nord del Brasile).

6.1 TRASMISSIONE

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

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

6.2 EPIDEMIOLOGIA

6.2.1 FILARIOSI LINFATICHE

Secondo dati aggiornati al 2018 si stima che 893 milioni di persone, in 49 Paesi, vivono in aree a rischio di infezione.

Circa 40 milioni di persone in tutto il mondo soffrono di manifestazioni clinicamente significative causate dalla filariosi linfatica, principalmente linfedema, elefantiasi e idrocele.

Il 90% delle infezioni è causato da *W. bancrofti*, il restante 10%, quasi completamente, da *B. malayi*. Molto minore il numero di infezioni da *B. timori*.

Gli esseri umani sono l'ospite esclusivo di *W. bancrofti*. Sebbene alcuni ceppi di *B. malayi* possano infettare anche alcune specie animali (scimmie, felini), si ritiene che il ciclo vitale in questi animali sia epidemiologicamente distinto da quello umano.

W. bancrofti è endemica in tutta la fascia tropicale e sub tropicale, *B. malayi* in Asia Sud Orientale e nel subcontinente indiano, *B. timori* in alcune delle Piccole Isole della Sonda (Flores, Sumba, Roti, Alor, Timor) (figura 27).

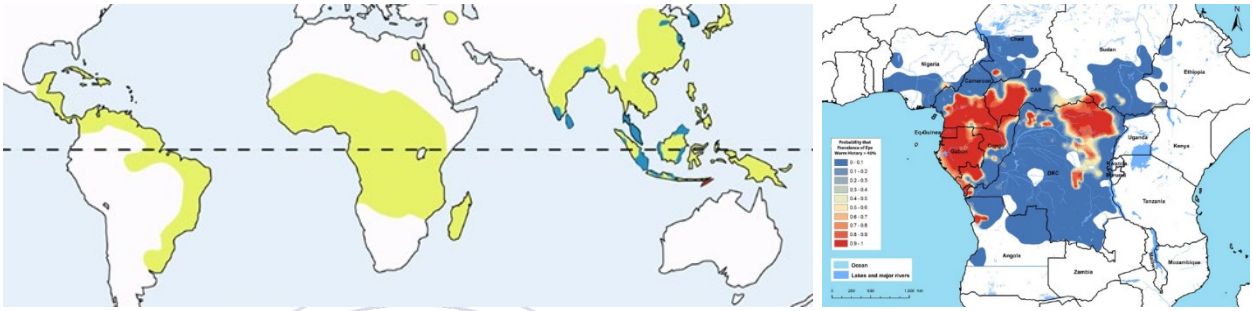
6.2.2 LOA LOA

L. loa è circoscritta all'Africa Occidentale e Centrale, dove un'analisi geostatistica della storia dell'infezione ha mappato come ad alto rischio di loiasi 10 Paesi in cui vivono circa 14,4 milioni di persone (figura 27). Anche per *L. loa* sembra che l'unico serbatoio sia l'uomo.

6.2.3 *MANSONELLA* SPP.

M. perstans è presente in Africa Occidentale e Centrale e in limitate aree del Sud America, *M. ozzardi* in Sud America e nei Caraibi (figura 28).

Figura 27. Distribuzione delle filarie linfatiche (Sinistra) e di *L. loa* (Destra)



W. bancrofti *B. malayi* *B. timori* *L. loa*

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

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

Figura 28. Distribuzione di Mansonella spp.

M. perstans *M. ozzardi*

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

6.3 CLINICA: CENNI SUI SEGNI E SINTOMI CLINICI

6.3.1 FILARIOSI LINFATICHE

A causa della scarsa efficienza degli insetti vettori nel trasmettere l'infezione occorre una prolungata e reiterata esposizione alle punture delle zanzare (centinaia e centinaia di punture) affinché un soggetto manifesti una filariosi; è quindi necessario un soggiorno della durata di almeno alcuni mesi in zone endemiche perché ciò avvenga.

Le larve penetrate dopo la puntura si trasformano in vermi adulti, femmine e maschi, che si localizzano a livello dei vasi e gangli linfatici, in prevalenza a livello dello scroto e del cordone spermatico e degli arti inferiori, ma anche superiori (*Brugia* spp.) ove possono vivere per 6-8 anni, ma, secondo alcuni autori, anche 18, 20 o più anni.

Dopo alcuni mesi (da 6 a 12) le femmine cominciano a produrre microfilarie (larve immature con guaina) che dal circolo linfatico passano a quello ematico.

Non sono rare le forme asintomatiche le quali comunque causano danni al sistema linfatico con possibile progressione alla fase cronica.

Nella fase acuta oltre a febbre sono presenti sintomi e segni a carico del sistema linfatico: linfangiti acute frequentemente a livello dello scroto, in età post puberale, e agli arti inferiori e superiori e adeniti prevalentemente ascellari e inguinali.

Col tempo le manifestazioni della fase acuta si attenuano e progressivamente nel giro di alcuni anni si instaura la fase cronica. Il danno ai vasi linfatici oltre che alla stasi meccanica sembra possa essere causata, attraverso un meccanismo ancora non chiarito, anche da mediatori prodotti dai parassiti stessi che causano dilatazione di vasi e/o inibiscono la loro contrattilità. Si ha linfedema che in 3 o più anni per *W. bancrofti*, più rapidamente per *Brugia* spp., causa elefantiasi, una ipertrofia cronica con sclerosi del derma e dell'epidermide. Le più frequenti localizzazioni sono agli arti inferiori e allo scroto. Nella donna sono segnalate localizzazioni mammarie soprattutto sotto forma di noduli.

Sia nelle forme asintomatiche che in quelle sintomatiche è quasi sempre presente eosinofilia.

Sindrome eosinofila tropicale. È una sindrome associata all'infezione da *W. bancrofti* e *B. malayi* dovuta a un'esagerata risposta immunitaria verso antigeni delle filarie, caratterizzata da ipereosinofilia (>3.000-5.000 eosinofili/µL di sangue, ma sono segnalati casi in cui si sono raggiunti 80.000 eosinofili//µL) associata a sintomi respiratori, principalmente tosse, dispnea, respiro sibilante e dolore toracico e febbre di grado variabile.

La diagnosi differenziale va fatta principalmente con l'asma bronchiale.

Si riscontrano alti livelli sierici di IgE ma anche titoli molto elevati di anticorpi anti filaria.

Se non trattata, la sindrome può portare a una fibrosi polmonare.

È rarissimo avere microfilaremia in quanto le microfilarie rimangono sempre confinate a livello delle arteriole polmonari (vedi oltre "Periodicità").

6.3.2 LOA LOA

Le principali manifestazioni cliniche della loiasi sono l'edema di Calabar, il prurito e la migrazione sub-congiuntivale del verme adulto.

L'edema di Calabar si manifesta prevalentemente agli avambracci e al dorso delle mani sotto forma di aree edematose calde non eritematose che frequentemente producono

sensazione di bruciore e parestesie. Hanno una durata di 2-3 giorni e si possono ripetere a intervalli irregolari in zone limitrofe (edema migrante).

Il prurito può essere concomitante agli edemi, ma anche generalizzato e di forte intensità.

Nel sottocute il verme adulto si sposta e può capitare che nella sua migrazione passi sotto la congiuntiva causando forte irritazione, lacrimazione, edema delle palpebre e fotofobia.

Una grave forma di encefalite con coma e possibile esito letale si può manifestare nei soggetti con forte infezione (>3.000 microfilarie per millilitro di sangue) che assumono ivermectina anche in basse dosi utilizzata per la terapia e la profilassi dell'oncocercosi o dietilcarbamazina (DEC) per la terapia dell'infezione da *W. bancrofti*. Si rammenta che le zone di endemia della loiasi sono anche endemiche per *O. volvulus* e *W. bancrofti*.

6.3.3 *MANSONELLA* SPP.

Sono generalmente considerate non patogene o a bassa patogenicità. Sono state occasionalmente associate a prurito, edemi sottocutanei, artralgie, adenopatie, dolori addominali. Può essere presente eosinofilia.

6.4 PERIODICITÀ

Alcune specie di microfilarie circolano nel sangue periferico a tutte le ore del giorno e della notte, mentre altre sono presenti solo durante alcuni periodi. La periodicità è la variazione del numero di microfilarie presenti in circolo durante le 24 ore. Le microfilarie a periodicità notturna rimangono confinate nelle arteriole polmonari durante il giorno e si trovano nel sangue periferico in pratica solo durante le ore notturne quando hanno maggiori possibilità di essere ingerite dagli insetti vettori, il contrario avviene per le microfilarie a periodicità diurna.

Le microfilarie che sono presenti nel sangue a tutte le ore ma la cui concentrazione aumenta significativamente durante le ore notturne o diurne sono dette a subperiodicità notturna o diurna rispettivamente. Le microfilarie che circolano senza cambiamenti significativi nel corso delle 24 ore sono dette aperiodiche.

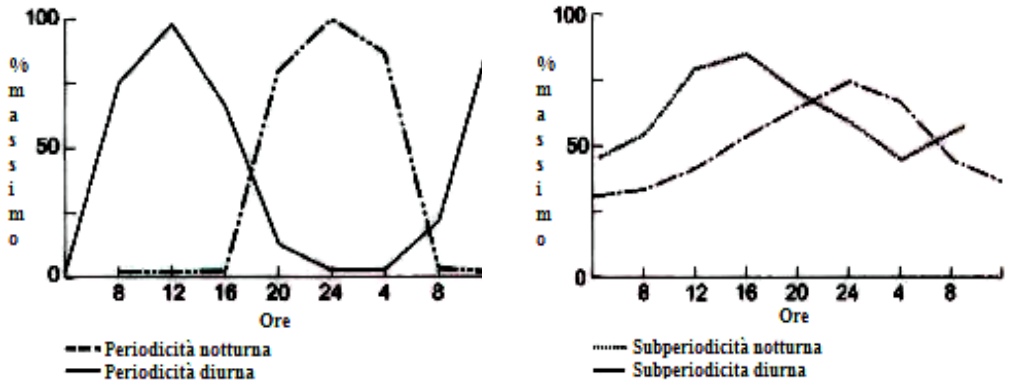
La conoscenza della periodicità delle microfilarie ha la sua importanza pratica nel decidere qual è il periodo migliore per effettuare il prelievo di sangue per la loro ricerca (tabella 5, figura 29).

Tabella 5. Periodicità delle microfilarie ematiche

Specie	Periodicità	Ore raccomandate per il prelievo
W. bancrofti	Notturna [a]	22:00-01:00 (picco 24:00)
B. malayi	Notturna [b]	22:00-01:00 (picco 24:00)
B. timori	Notturna	22:00-01:00 (picco 24:00)
L. loa	Diurna	12:00-14:00 (picco 13:00)
Mansonella spp.	Aperiodiche	Qualunque ora
(a) Subperiodicità notturna (picco ore 21:00) in Indonesia, Malesia, e parti delle Filippine e Tailandia (b) Subperiodicità diurna (picco ore 16:00) in Nuova Caledonia e Polinesia; subperiodicità notturna nelle zone rurali della Tailandia		

Da: WHO. *Lymphatic Filariasis*. 2001 (modificata)

Figura 29. Fluttuazione della microfilaremia



Da: WHO. *Bench Aids for the diagnosis of Filarial Infections*.1997 (modificata)

6.5 TECNICHE DIAGNOSTICHE

6.5.1 TECNICHE DIRETTE

Sebbene occasionalmente le microfilarie possano essere riscontrate in preparazioni di midollo osseo, in aspirati bioptici e in liquidi da idrocele, di norma la ricerca si esegue su sangue periferico. Non è infrequente che la microfilaremia sia bassa e di conseguenza oltre che allo striscio sottile del sangue periferico sono necessarie tecniche di concentrazione come la goccia spessa, la filtrazione su membrana, la tecnica di Knott, la citocentrifugazione.

Striscio sottile

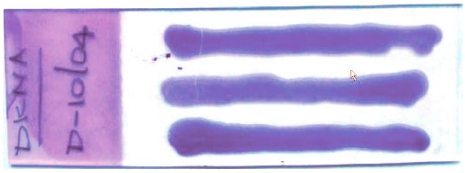
Per la preparazione dello striscio sottile si procede come già descritto per la malaria.

Goccia spessa

La preparazione della goccia spessa è diversa da quella descritta per la malaria, viene esaminata una maggior quantità di sangue (60 µL) e il preparato deve essere de-emoglobinizzato e quindi fissato.

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

Figura 30. Goccia spessa per microfilarie



Da: WHO. *Lymphatic Filariasis*. 2001 (modificata)

In alternative allestire su uno o più vetrini tre gocce spesse preparate come per la malaria, con 20 µL di sangue ciascuna.

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

Colorazione dello striscio sottile e della goccia spessa

La colorazione più usata è la colorazione di Giemsa. Procedere come già descritto per la malaria avendo cura che il lavaggio finale della colorazione sia molto delicato per evitare il distacco delle microfilarie dal vetrino.

I nuclei somatici delle microfilarie sono di colore rosso porpora o violetto, mentre la guaina si colora in rosa intenso. Con la colorazione di Giemsa la guaina di *L. loa* non si colora.

Per una buona colorazione delle guaine è necessaria una colorazione all'Ematossilina. Sono colorazioni comunemente impiegate in Anatomia Patologica a cui ci si può rivolgere nei rari casi in cui ciò fosse necessario.

Osservazione microscopica

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

Filtrazione su membrana

Si diluisce 1 mL di sangue con anticoagulante in 10 mL di acqua distillata (o una miscela di Teepol™ + Soluzione fisiologica o di Teepol™ + Formalina) per lisare le emazie e quindi si filtra attraverso una membrana di cellulosa o policarbonato a porosità nota (pori del diametro di 5 µm per trattenere le microfilarie più grandi come quelle di *L. loa*, pori del diametro di 3 µm per trattenere tutte le microfilarie). Dopo la filtrazione si rimuove il filtro, lo si mette su un vetrino, e si osserva al microscopio a piccolo ingrandimento (100x). Se presenti microfilarie (vitali se non si usa formalina) è possibile colorarle con Giemsa dopo fissazione con metanolo. Questa tecnica, molto sensibile permette anche il conteggio delle microfilarie per mL.

Per i dettagli della tecnica si rimanda a: WHO-*Manual of basic techniques for a health laboratory; 2003* e a *WHO-Bench Aids for the diagnosis of filarial infections; 1997* (vedi "Fonti Bibliografiche"),

Tecnica di Knott (Concentrazione per centrifugazione)

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

NB: La lunghezza delle microfilarie trattate con formalina al 2% o saponina al 2% è maggiore rispetto a quella delle microfilarie nei preparati, striscio sottile e goccia spessa, allestiti direttamente dal sangue (tabella 6).

Per i dettagli della tecnica si rimanda a: *WHO-Manual of basic techniques for a health laboratory; 2003* e a *WHO-Bench Aids for the diagnosis of filarial infections; 1997*. (vedi "Fonti Bibliografiche").

Citocentrifugazione

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

Quantitative Buffy Coat (QBC)

La tecnica QBC, già descritta per la ricerca dei plasmodi malarici, prevede l'uso di tubi capillari con anticoagulante e arancio di acridina.

Test immunocromatografico per *W. bancrofti*

Il test immunocromatografico (ICT) per la filariosi linfatica ricerca antigeni circolanti di *W. bancrofti* (90% delle filariosi linfatiche). È stato validato e promosso dall'OMS come strumento diagnostico primario per la mappatura, il monitoraggio e l'eliminazione della malattia.

Attualmente OMS consiglia l'utilizzo del test *Alere™ Filariasis Test Strip (FTS)* in sostituzione di quello precedentemente raccomandato *Binax Now® filariasis immunochromatographic test (ICT)* in

quanto, pur ricercando gli stessi antigeni, è considerato più sensibile, ha una maggiore stabilità e un costo inferiore.

Studi recenti hanno evidenziato la possibilità di reazioni crociate di entrambi i test con *L. loa* soprattutto nelle zone ad alta endemia.

Tecniche molecolari

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

Al momento le tecniche molecolari non sono utilizzate nella routine di laboratorio.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

6.5.2 Diagnosi di specie

Le principali caratteristiche morfologiche delle microfilarie da prendere in considerazione per una corretta diagnosi di specie riguardano: la lunghezza e lo spessore, la presenza o meno di una guaina (l'individuazione della guaina richiede un'osservazione attenta in quanto a seconda della colorazione utilizzata questa può colorarsi o meno), lo spazio cefalico (corto o lungo), la disposizione dei nuclei del corpo della microfilaria (possono essere ben separati e distinguibili singolarmente o accavallati l'un l'altro e densamente stipati, si colorano in scuro e formano colonne più o meno compatte e regolari), il tratto terminale che può essere privo di nuclei o presentare nuclei fino al termine dell'estremità caudale, la forma della coda (affusolata/appuntita o smussata).

In tabella 6 sono riportate le principali caratteristiche delle microfilarie "ematiche", in figura 31 i particolari schematici delle estremità cefaliche e caudali e nelle figure da 32 a 35 alcune immagini.

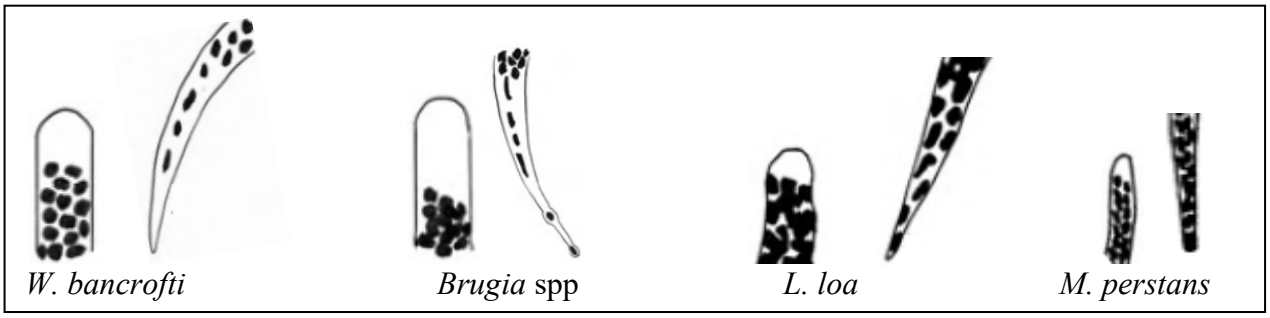
Tabella 6. Principali caratteristiche delle microfilarie ematiche

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

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

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

Figura 31. Disegni schematici delle estremità cefaliche e caudali delle microfilarie



Da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001 (modificata)

Figura 32. *Wuchereria bancrofti*: estremità cefalica e caudale

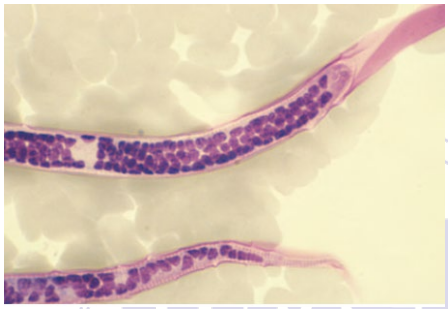
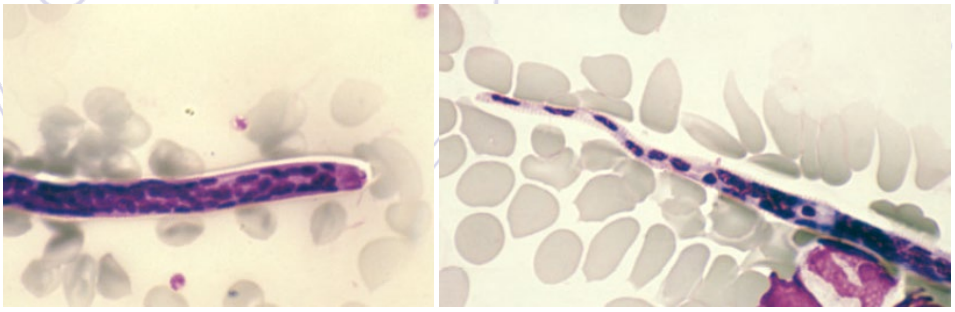


Figura 33. Brugia malayi: estremità caudale

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

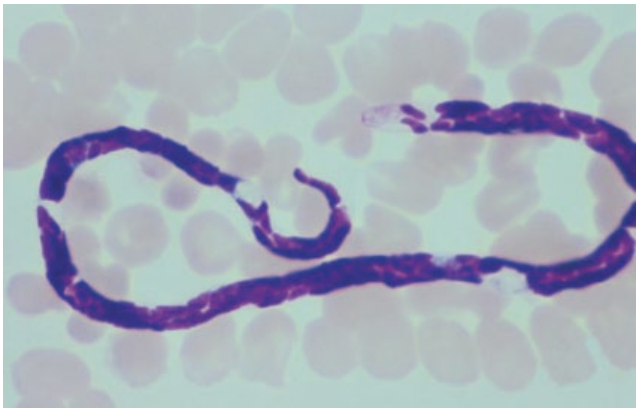
Figura 34 *Loa loa*: estremità cefalica e caudale



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

In *L. loa* la guaina non è colorata, ma se ne intuisce la presenza dallo scostamento delle emazie dal corpo della microfilaria.

Figura 35. *Mansonella perstans*



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

6.5.3 TECNICHE SIEROLOGICHE

Sono ormai considerate quasi "storiche" tecniche come l'immunoelettroforesi o la elettrosineresi che utilizzano antigeni crudi di specie di filarie non umane come *Dirofilaria immitis* o di altri nematodi come *Ascaris suum* o *A. lumbricoides*. Raro anche l'uso dell'immunofluorescenza indiretta (IFA) con antigeni costituti da sezioni di filarie animali quali *Acanthocheilonema (Dipetalonema) viteae*, *Setaria* spp., *D. immitis*.

I test ELISA possono utilizzare sia antigeni ricombinanti, sia antigeni somatici di microfilarie animali che cross reagiscono con gli anticorpi anti filarie umani (ELISA pan-filarie).

L'osservazione che nelle infezioni da filarie fossero presenti elevati livelli di IgG4 ha portato a sviluppare test con antigeni ricombinanti (Bm14, Wb123 per *W. bancrofti*, BmR1 per *Brugia* spp., Ll-SXP-1 per *L. loa*) che rilevassero le IgG4 specifiche. Questi test hanno una buona specificità, anche se presentano cross reazioni tra le varie specie di filarie, ma una scarsa sensibilità.

Gli ELISA pan-filarie sono poco utilizzati nelle zone di endemia, ma possono essere molto validi in zone non endemiche come screening per le infezioni d'importazione. In Italia è commercializzato un ELISA che utilizza come antigene *Acanthocheilonema viteae*.

Le IgG4 anti-filarie linfatiche possono essere evidenziate anche per mezzo di test diagnostici rapidi (RDTs) in immunocromatografia che hanno buone sensibilità e specificità. Un test RDT, che rileva anche le IgM di *W. bancrofti* e *Brugia* spp., è presente sul mercato italiano. Esiste anche un RDT per la loiasi (*Loa Antibody Rapid Test*) non commercializzato in Italia.

Nelle zone di endemia per *Brugia* spp. l'OMS raccomanda l'uso dell'RDT *Brugia Rapid™ Test* (non commercializzato in Italia), che rileva IgG4 specifiche anti-*B. malayi* e/o anti-*B. timori*, da associare al test immunocromatografico per gli antigeni circolanti di *W. bancrofti*.

6.6 ALGORITMO DIAGNOSTICO

Sono proposti due algoritmi diagnostici per le filariosi ematiche utilizzabili in zone non endemiche. Il primo con un approccio diretto parassitologico (figura 36), il secondo con un approccio indiretto sierologico (figura 37).

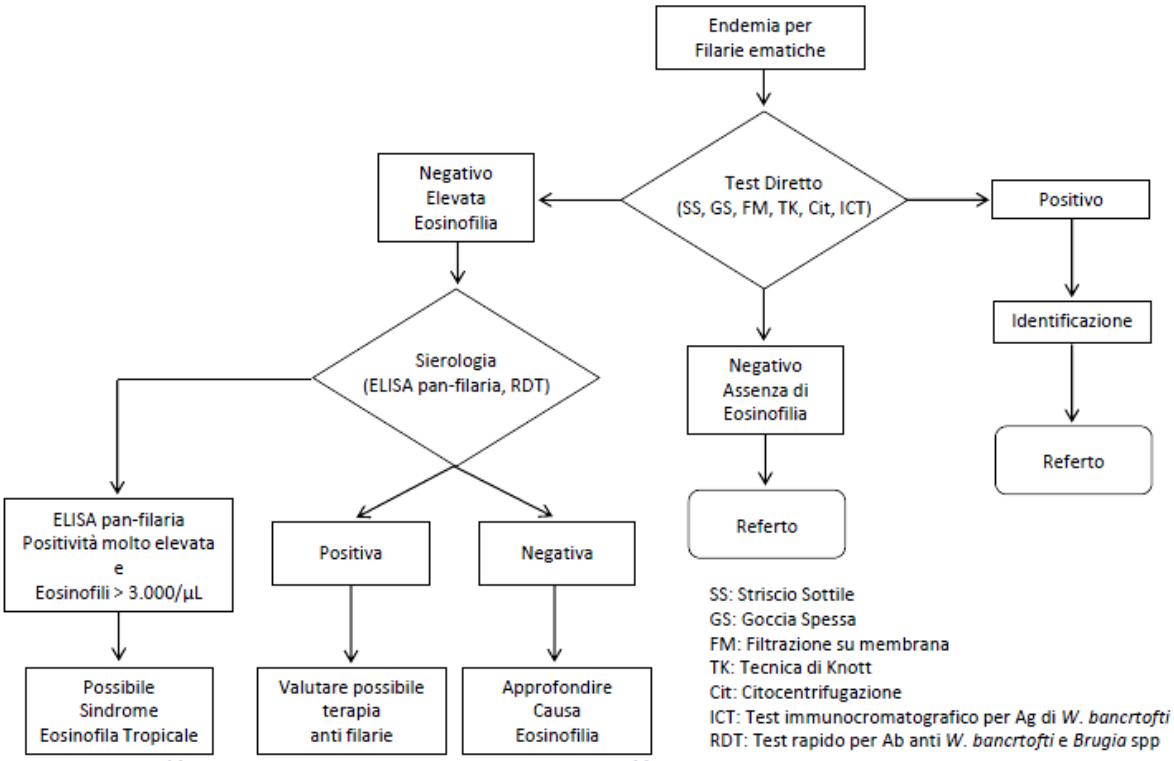
Approccio diretto

1. Eseguire sempre il conteggio dei leucociti eosinofili.
2. Eseguire, oltre allo striscio sottile, uno o più test dopo concentrazione: goccia spessa, filtrazione su membrana, tecnica di Knott, citocentrifugazione, QBC e, se disponibile, ICT per antigeni di *W. bancrofti*.
3. Se la ricerca diretta è positiva procedere all'identificazione.
4. Se la ricerca diretta è negativa e l'eosinofilia non è significativa: Stop.
5. Se la ricerca diretta è negativa e l'eosinofilia è elevata procedere con test sierologici: ELISA pan-filaria o RDT per *W. bancrofti* e *Brugia* spp. (se il paziente proviene da zone ove non è endemica *L. loa*).
6. Se la sierologia è negativa vanno approfondite le cause dell'ipereosinofilia. Queste possono essere di origine parassitaria (*Cystoisospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Onchocerca volvulus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e altri trematodi, *Hymenolepis nana* e saltuariamente altri cestodi), ma anche non parassitaria (leucemie e malattie mieloproliferative, linfoma di Hodgkin, eosinofilie secondarie: allergia-atopia, uso protratto di alcuni farmaci ecc.).

7. Se i test sierologici sono positivi valutare l'ipotesi di un trattamento anti-filarie.

8. Se il test ELISA pan-filaria è fortemente positivo (DO molto alta) e l'eosinofilia è molto elevata (>3.000/µL) è possibile che sia presente una Sindrome Eosinofila Tropicale.

Figura 36. Algoritmo diagnostico per le filariosi ematiche: approccio diretto parassitologico



Approccio indiretto sierologico

1. Eseguire sempre il conteggio dei leucociti eosinofili.

2. Eseguire ELISA pan-filaria e/o RDT per *W. bancrofti* e *Brugia* spp. (se il paziente proviene da zone ove non è endemica *L. loa*, RDT può essere usato come primo test).

3. Se la sierologia è negativa e l'eosinofilia non è significativa: Stop.

4. Se la sierologia è negativa, ma l'eosinofilia è significativa eseguire la ricerca diretta delle microfilarie (vedi punto 2 di algoritmo approccio diretto).

5. Se la sierologia è positiva eseguire test diretti la ricerca diretta delle microfilarie (vedi punto 2 di algoritmo approccio diretto).

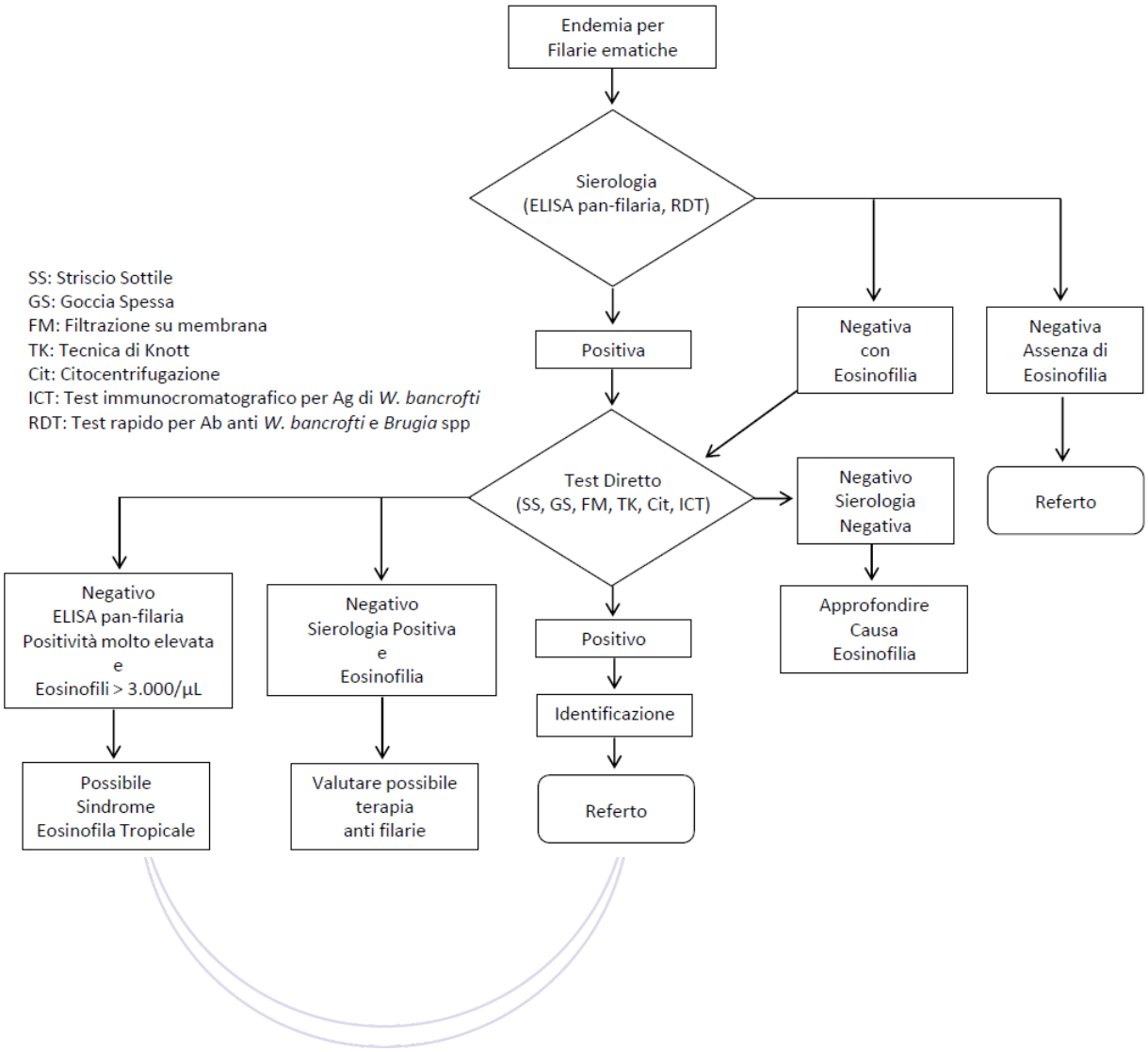
6. Se la ricerca diretta è positiva procedere all'identificazione.

7. Se la ricerca diretta e la sierologia sono negative, ma l'eosinofilia è significativa vanno approfondite le cause dell'ipereosinofilia (vedi punto 6 di algoritmo approccio diretto).

8. Se la ricerca diretta è negativa, ma la sierologia è positiva e l'eosinofilia è significativa, valutare una possibile terapia empirica anti-filarie.

9. Se la ricerca diretta è negativa, ma il test ELISA pan-filaria è fortemente positivo (DO molto alta) e l'eosinofilia è molto elevata (>3.000/µL) è possibile che sia presente una Sindrome Eosinofila Tropicale.

Figura 37. Algoritmo diagnostico per le filariosi ematiche: approccio indiretto sierologico



7. QUADRO RIEPILOGATIVO

In figura 38 è riportato il quadro riepilogativo degli algoritmi diagnostici delle parassitosi ematiche e del SRE. Sono illustrati alcuni possibili collegamenti tra di loro esistenti.

Oltre al fatto di essere tutte trasmesse da artropodi, queste parassitosi hanno in comune la circostanza di essere presenti in zone tropicali e sub tropicali e spesso le aree di endemia sono comuni. Fanno parziale eccezione la babesiosi e la leishmaniosi che sono presenti anche in zone temperate ove le altre parassitosi ematiche non sono endemiche.

Altro tratto che le "apparenta" è la presenza di almeno un sintomo comune a tutte: la febbre.

Il tipo di febbre (continua, periodica, ricorrente ecc.) non è utile ai fin della diagnosi differenziale tra le diverse affezioni. Nell'infezione primaria è praticamente eccezionale riscontrare una febbre periodica classica (terzana, quartana) che possa essere considerata patognomonica per l'infezione malarica.

Oltre alla febbre sono diversi i sintomi o segni che possono avere in comune (anemia, piastrinopenia, pancitopenia, splenomegalia ecc.) per i quali, oltre a quanto succintamente descritto nei paragrafi di "Clinica", si rimanda alla consultazione di testi specifici.

In presenza di una persona che proviene da aree endemiche per parassitosi ematiche e che ha febbre, l'esame che il medico curante più frequentemente richiede è la ricerca di plasmodi della malaria.

A prescindere dalle tecniche diagnostiche di supporto adottate (RDT, LAMP, PCR) questa ricerca deve sempre avere come base l'esame microscopico dello striscio sottile e della goccia spessa.

Quando si esamina un preparato microscopico è possibile accidentalmente evidenziare parassiti diversi da *Plasmodium* (*Babesia*, *T. b. gambiense/rhodesiense*, *T. cruzi*, microfilarie). In figura 38 questa possibilità è indicata dalle frecce rosse tratteggiate

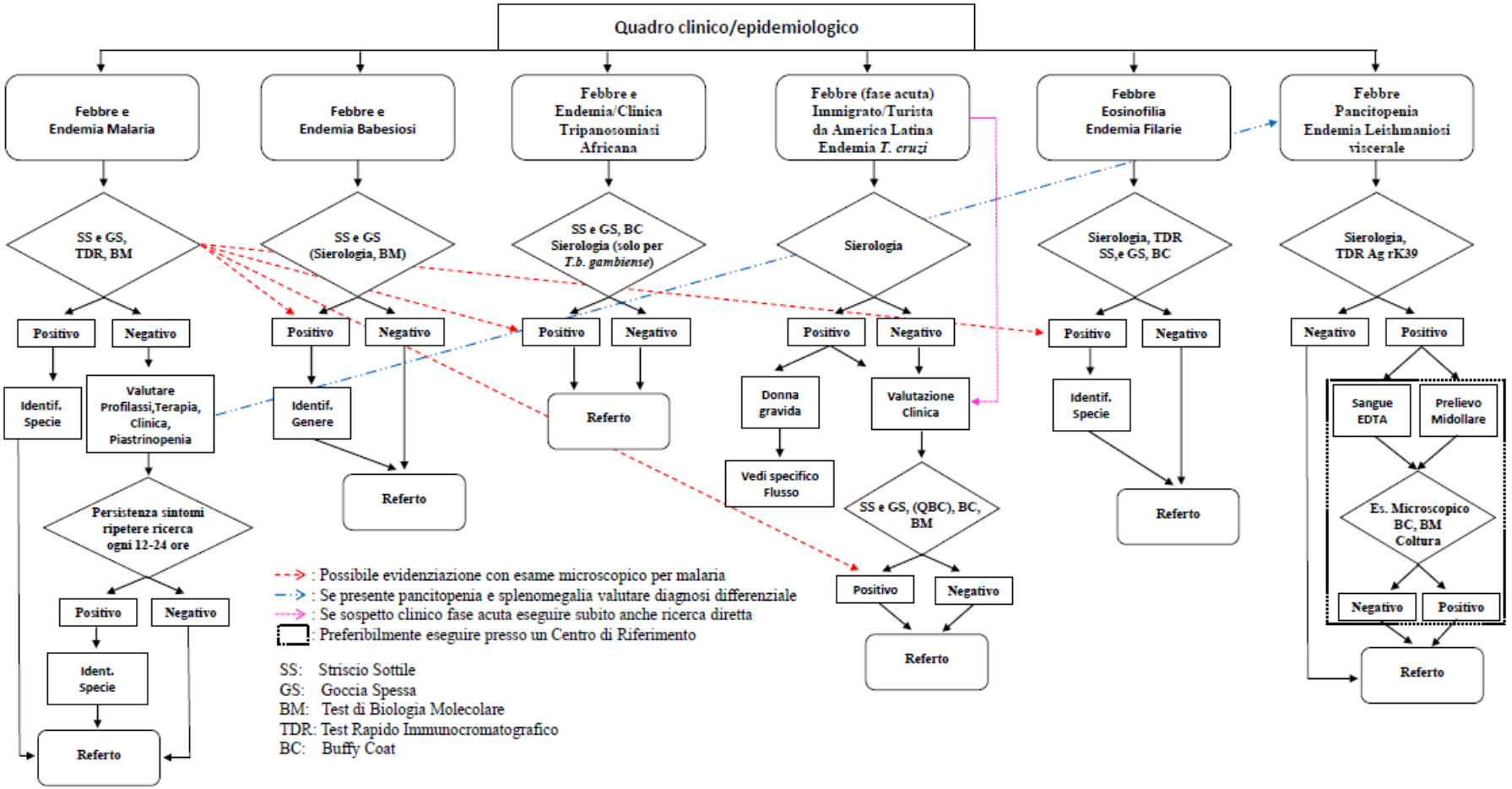
(– –)▸

Quando la ricerca di plasmodi è negativa, ma il paziente è sintomatico e presenta pancitopenia e/o splenomegalia deve essere anche considerata la diagnosi differenziale tra malaria e leishmaniosi viscerale (freccia tratteggiata azzurra).

La freccia tratteggiata color lilla ( ) indica che in caso di sospetto di infezione acuta da *T. cruzi* in prima istanza va eseguita la ricerca diretta (vedi lo specifico algoritmo in figura 24 a pag. 61).

Il riquadro tratteggiato ( ) indica che nella leishmaniosi viscerale la ricerca diretta è preferibile sia eseguita presso laboratori specializzati e/o centri di riferimento.

Figura 38. Quadro riepilogativo delle parassitosi ematiche

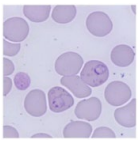


8. APPENDICE A

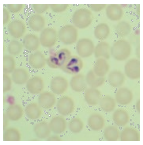
CICLI VITALI DEI PARASSITI EMATICI E DEL SRE

I cicli vitali sono tratti da: *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). I testi delle descrizioni sono, oltre che tradotti, parzialmente modificati.

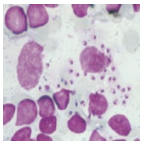
1. ***Plasmodium* spp.**



2. ***Babesia* spp.**

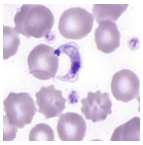


3. ***Leishmania* spp.**



4. ***Trypanosoma brucei gambiense/rhodesiense***

5. ***Trypanosoma cruzi***

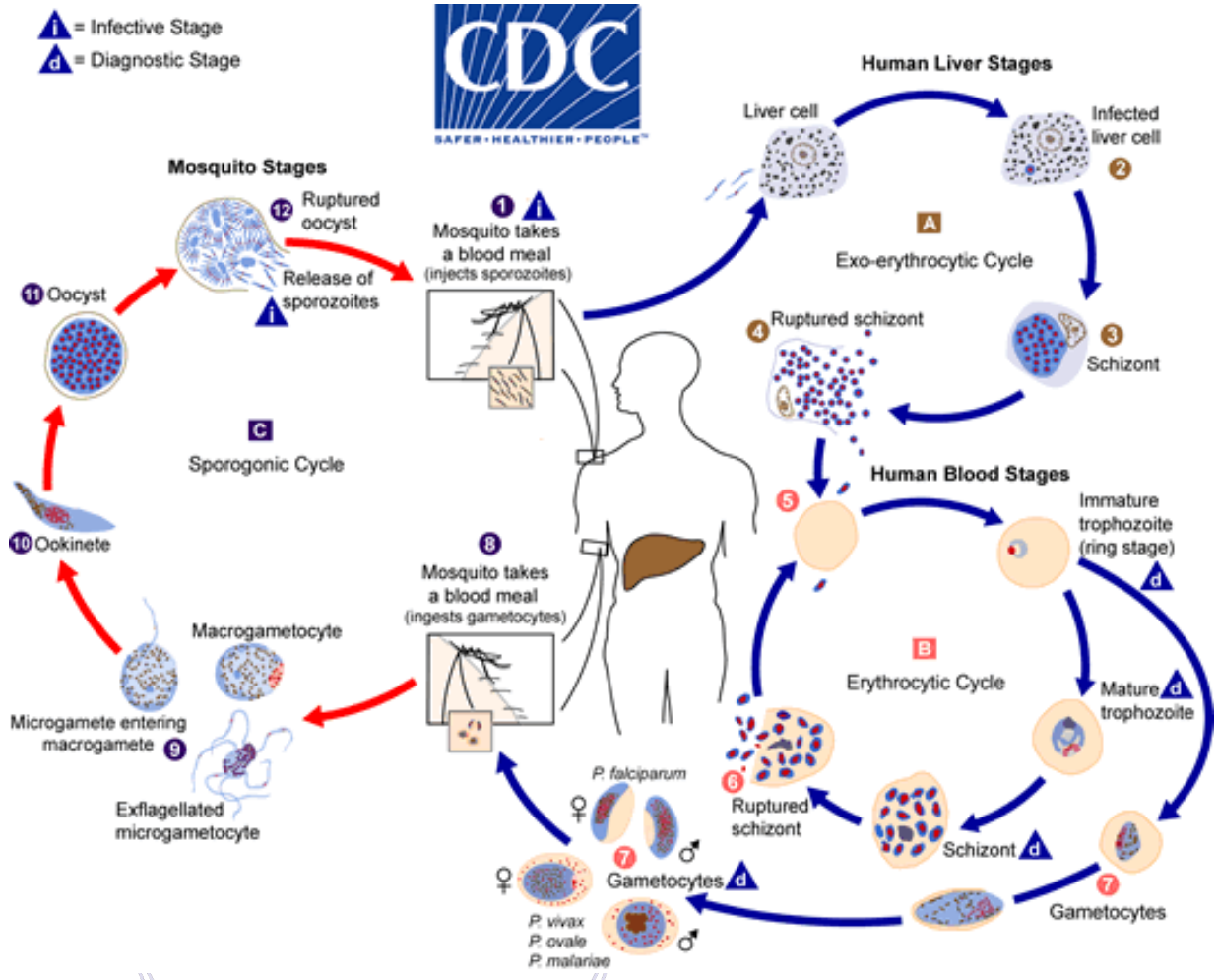


6. **Filarie linfatiche**

7. ***Loa loa***

8. ***Mansonella* spp.**

1 – *Plasmodium* spp.



Il ciclo vitale della malaria coinvolge due ospiti: l'essere umano (ospite intermedio) e la femmina di zanzare *Anopheles* (ospite definitivo).

Durante il pasto ematico ❶ una femmina infetta di zanzara inocula gli sporozoiti nell'ospite umano.

A Ciclo schizogonico eso-eritrocitario (nell'essere umano).

Gli sporozoiti raggiungono rapidamente il fegato e infettano gli epatociti ❷ ove nel giro di 7-21 giorni (periodo di incubazione) si moltiplicano e maturano formando gli schizonti epatici ❸ che si rompono ❹ rilasciando migliaia di merozoiti che invadono il circolo ematico.

In ***P. vivax*** e ***P. ovale*** alcuni sporozoiti non si trasformano immediatamente in schizonti, ma rimangono in uno stato "dormiente" (ipnozoiti) prima di riprendere il ciclo formando schizonti. Sono la causa delle recidive a distanza di settimane o mesi dall'infezione.

B Ciclo schizogonico eritrocitario (nell'essere umano).

Nel circolo ematico i merozoiti infettano le emazie ❺. I trofozoiti a forma di anello maturano e si moltiplicano formando gli schizonti, che si rompono con la liberazione dei merozoiti ❻ che invadono nuove emazie. Il ciclo eritrocitario dura 24 ore per *P. knowlesi*, 48 ore per *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 ore per *P. malariae*.

Dopo diversi cicli alcuni parassiti si differenziano nelle forme sessuali, i gametociti ❼. Il ciclo eritrocitario è il responsabile delle manifestazioni cliniche.

I gametociti maschili (microgametociti) e femminili (macrogametociti) sono ingeriti dalla zanzara durante il pasto ematico ❽.

C Ciclo sporogonio (nella zanzara).

Nello stomaco della zanzara i gametociti maturano a gameti. I microgameti exflagellano e fecondano i macrogameti formando lo zigote ❾. Gli zigoti a loro volta diventano mobili e allungati (oocineti) ❿. Penetrano nella parete dello stomaco sviluppandosi in oocisti ⓫. L'oocisti cresce, si rompe e libera gli sporozoiti di forma allungata che raggiungono le ghiandole salivari della zanzara ⓬. L'inoculazione degli sporozoiti in un nuovo essere umano ❶ perpetua il ciclo vitale della malaria.

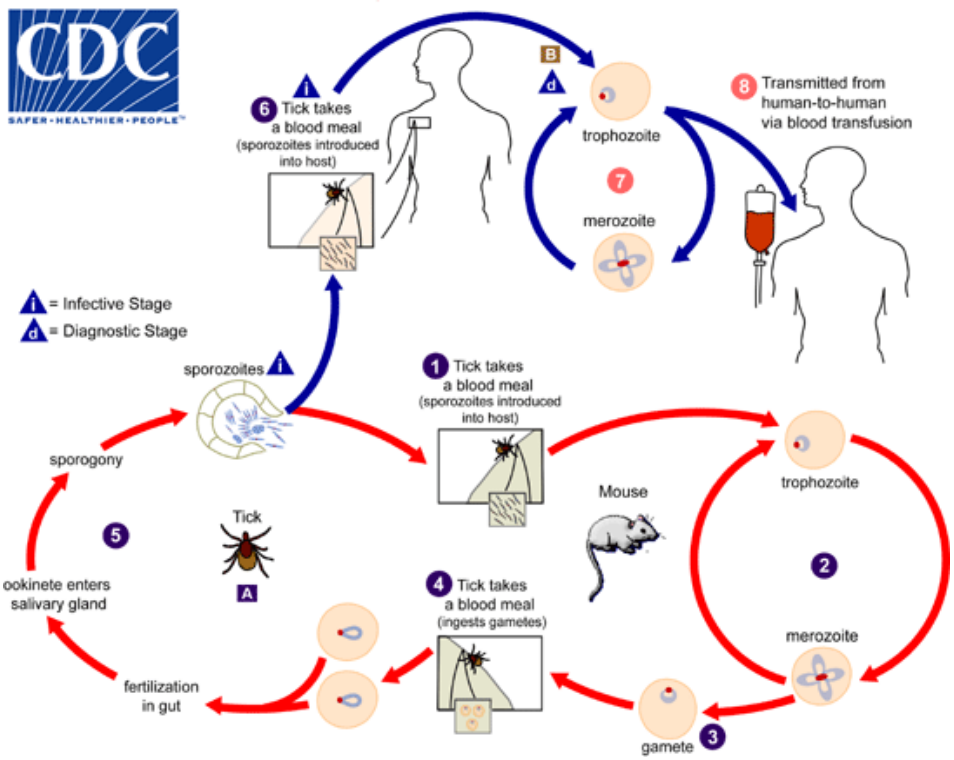
La durata del ciclo sporogonio varia in funzione della specie di *Anopheles*, della temperatura e dell'umidità ambientale, ma in generale è di 8-16 giorni.

[Torna a elenco Cicli vitali]

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

2 – *Babesia* spp.

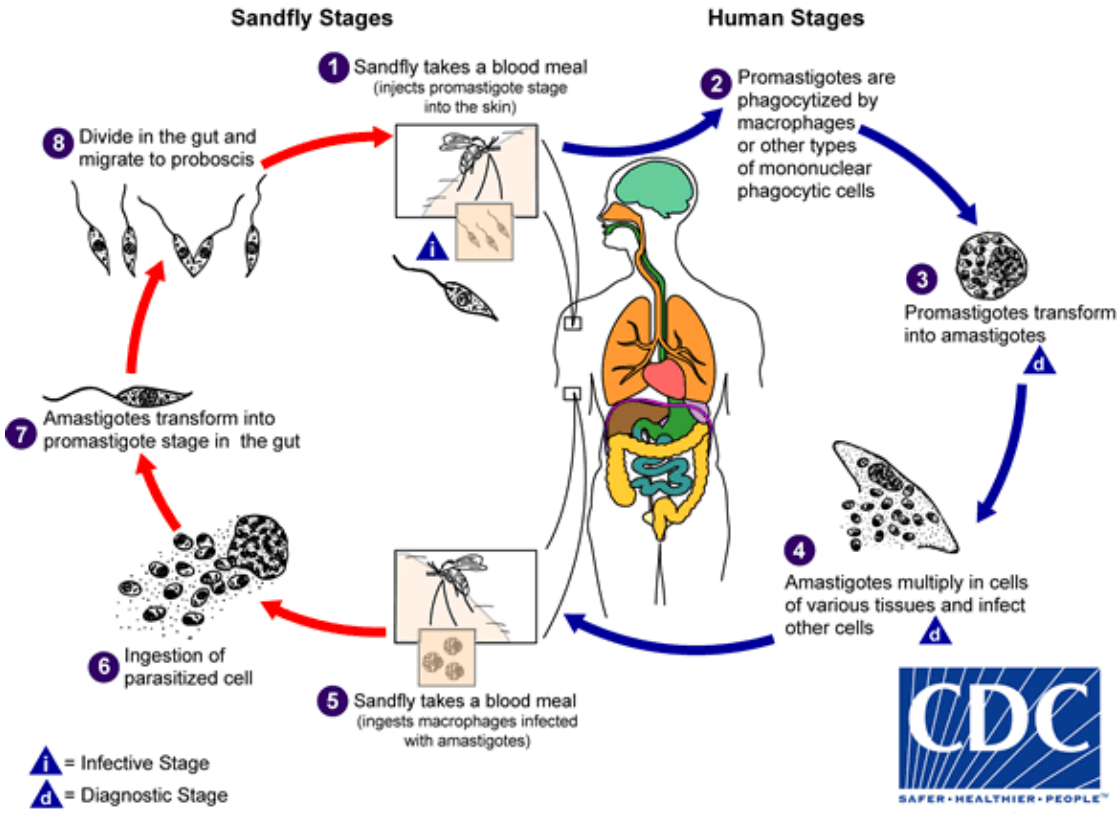
Il ciclo illustrato in figura fa riferimento al ciclo vitale di *Babesia microti* il cui naturale ospite intermedio è rappresentato da roditori. È applicabile a tutte le altre babesie che hanno ospiti intermedi diversi (bovini, cavalli, cani, gatti, cervi ecc.).



Il ciclo vitale della babesiosi coinvolge due ospiti: vertebrati (ospiti intermedi) e zecche (ospiti definitivi).
Durante il pasto ematico ❶ la zecca infetta inocula gli sporozoiti nell'animale.
Gli sporozoiti entrano nelle emazie ❷ ove si moltiplicano asessualmente per gemmazione dando origine ai merozoiti che lisano la cellula ospite. I merozoiti liberatisi vanno, successivamente, ad invadere altre emazie. Alcuni parassiti si differenziano in gameti maschili e femminili ❸ che microscopicamente non sono distinguibili dai trofozoiti. Per *Babesia* non esiste uno stadio pre-eritrocitario.
La zecca si infetta ingerendo i gameti ❹. I gameti si uniscono e con un ciclo sporogonico ❺ simile a quello della malaria si formano gli sporozoiti nelle ghiandole salivari della zecca.
Nelle zecche [A] è stata documentata anche la trasmissione transovarica (trasmissione verticale o ereditaria).
L'essere umano entra nel ciclo quando viene accidentalmente morso da una zecca infetta ❻.
Gli sporozoiti inoculati [B] penetrano nelle emazie ove si moltiplicano asessualmente per gemmazione ❼ La moltiplicazione nel sangue dei parassiti è responsabile delle manifestazioni cliniche della babesiosi.
Gli esseri umani sono, a tutti gli effetti pratici, "ospiti senza uscita" in quanto la probabilità che si verifichi la trasmissione alla zecca che si nutre di sangue di una persona infetta sono infinitesimali. Tuttavia, è noto che la trasmissione da uomo a uomo può avvenire attraverso trasfusioni di sangue ❽.

[Torna a elenco Cicli vitali]

3 – *Leishmania* spp.



La leishmaniosi è trasmessa dal morso di una femmina infetta di flebotomo.

Durante il pasto ematico❶ la femmina infetta di flebotomo inocula i promastigoti (forme flagellate) nell'ospite umano.

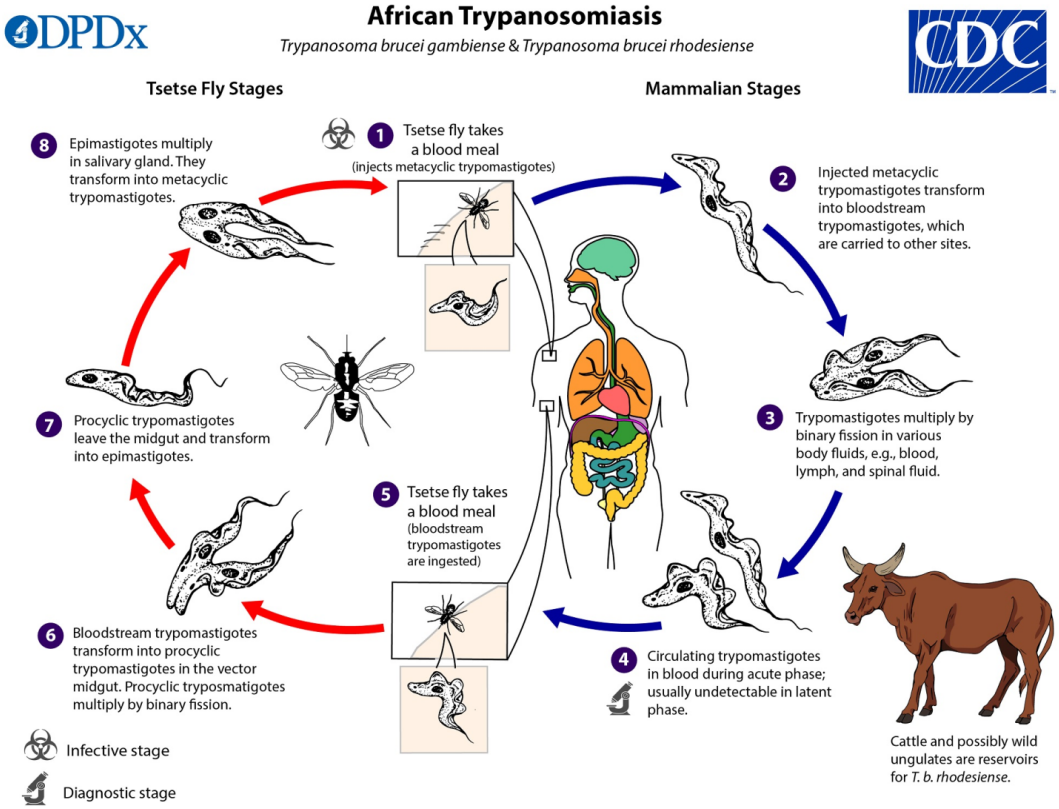
I promastigoti presenti nella ferita della puntura sono fagocitati dai macrofagi❷ e da altri tipi di cellule fagocitarie mononucleari. All'interno delle cellule i promastigoti si trasformano in amastigoti❸, lo stadio tissutale aflagellato del parassita. Gli amastigoti si moltiplicano per divisione binaria e infettano altre cellule fagocitarie❹.

Diversi fattori tra cui la specie di *Leishmania*, lo stato immunitario dell'ospite e altri ancora determinano se l'infezione sia asintomatica o sintomatica e in questo caso se sfoci in una forma viscerale o cutanea o muco-cutanea.

Il flebotomo femmina si infetta ingerendo, durante il pasto ematico, le cellule fagocitarie infette❺,❻. Nell'intestino dei flebotomi gli amastigoti si trasformano in promastigoti❼ che si moltiplicano e migrano a livello della proboscide. Con un nuovo pasto ematico il ciclo si perpetua❶.

[Torna a elenco Cicli vitali]

4 – *Trypanosoma brucei gambiense/rhosesiense*



Ente del Terzo Settore

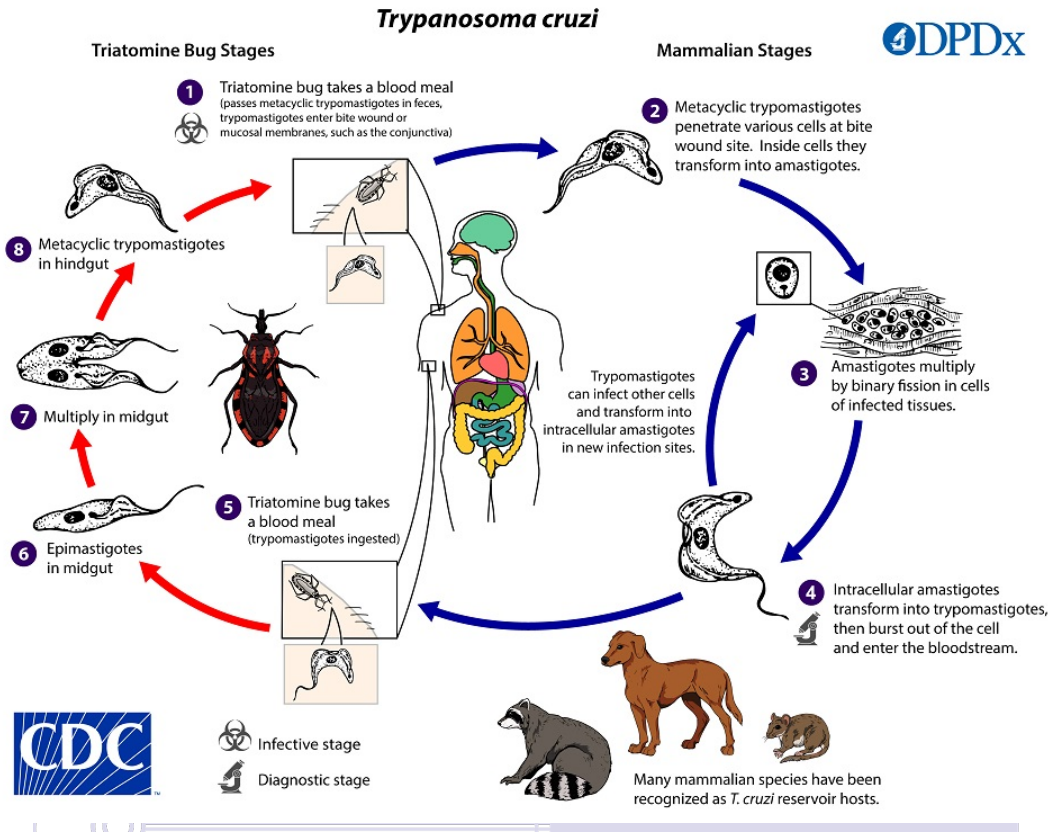
Durante il pasto ematico ❶ su un ospite (uomo o altro mammifero per *T. b. rhodesiense*) la *Glossina* inietta i tripomastigoti metaciclici nel tessuto cutaneo. I parassiti entrano nel sistema linfatico e passano nel circolo sanguigno. Nell'ospite si trasformano in tripomastigoti ematici ❷ e sono trasportati in altri siti raggiungendo altri liquidi corporei quali linfa e liquor ove continuano a moltiplicarsi per fissione binaria ❸. L'intero ciclo dei tripanosomi africani è extracellulare.

I tripomastigoti circolanti ❹ vengono ingeriti da una *Glossina* durante il pasto ematico ❺ su un ospite infetto. Nell'intestino medio della mosca il parassita si trasforma in tripomastigote prociclico ❻, si moltiplica per fissione binaria, lascia l'intestino e si trasforma in epimastigote ❼. L'epimastigote raggiunge le ghiandole salivari dell'insetto ove continua a moltiplicarsi per fissione binaria ❽ e si trasforma in tripomastigote metaciclico. Con un nuovo pasto ematico il ciclo si perpetua ❶.

L'intero ciclo nella *Glossina* dura circa tre settimane. Per *T. b. gambiense* è anche possibile la trasmissione congenita nella mosca se questa si infetta durante la gravidanza.

[Torna a elenco Cicli vitali]

5 – *Trypanosoma cruzi*



Una triatomina infetta assume il pasto ematico ❶ e rilascia con le feci i tripomastigoti metaciclici nel sito del morso. Questi penetrano nell'ospite attraverso la ferita del morso o attraverso membrane mucose intatte come ad esempio la congiuntiva.

Nell'ospite i tripomastigoti metaciclici invadono le cellule vicine al sito di inoculo dove si trasformano in amastigoti ❷. Gli amastigoti si moltiplicano per fissione binaria ❸ e si differenziano in tripomastigoti che vengono rilasciati nel circolo ematico come tripomastigoti ematici ❹. I tripomastigoti infettano cellule di vari tessuti trasformandosi in amastigoti intracellulari nei nuovi siti di infezione.

A differenza di quanto avviene per i tripanosomi africani, questi tripomastigoti non si moltiplicano nel sangue; la moltiplicazione avviene solo quando i parassiti entrano in nuove cellule o sono ingeriti da un vettore idoneo.

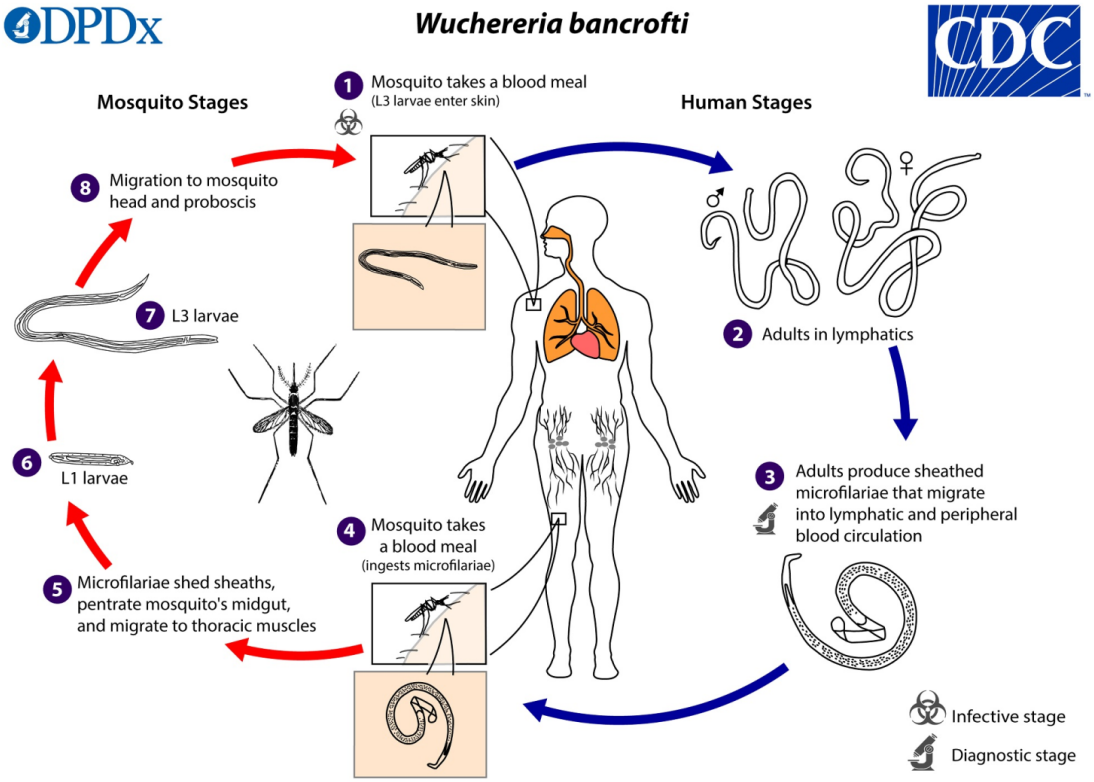
La triatomina si infetta nutrendosi di sangue umano o di altro mammifero che contiene i parassiti circolanti ❺. Nell'intestino medio dell'insetto vettore ❻ i tripomastigoti si trasformano in epimastigoti e si moltiplicano per fissione binaria ❼. Passati nella parte terminale dell'intestino gli epimastigoti si differenziano in tripomastigoti metaciclici, la forma infettante per il mammifero.

Altre vie meno comuni di trasmissione nell'essere umano includono: trasfusioni ematiche, trapianto di organi, trasmissione transplacentare e trasmissione alimentare via cibi o bevande contaminate con il vettore e/o le sue feci.

[Torna a elenco Cicli vitali]

6 – Filarie linfatiche

Il ciclo illustrato in figura fa riferimento al ciclo vitale di *Wuchereria bancrofti.* I cicli di *Brugia malayi* e *Brugia timori* sono del tutto sovrapponibili. Variano oltre che i generi e le specie di zanzare vettrici, che possono essere diverse nelle varie zone di endemia, le dimensioni delle filarie adulte e delle microfilarie ematiche, più grandi in *W. bancrofti*, minori in *Brugia* spp.



Il ciclo vitale delle filarie linfatiche coinvolge due ospiti: l'essere umano (ospite definitivo) e la femmina di zanzare di vari generi (ospite intermedio). I generi di zanzare più comunemente implicati sono *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* e *Mansonia*.

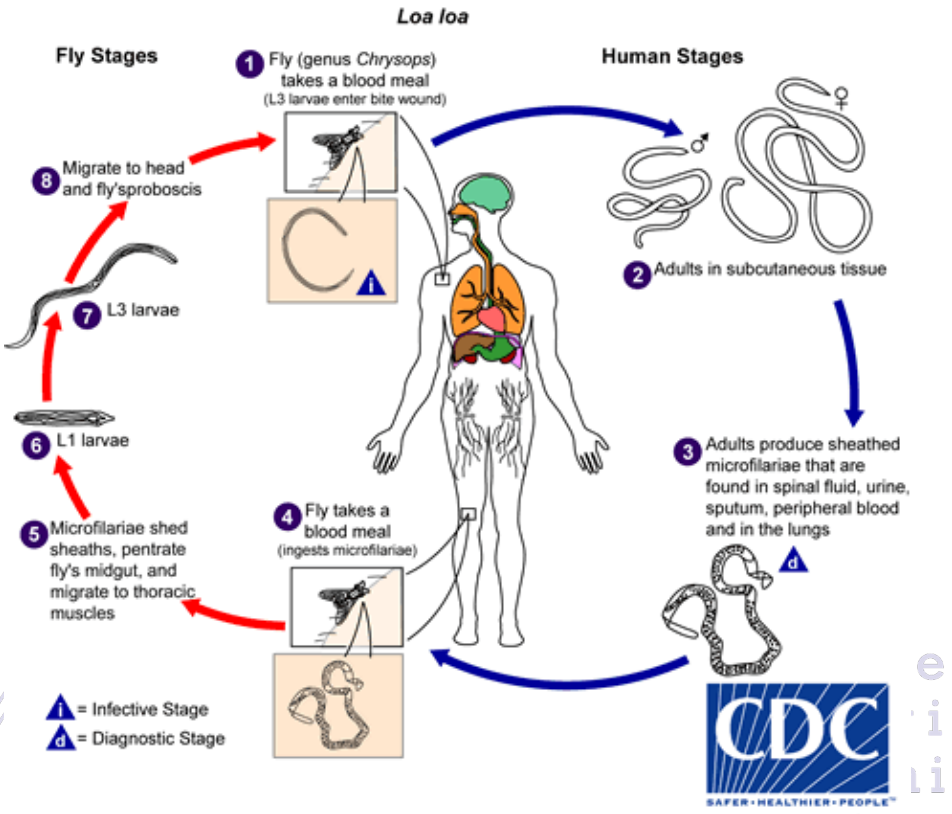
Durante il pasto ematico ❶ una femmina infetta di zanzara rilascia sulla pelle dell'ospite umano le larve L3 della filaria che penetrano attivamente attraverso la ferita del morso. Le larve migrano nei vasi e gangli linfatici ove maturano e si sviluppano in vermi adulti femmine e maschi ❷. Dopo alcuni mesi, da 6 a 12 (periodo di prepatenza), le femmine cominciano a produrre microfilarie munite di guaina ❸ che si riversano nel circolo ematico. Le microfilarie hanno periodicità in genere notturna e nel periodo in cui non sono in circolo rimangono confinate nelle arteriole polmonari.

La zanzara si infetta ingerendo le microfilarie durante il pasto ematico ❹. Dopo l'ingestione le microfilarie raggiungono l'intestino medio dove perdono la guaina ❺ e migrano poi nei muscoli toracici della zanzara. Qui mutano in larve L1 ❻ e quindi L2 e L3 ❼ (stadio infettante per l'essere umano). Le larve L3 migrano attraverso l'emocele e vanno a localizzarsi nella proboscide ❽ dell'insetto.

Con l'ingestione di un pasto ematico ❶ la zanzara può infettare un altro essere umano e perpetuare il ciclo.

[Torna a elenco Cicli vitali]

7 – *Loa loa*



Il vettore della *Loa loa* è un tafano del genere *Chrysops*.

Durante il pasto ematico ❶ il tafano infetto rilascia sulla pelle dell'ospite umano le larve L3 della filaria che penetrano attivamente attraverso la ferita del morso.

Le larve si sviluppano in adulti femmine e maschi che usualmente vivono nei tessuti sottocutanei ❷.

Dopo alcuni mesi, da 6 a 12 (periodo di prepatenza), le femmine cominciano a produrre microfilarie munite di guaina ❸ che si riversano nel circolo ematico. Le microfilarie hanno periodicità diurna e nel periodo in cui non sono in circolo rimangono confinate nelle arteriole polmonari. Possono essere trovate anche nel liquor, urine e espettorato.

Il tafano si infetta ingerendo le microfilarie durante il pasto ematico ❹. Dopo l'ingestione le microfilarie raggiungono l'intestino medio dove perdono la guaina ❺ e migrano poi nei muscoli toracici del tafano.

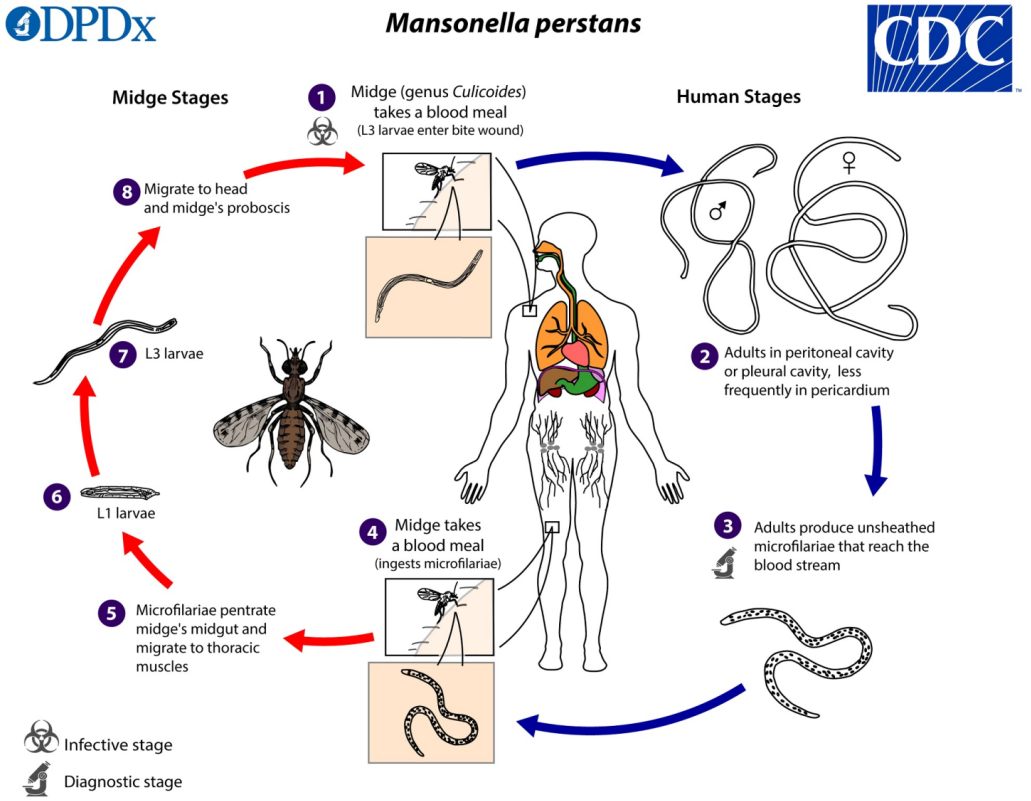
Qui mutano in larve L1 ❻ e quindi L2 e L3 ❼ (stadio infettante per l'essere umano). Le larve L3 migrano attraverso l'emocele e vanno a localizzarsi nella proboscide ❽ dell'insetto.

Con l'ingestione di un pasto ematico ❶ il tafano può infettare un altro essere umano e perpetuare il ciclo.

[Torna a elenco Cicli vitali]

8 – *Mansonella* spp.

Il ciclo illustrato in figura fa riferimento al ciclo vitale di *Mansonella perstans.* Il ciclo di *Mansonella ozzardi* è del tutto sovrapponibile. Variano, oltre che la distribuzione geografica (*M. perstans* è presente in Africa e Sud America, *M. ozzardi* solo in Sud America), i tipi di vettore (*M. perstans* ha come vettori solo moscerini del genere *Culicoides*, mentre *M. ozzardi* anche mosche nere del genere *Simulium*).



Durante il pasto ematico ❶ l'insetto vettore infetto rilascia sulla pelle dell'ospite umano le larve L3 della filaria che penetrano attivamente attraverso la ferita del morso.
Le larve si sviluppano in adulti femmine e maschi che vivono nelle cavità corporee ❷. Principalmente nelle cavità peritoneale e pleurica e meno frequentemente nel pericardio e nei tessuti sottocutanei (*M. perstans*). Principalmente nel mesentere, nelle cavità peritoneale e toracica e meno frequentemente nei tessuti sottocutanei (*M. ozzardi*).
Gli adulti producono microfilarie senza guaina ❸ che si riversano nel circolo ematico. Le microfilarie sono aperiodiche.
L'insetto si infetta ingerendo le microfilarie durante il pasto ematico ❹. Dopo l'ingestione le microfilarie raggiungono l'intestino medio ❺ e migrano poi nei muscoli toracici dell'insetto.
Qui mutano in larve L1 ❻ e quindi L2 e L3 ❼ (stadio infettante per l'essere umano). Le larve L3 migrano attraverso l'emocele e vanno a localizzarsi nella proboscide ❽.
Con l'ingestione di un pasto ematico ❶ l'insetto può infettare un altro essere umano e perpetuare il ciclo.

[Torna a elenco Cicli vitali]

9. APPENDICE B

IMMAGINI DEI VARI STADI DI SVILUPPO DEI PLASMODI UMANI

Nelle pagine che seguono sono riportate immagini fotografiche, in totale circa 50, che illustrano i vari stadi di sviluppo dei plasmodi umani (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*), sia nello striscio sottile, sia nella goccia spessa (non per *P.knowlesi*). Sono state scelte le immagini che si ritiene siano tra le più significative per ciascuna specie.

Come sottolineato nella parte "Tecniche diagnostiche" del capitolo "Malaria", la goccia spessa è almeno 10 volte più sensibile dello striscio sottile, è quindi indispensabile esaminare questo tipo di preparato per poter effettuare diagnosi in caso di infezioni con una carica parassitaria bassa, compresa tra 10 e 100 parassiti/µL (parassitemia tra 0,0002% e 0,002%).

Purtroppo una identificazione certa di specie per mezzo della goccia spessa è il più delle volte molto difficile se non, a volte, impossibile.

Alcuni casi in cui è possibile con una discreta sicurezza una diagnosi di specie per mezzo della goccia spessa sono:

- presenza unicamente di numerosi trofozoiti ad anello piccoli e sottili con una o due masse cromatiniche (*P. falciparum*);
- presenza di gametociti a forma di "banana" o di "falce" (*P. falciparum*);
- presenza di forme in vari stadi di sviluppo tra cui diversi schizonti a "rosetta" (*P. malariae*).

In pratica, in tutti gli altri casi è necessario effettuare la speciazione per mezzo dello striscio sottile.

Nella realtà quotidiana anche esaminando lo striscio sottile, a volte può essere non facile distinguere tra di loro le varie specie; ad esempio:

- in una fase iniziale della malattia quando sono presenti nel sangue periferico solo rari trofozoiti ad anello e non vi sono altre caratteristiche che possano indirizzare verso una diagnosi certa (poliparassitismo, presenza di granulazioni, differenza nelle dimensioni delle emazie ecc.);
- nel caso di presenza di trofozoiti di *P. knowlesi* che possono essere confusi con quelli di *P. falciparum* o di *P. malariae*;
- nel caso di morfologia alterata a causa di una troppo lunga conservazione in EDTA o a seguito di profilassi/terapie non adeguate;
- nelle infezioni miste.

In quasi tutti questi casi però una ricerca approfondita e/o la ripetizione degli strisci dopo alcune ore permette, molto spesso, di trovare qualche forma specifica che indirizza verso la corretta diagnosi di specie.

Si rammenta che la diagnosi di specie è molto importante dal punto di vista clinico, sia per la prognosi, sia per la terapia. Altrettanto importante per la prognosi, come messo in rilievo nel capitolo "Malaria", è la quantificazione della carica parassitaria (parassitemia).

Altre volte è difficile distinguere all'interno di una specie tra i diversi stadi di sviluppo, in particolare può essere difficoltoso distinguere tra trofozoiti in stadio avanzato di maturazione e gametociti. Ciò, come anche la distinzione tra macrogametociti (gametociti femminili) e microgamentociti (gametociti maschili), non ha comunque alcuna importanza dal punto di vista clinico.

Oltre che alle immagini fotografiche per ciascuna specie sono riportate anche delle tavole con disegni degli stadi di sviluppo tratte da "Coatney GR *et al*. *The Primate Malarias*", per lo

striscio sottile, e da "Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*", per la goccia spessa.

Per *P. knowlesi* non è presente la tavola con disegni dalla goccia spessa.

Le tavole con i disegni dallo striscio sottile, tranne quella per *P. knowlesi*, sono reperibili anche alla pagina web:

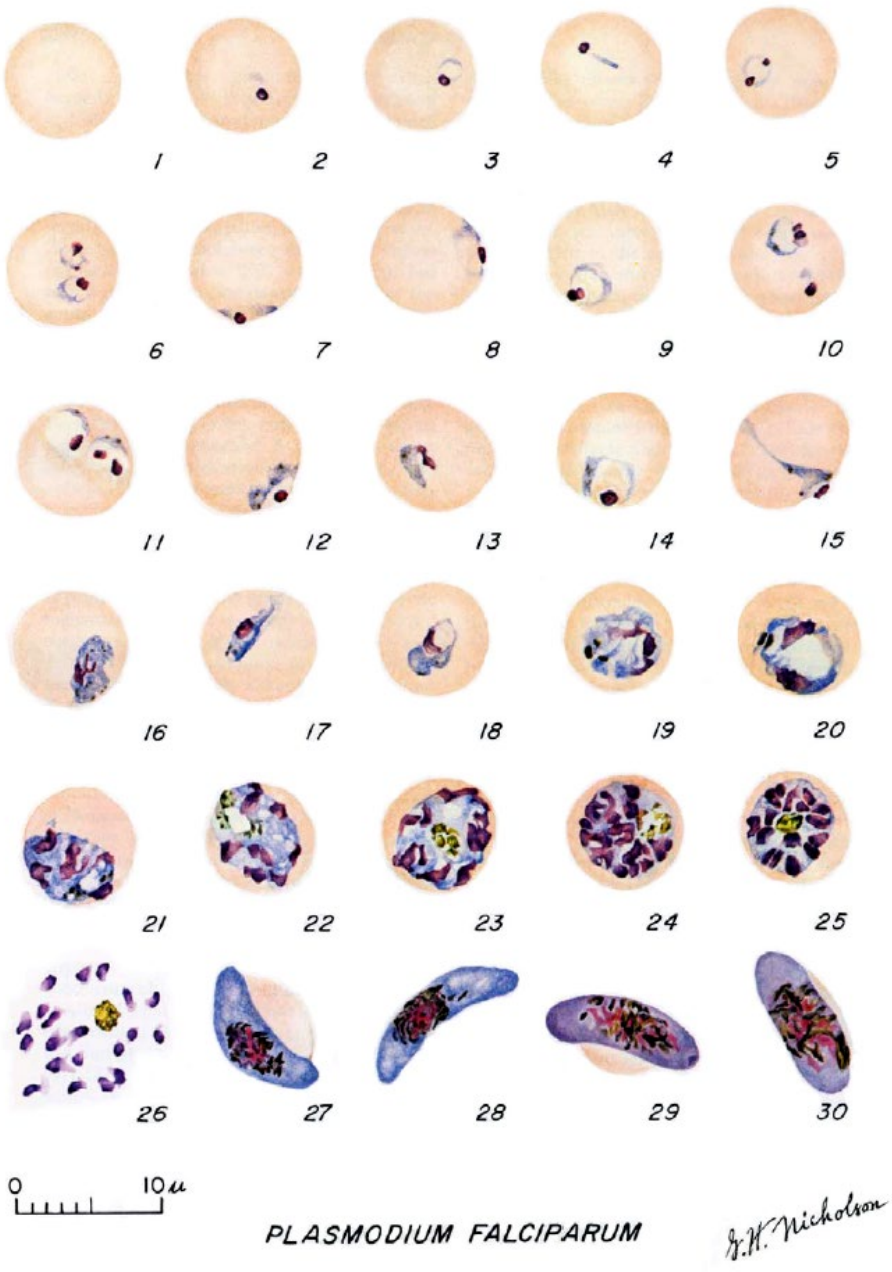
https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria_Comparison_p3-6.pdf.

Le tavole con i disegni dalla goccia spessa, tranne quella per *P. knowlesi*, sono reperibili anche alla pagina web:

https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Malaria_Comparison_p7-8.pdf.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Plasmodium falciparum
(Striscio sottile)



1: Emazia normale.
2-10: Trofozoiti giovani (forme ad anello).
11-18: Trofozoiti anziani.
19-25: Schizonti.
26: Schizonte rotto che ha liberato i merozoiti.
27-28: Macrogametociti (femminili).
29-30: Microgametociti (maschili).

Durante la schizogonia (figg. da 20 a 25), il nucleo si divide ripetutamente, il parassita aumenta di dimensioni fino a quando occupa gran parte della cellula ospite. Inizialmente il pigmento si riunisce in piccoli aggregati, poi, man mano che il trofozoite si avvicina alla maturità, si raccoglie in un'unica massa marrone-giallastra. Lo schizonte maturo è meno simmetrico di quelli di altre specie umane e il numero dei merozoiti è compreso tra 8 e 20; il numero usuale è di circa 16.

In un certo numero di emazie parassitate sono visibili macchie (*clefts*) più grossolane delle granulazioni (*dots*) presenti in *P. vivax*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (non riportate in tabella, vedi immagini fotografiche).

I gametociti maturi (figg. da 27 a 30) sono unici e tipici tra i plasmodi umani a causa della loro forma a falce o a banana.

Il macrogametocita presenta un citoplasma colorato in blu intenso. Il nucleo è compatto e può essere mascherato da granuli di pigmento che sembrano coprirlo.

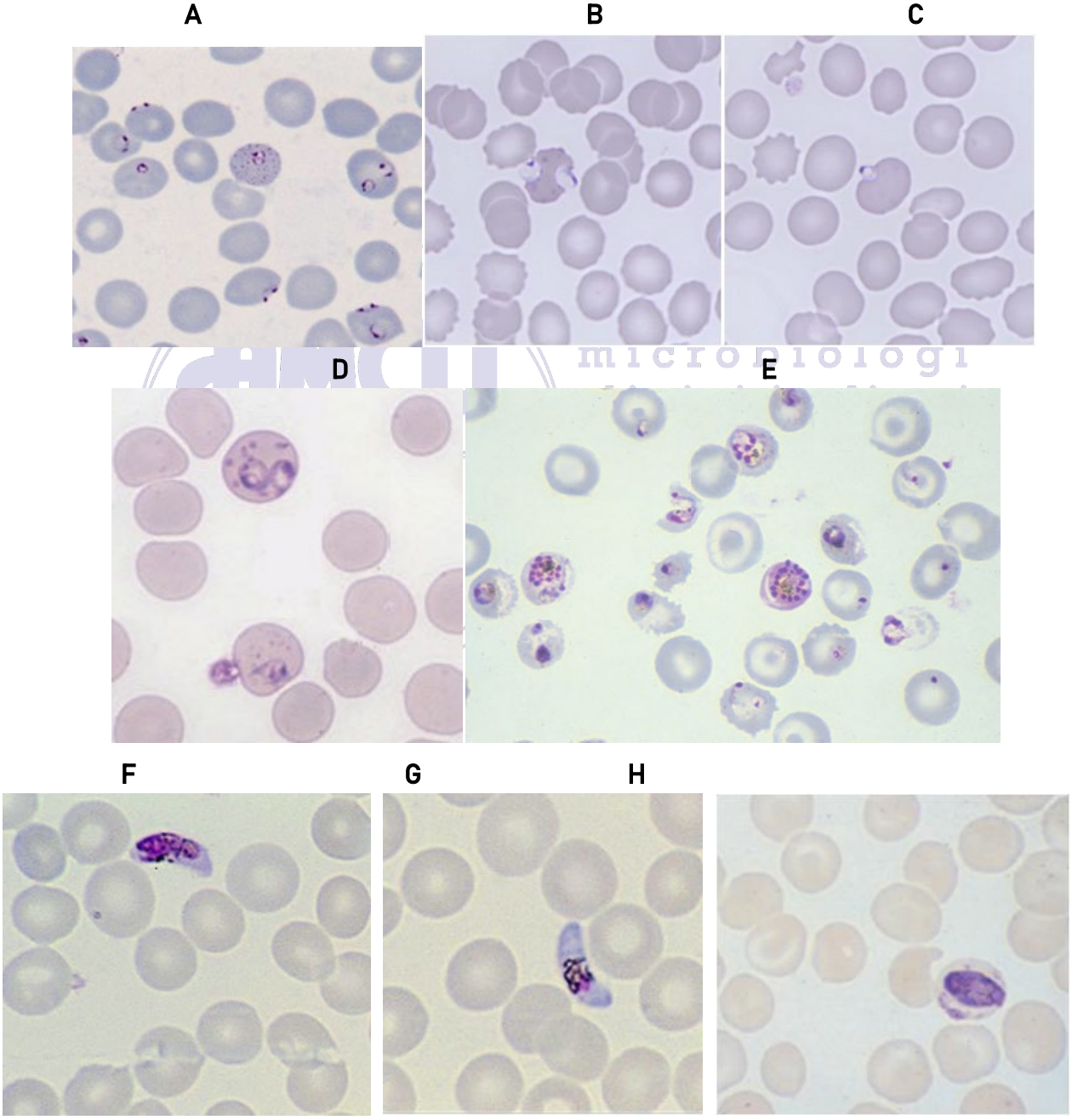
Il microgametocita ha un citoplasma colorato da azzurro a blu violaceo. Il nucleo occupa circa la metà della lunghezza totale del parassita. È diffuso e generalmente può mostrare alcuni punti rosso scuro sparsi in una zona di colore rosa pallido.

In alcuni casi i gametociti possono essere ovalari o arrotondati (vedi immagini fotografiche e disegni goccia spessa).

Da: Coatney GR *et al*. *The Primate Malarias*. 1971 [Versione digitale: CDC 2003] (modificato)

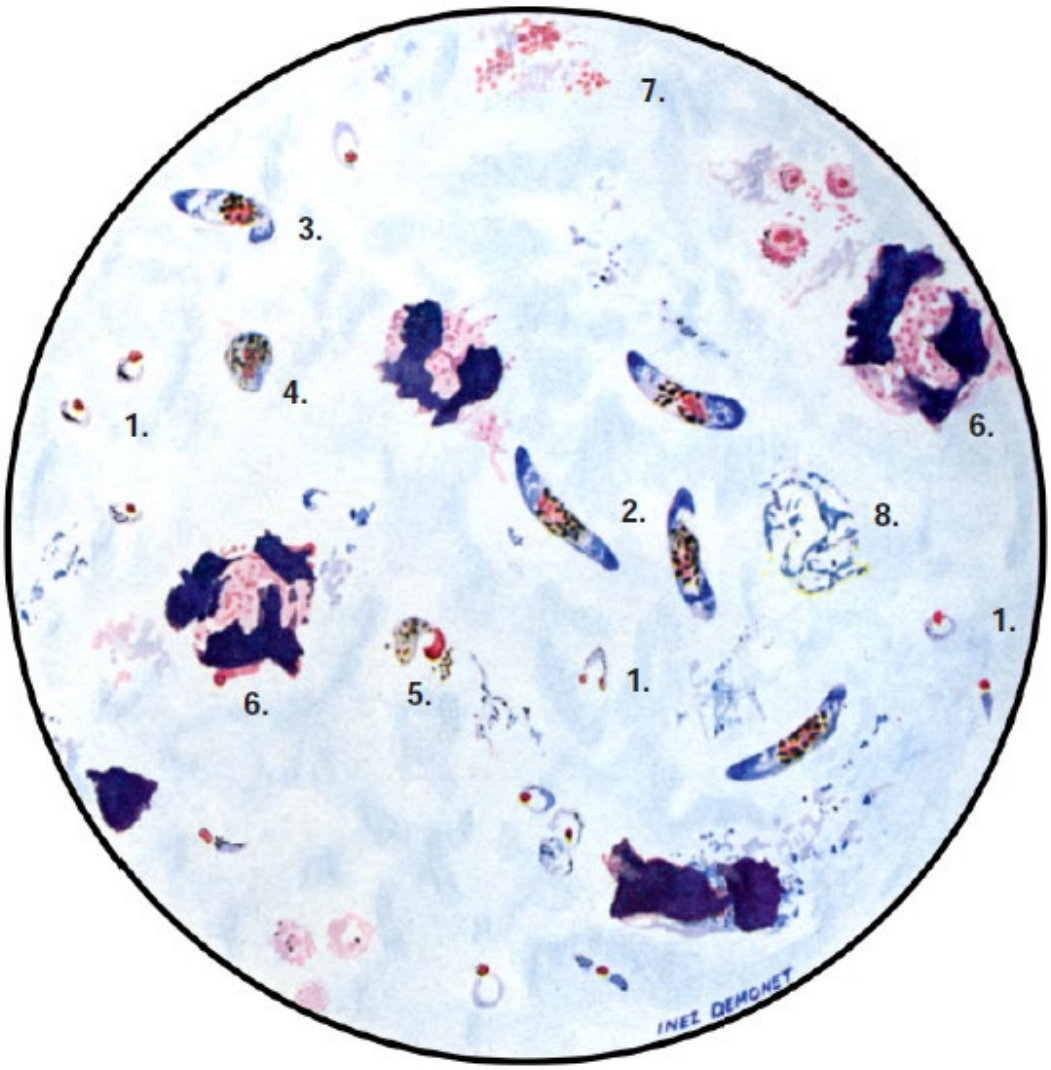
Plasmodium falciparum
(Striscio sottile)

- **Immagine A**. Trofozoiti giovani ad anello. Sono presenti emazie poliparassitate, alcuni trofozoiti con 2 masse cromatiniche, forme marginali e appiattite; una emazia con macchie (*clefts*) di Maurer. Le emazie parassitate hanno una grandezza normale.
- **Immagini B e C**. Alcuni trofozoiti sembrano uscire dal bordo dell'emazia (forme tipiche).
- **Immagine D**. Trofozoiti più "anziani", gli anelli sono più grandi. Macchie (*clefts*) di Maurer.
- **Immegine E**. Schizonti e trofozoiti (forma perniciosa).
- **Immagini F, G, H**. Gametociti. Talvolta possono assumere forma ovale o rotonda.



Le immagini E e H sono tratte da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001

Plasmodium falciparum
(Goccia spessa)

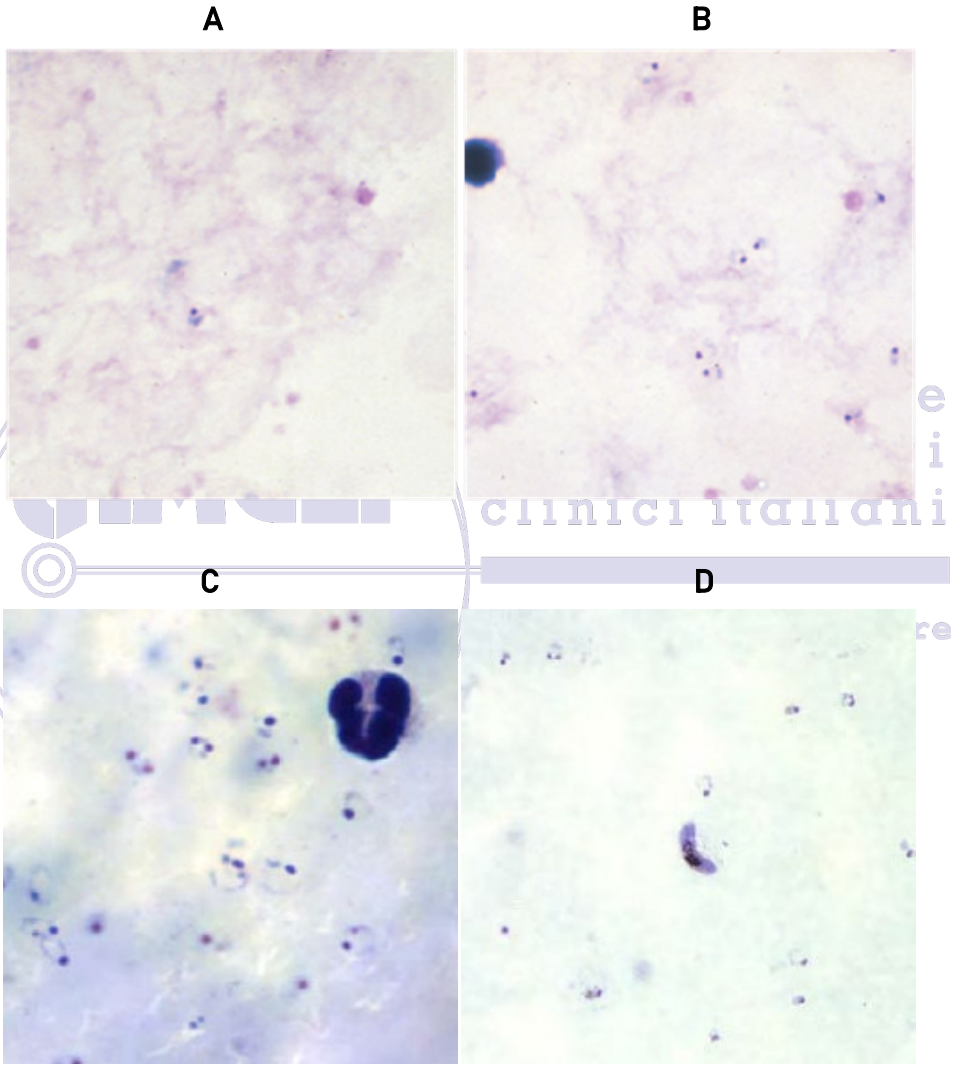


1) Trofozoiti ad anello.
2) Gametociti.
3) Gametocita distorto.
4) Gametocita arrotondato.
5) Gametocita disintegrato.
6) Nuclei di leucociti.
7) Piastrine.
8) Resti di un'emazia.

Da: Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*. 1960

Plasmodium falciparum
(Goccia spessa)

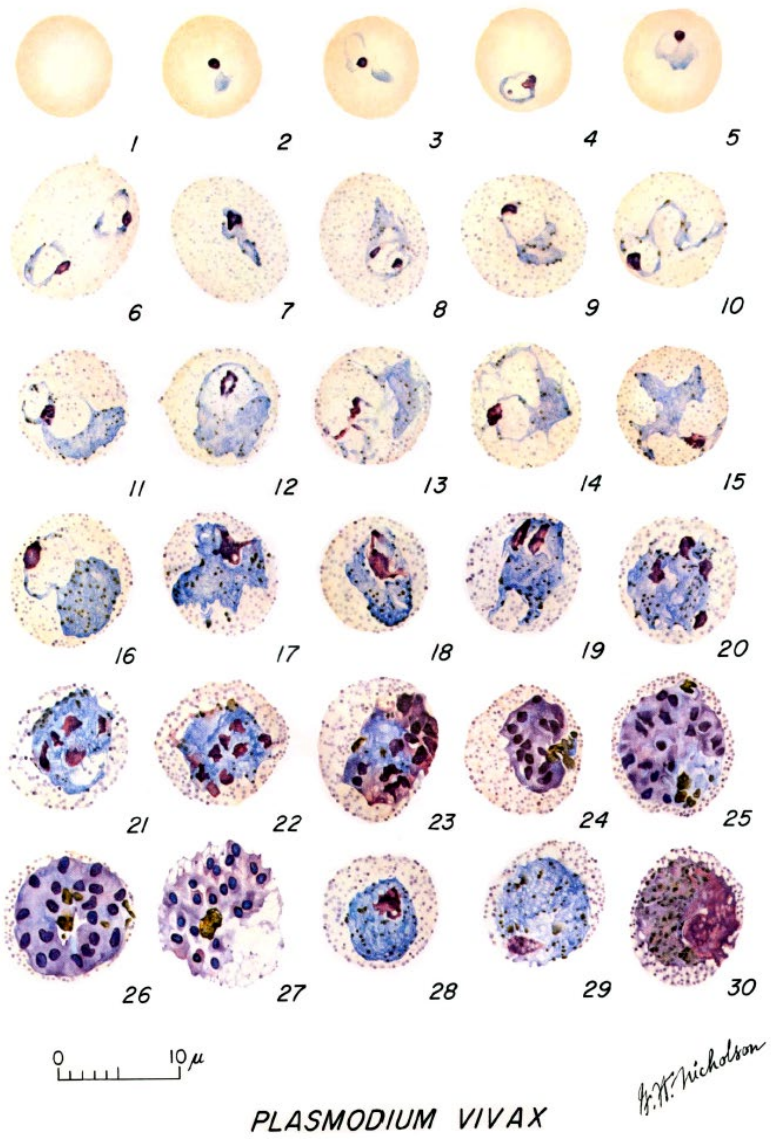
- **Immagini A e B**. Trofozoiti giovani ad anello.
- **Immagine C**. Trofozoiti ad anello più "anziani". Diversi trofozoiti hanno due masse cromatiniche (forme a "cornetta del telefono").
- **Immagine D**. Gametocita. Presenza di numerosi trofozoiti.



Le immagini A e B sono tratte da: Petithory JC *et al. Parasites Sanguin*s. 2001

Le immagini C e D sono tratte da:
https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Pfalciparum_benchaidV2.pdf

Plasmodium vivax
(Striscio sottile)



1: Emazia normale.
2-5: Trofozoiti giovani (forme ad anello).
6-16: Trofozoiti in crescita.
17-18: Trofozoiti maturi.
19-23: Schizonti in crescita.
24-27: Schizonti quasi maturi e maturi.
28: Gametocita immaturo.
29: Macrogametocita (femminile).
30: Microgametocita (maschile).

Il merozoita entra nell'emazia, in genere in un reticolocita, dove appare con un nucleo rosso intenso e un citoplasma appena accennato (fig. 2).

Man mano che il trofozoite cresce il citoplasma si ingrandisce formando un vacuolo al suo interno (figg. da 3 a 6). Il poliparassitismo non è raro (fig. 6), sia pur in misura minore che in *P. falciparum*. L'ulteriore crescita produce un trofozoite più grande con vacuolo ben evidente e talvolta con due masse di cromatina (fig. 8).

A seguito di questo sviluppo, le emazie aumentano di dimensioni e mostrano una fine punteggiatura detta di Schüffner.

Il citoplasma del parassita è aumentato in quantità, diventa decisamente ameboide e contiene granuli molto piccoli di pigmento marrone chiaro. (figg. da 8 a 16).

Quando il trofozoite è maturo (figg. 17 e 18) il citoplasma si compatta e perde il vacuolo, il nucleo diventa più grande e può assumere forme irregolari. I granuli di pigmento e le granulazioni di Schüffner diventano più evidenti.

Alcune emazie possono assumere forme bizzarre, quadrangolari o trapezoidali (non riportate in tabella, vedi immagini fotografiche).

Durante la schizogonia (figg. da 19 a 27), il nucleo si divide producendo 2 nuclei e quindi, in successione piuttosto rapida, si verificano altre divisioni per arrivare fino a 24 merozoiti (figg. 25, 26, 27).
Con il processo di divisione nucleare si verificano anche altri cambiamenti. I granuli di pigmento si uniscono per formare grossi pezzi che poi si uniscono in un unico grumo bruno-giallastro. Lo schizonte maturo occupa per intero quasi l'intera emazia. La cellula ospite viene ingrandita e le granulazioni di Schüffner sono relegate al bordo.

I gametociti immaturi (fig. 28), sia i macrogametociti che i microgametociti sono privi di vacuolo, non sono ameboidi, hanno un citoplasma di colore blu intenso e un grande nucleo rosso. La cellula ospite allargata mostra una marcata punteggiatura di Schüffner.
Il citoplasma del macrogametocita maturo si colora di un blu più chiaro della forma in via di sviluppo, occupa la maggior parte della cellula ospite e al suo interno vi sono granuli sparsi di pigmento (fig. 29). Il nucleo, rosso, è generalmente eccentrico.

Il citoplasma del microgametocita maturo ha un colore grigio-bluastro, il nucleo è più grande di quello del macrogametocita, occupa circa la metà o più del parassita, e assume una colorazione rossastro-viola (fig. 30).

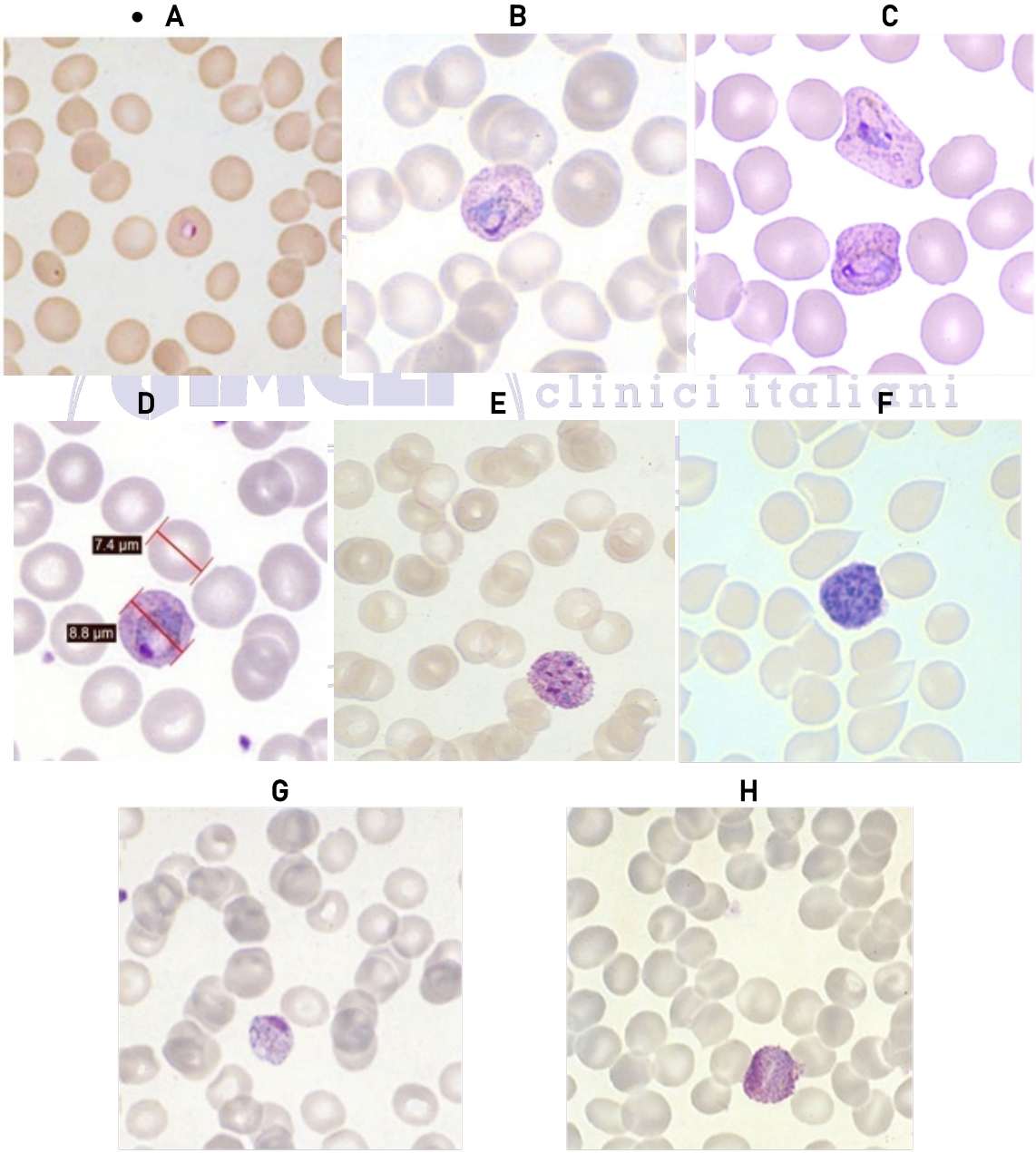
Da: Coatney GR *et al*. *The Primate Malarias*. 1971 [Versione digitale: CDC 2003] (modificato)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Plasmodium vivax

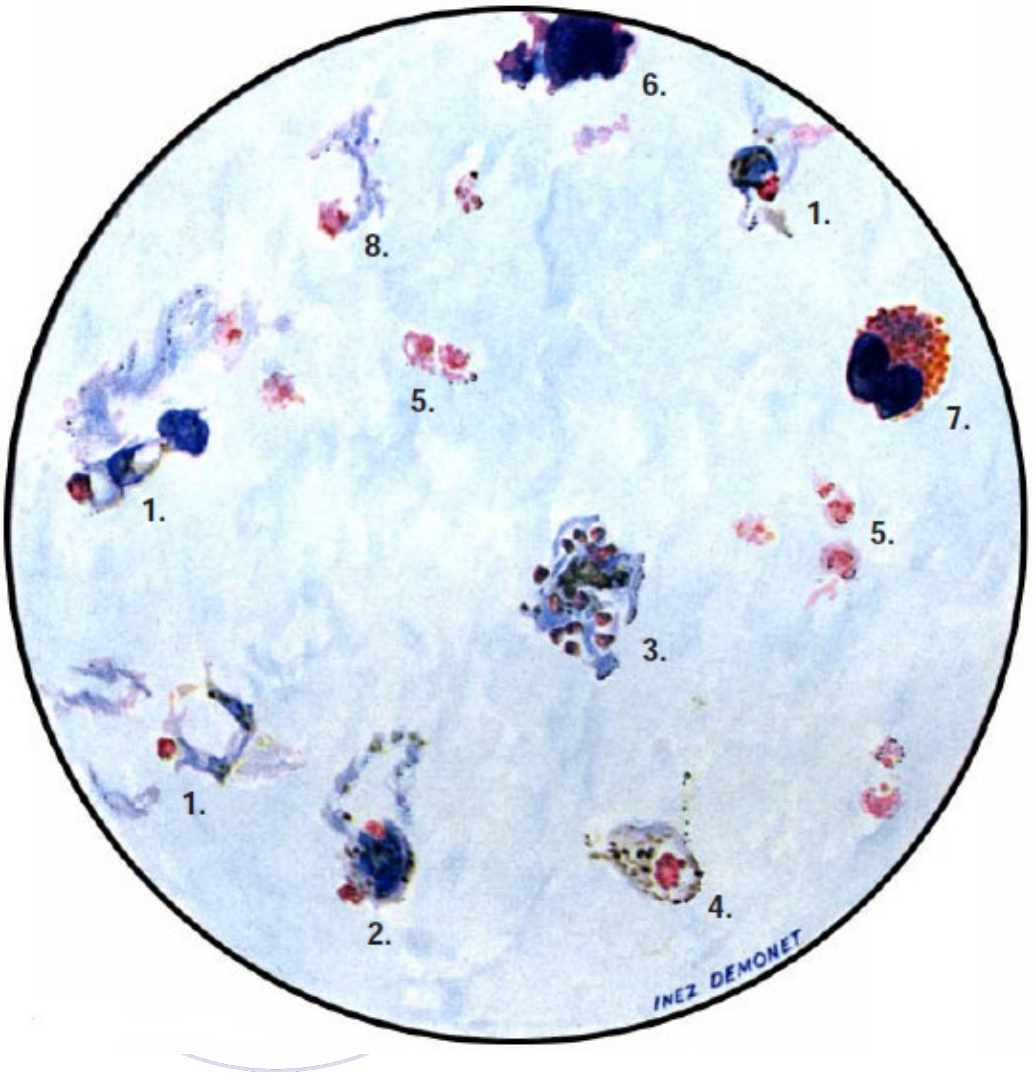
(Striscio sottile)

- **Immagine A**. Trofozoite giovane ad anello. Nelle emazie parassitate non sono ancora presenti le granulazioni (*dots*) di Schüffner.
- **Immagini B, C**. Trofozoiti più "anziani". I trofozoiti assumono forme ameboidi e nelle emazie parassitate sono presenti le granulazioni (*dots*) di Schüffner. Le emazie possono assumere una forma irregolare: quadrangolare, trapezoidale (C).
- **Immagine D**. Le emazie parassitate hanno dimensioni aumentate.
- **Immagini E e F**. Schizonti con 6 e 24 nuclei (merozoiti). Riempiono completamente, o quasi, le emazie.
- **Immagini G e H**. Gametociti. Riempiono completamente, o quasi, le emazie.



Le immagini E, F, G e H sono tratte da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001 (modificate)

Plasmodium vivax
(Goccia spessa)



1) Trofozoiti ameboidi.
2) Schizonte immaturo, due nuclei (merozoiti).
3) Schizonte maturo.
4) Microgametocita (maschile).
5) Piastrine.
6) Nucleo di un neutrofilo.
7) Eosinofilo.
8) Piastrine e resti di un'emazia.

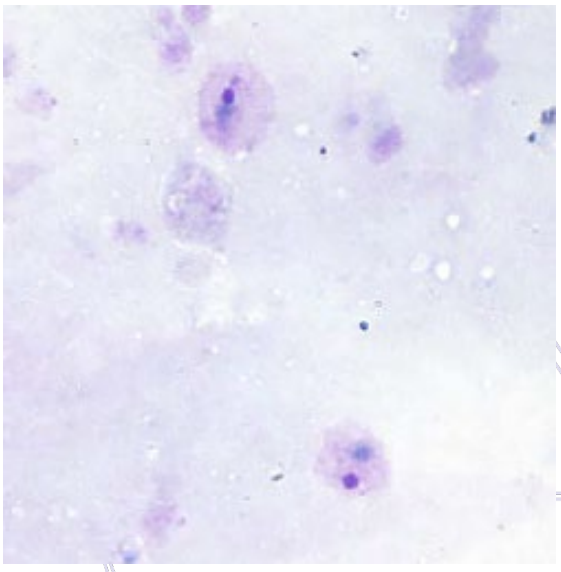
Da: Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*. 1960

Plasmodium vivax

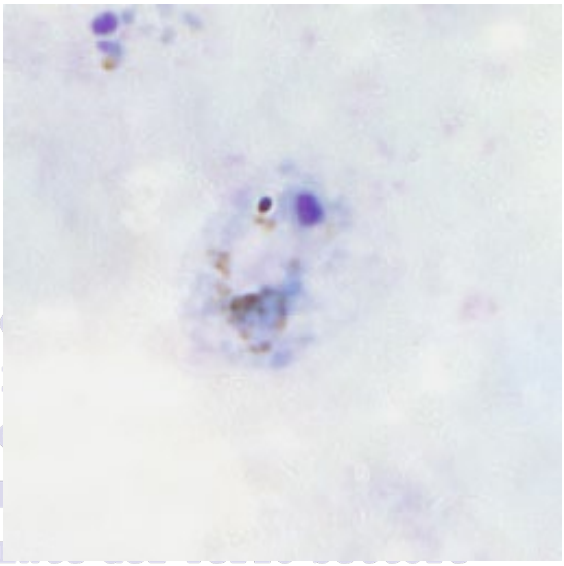
(Goccia spessa)

- **Immagini A**. Trofozoiti ad anello.
- **Immagini B**. Trofozoite più maturo.
- **Immagine C**. Schizonte maturo.
- **Immagine D**. Gametocita.

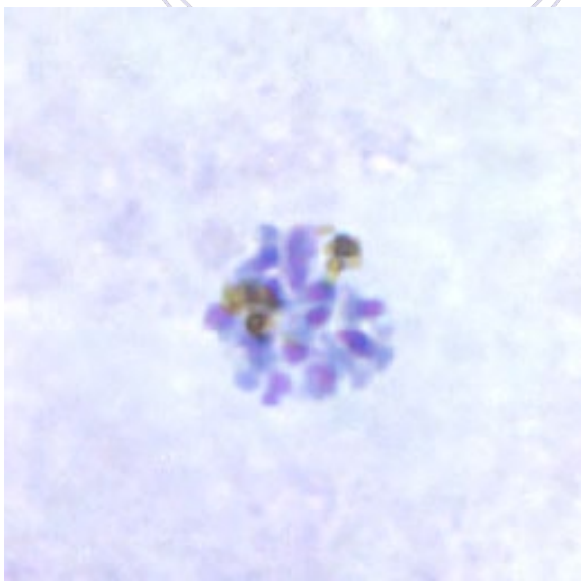
A



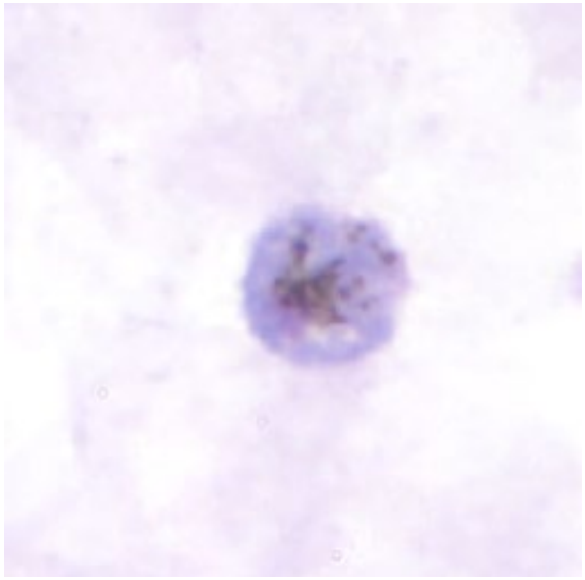
B



C

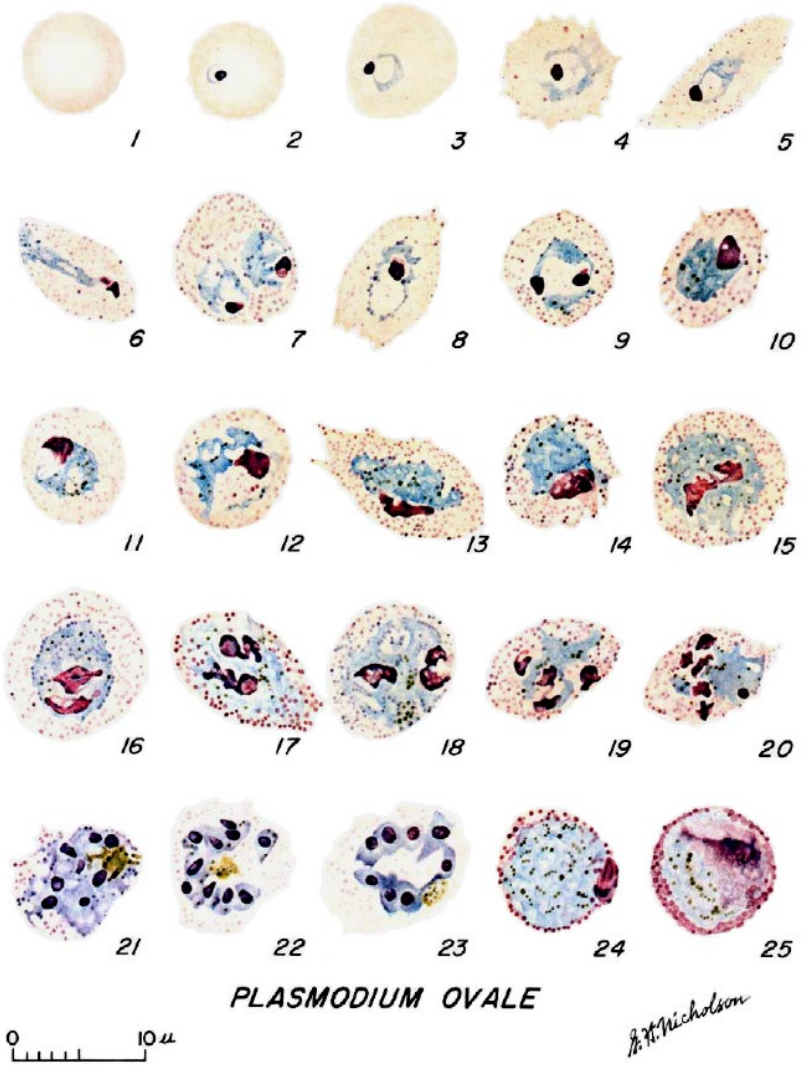


D



Le immagini sono tratte da:
https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Pfalciparum_benchaidV2.pdf

Plasmodium ovale
(Striscio sottile)



1: Emazia normale.
2-5: Trofozoiti giovani (forme ad anello).
6-12: Trofozoiti in crescita.
13-15: Trofozoiti maturi.
16-22: Schizonti in crescita.
23: Schizonte maturo.
24: Macrogametocita

I giovani trofozoiti ad anello hanno un nucleo circolare ben evidente con un filo di citoplasma che circonda un vacuolo (fig. 2). Man mano che il parassita cresce, l'emazia si ingrandisce, il citoplasma aumenta di quantità e il vacuolo scompare (fig. 10); i trofozoiti più anziani occupano circa metà dell'emazia ospite (figg. 10 e 11).

Il citoplasma può apparire strappato e sfilacciato (figg. 5 e 8) o assumere una forma a fascia, che ricorda *P. malariae* (fig. 6); le doppie infezioni non sono rare (fig. 7).

Nel 35-80% dei casi, a seconda degli autori, la cellula ospite può apparire ovale e/o con bordi fimbriati (figg. 5, 6, 8, 13, 17). Sembra che questo fenomeno sia causato dall'asciugatura dello striscio sottile in un'atmosfera a bassa umidità; la stessa cosa non si verifica, se non eccezionalmente, per gli strisci di *P. vivax* preparati nelle medesime condizioni.

I nuclei dei trofozoiti si ingrandiscono durante la maturazione fino a diventare 2-4 volte più grandi che nel trofozoita giovane (fig. 14).

Nelle emazie parassitate sono evidenti delle granulazioni, simili a quelle di Schüffner, dette di James. A differenza che in *P.* vivax, le granulazioni sono presenti anche nelle emazie parassitate da trofozoiti giovani (fig. 4) e diventano più intense man mano che il parassita cresce. Il citoplasma della cellula ospite può diventare pallido e trasparente e apparire come una massa punteggiata (figg. 17, 19).

Il pigmento malarico appare dapprima come granuli sottili simili a polvere che poi tendono ad unirsi (fig. 18) e che successivamente si ammassano in chiazze bruno-giallastre (figg. da 21 a 23).

Durante la schizogonia il citoplasma del parassita assume una colorazione blu, più attenuata nelle prime fasi (figg. da 16 a 18) e più intensa nelle fasi avanzate (figg. da 21 a 23).

Lo schizonte maturo (fig. 23) ha usualmente 8 merozoiti, ma in alcuni casi possono essere fino a 12-16. Anche le emazie contenenti gli schizonti possono assumere forma ovale (fig.17).

I gametociti maturi occupano quasi per intero l'emazia. Nei bordi non occupati dal parassita sono ben evidenti le granulazioni di James (figg. 24 e 25).

Il macrogametocita maturo (Fig. 24) ha un citoplasma di colore blu e un evidente nucleo rosso, compatto ed eccentrico. Il pigmento è disposto in granuli sparsi nel citoplasma.

Il microgametocita maturo (Fig. 25) ha un citoplasma di colore blu meno intenso di quello del macrogametocita e un grande nucleo che occupa circa la metà del parassita di colore rosso che sfuma al rosa chiaro verso il bordo.

Il pigmento è disposto in granuli di dimensioni medio-grandi sparsi in tutto il citoplasma.

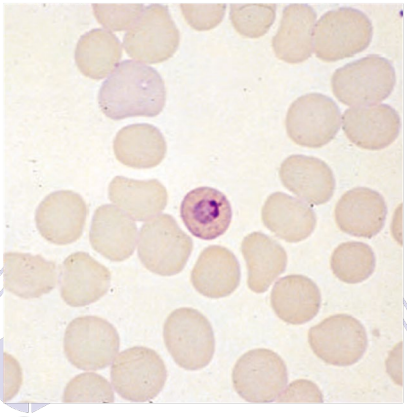
Da: Coatney GR *et al*. *The Primate Malarias*. 1971 [Versione digitale: CDC 2003] (modificato)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

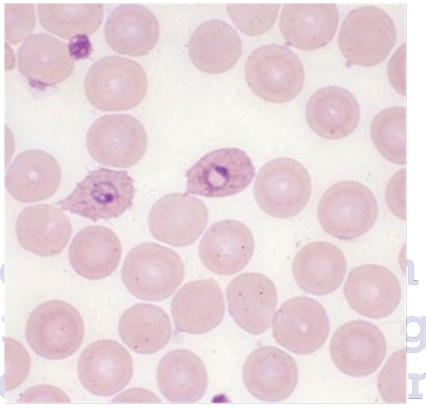
Plasmodium ovale
(Striscio sottile)

- **Immagine A**. Trofozoite giovane ad anello. Le granulazioni (*dots*) di James (simili a quelle di Schüffner) possono essere già presenti; è una caratteristica differenziale con *P. vivax.*
- **Immagini B e C**. Trofozoiti più "anziani". A differenza che in *P. vivax* non hanno aspetto ameboide. Le emazie parassitate sono di grandezza normale o leggermente aumentata; nel 30-85% dei casi assumono forma ovoidale con un'estremità appuntita o sfrangiata (visibili le granulazioni di James).
- **Immagine D**. Schizonte maturo con 8 nuclei (merozoiti).
- **Immagine E**. Gametociti. Quando maturi occupano quasi tutta l'emazia. Nell'immagine è presente anche un trofozoite.

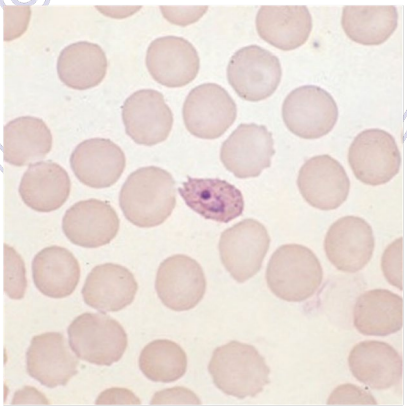
A



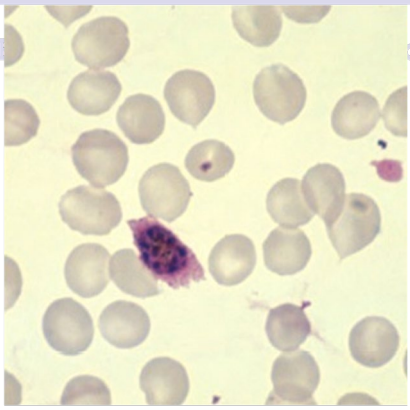
B



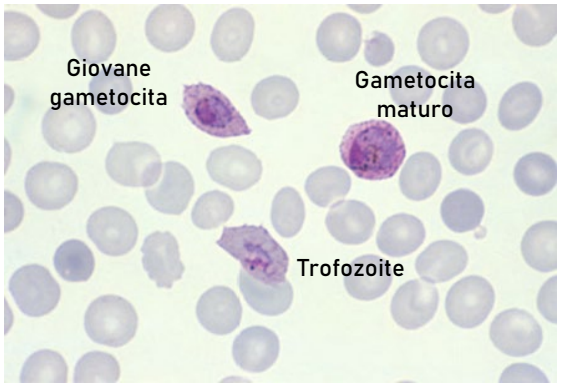
C



D

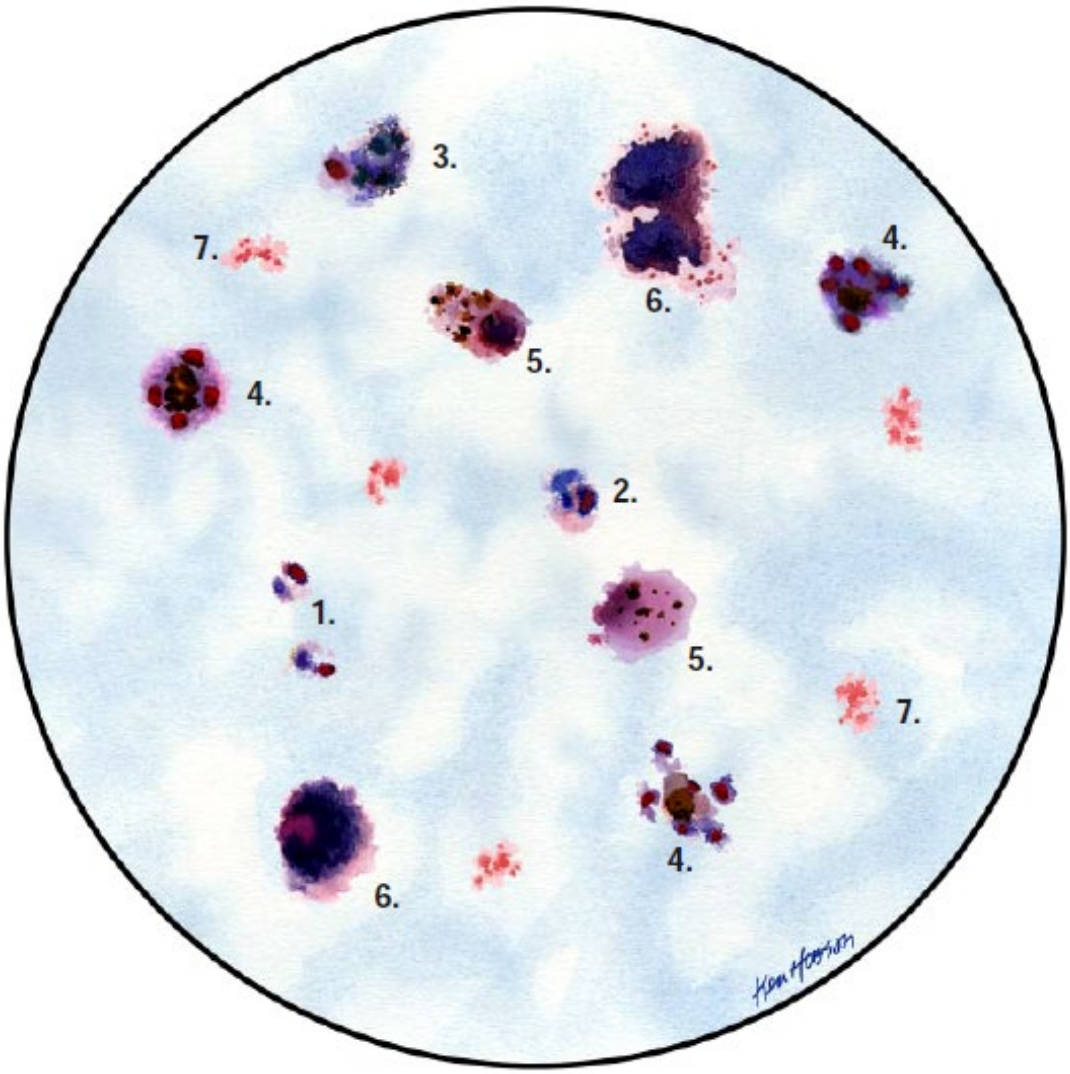


E



Le immagini D e E sono tratte da: Petithory JC *et al. Parasites Sanguins*. 2001 (modificate)

Plasmodium ovale
(Goccia spessa)



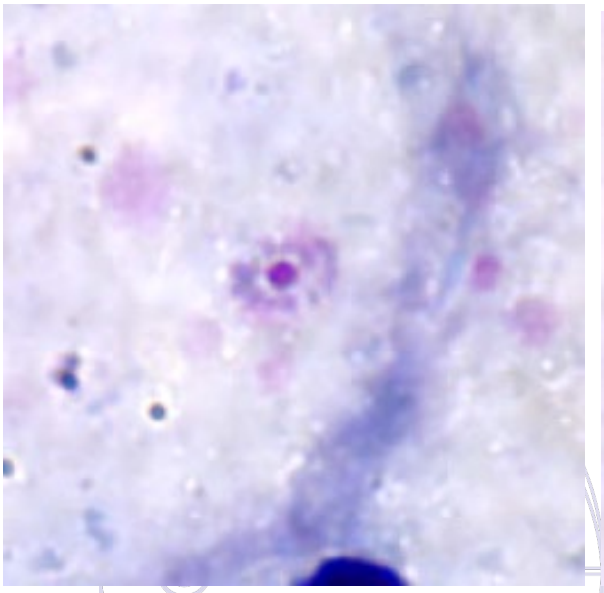
1) Trofozoiti ad anello.
2) Trofozoite in crescita.
3) Trofozoite maturo.
4) Schizonti.
5) Gametociti.
6) Nucleo di un leucocita.
7) Piastrine.

Da: Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*. 1960

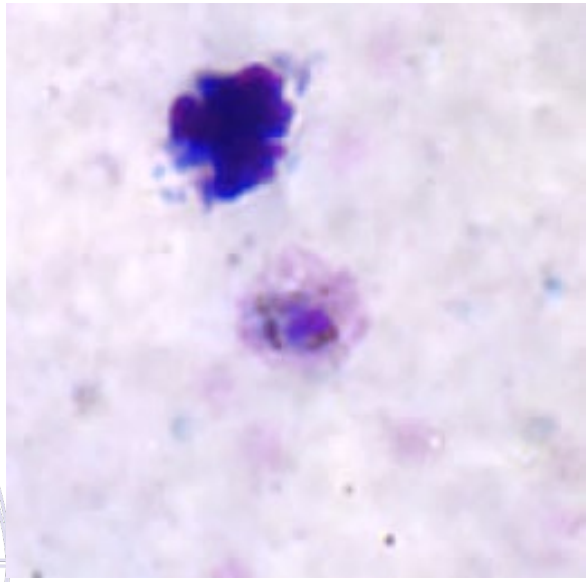
Plasmodium ovale
(Goccia spessa)

- **Immagine A**. Trofozoite ad anello.
- **Immagine B**. Trofozoite maturo.
- **Immagine C**. Schizonte.
- **Immagine D**. Gametocita.

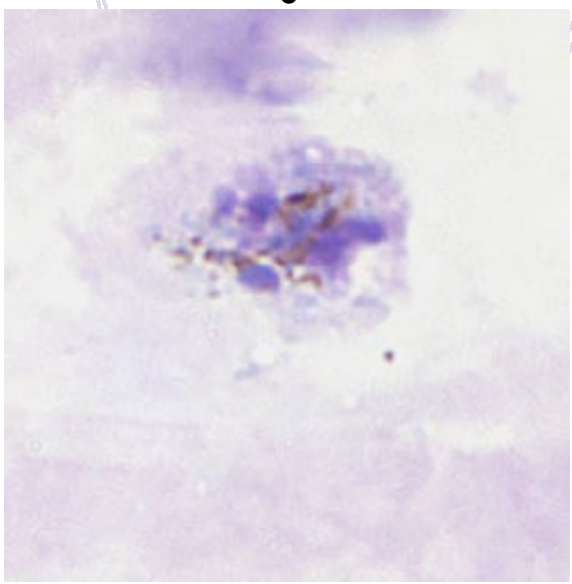
A



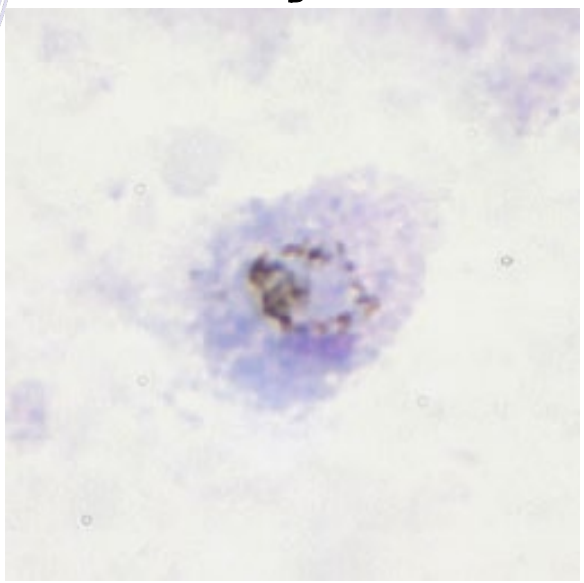
B



C



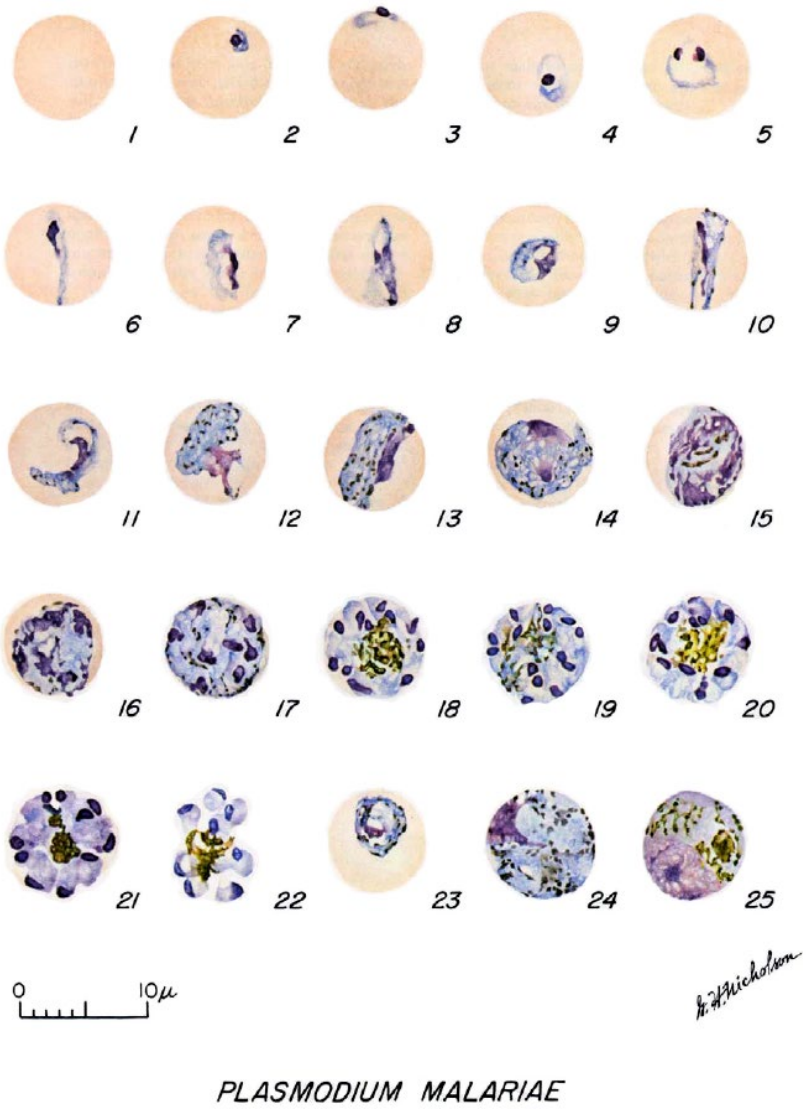
D



Ente del Terzo Settore

Le immagini sono tratte da:
https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Pfalciparum_benchaidV2.pdf

Plasmodium malariae
(Striscio sottile)



PLASMODIUM MALARIAE

1: Emazia normale.
2-5: Trofozoiti giovani (forme ad anello).
6-11: Trofozoiti in crescita.
12-13: Trofozoiti maturi.
14-20: Schizonti in crescita.
21-22: Schizonti maturi.
23: Gametocita immaturo.
24: Macrogametocita (femminile).

Il merozoita penetra nell'emazia, di preferenza in un'emazia anziana.

Il primo stadio ad apparire nel sangue periferico è il familiare stadio ad anello (figg. da 2 a 5) con una massa sferica di cromatina e un citoplasma che va ingrandendosi e che racchiude un vacuolo. A volte sono presenti 2 masse di cromatina (fig. 5). Continuando la maturazione il vacuolo scompare.

In questa fase è difficile distinguerli da quelli di altre specie.

Il pigmento malarico appare precocemente, a volte addirittura nello stadio ad anello e aumenta rapidamente durante la maturazione del parassita ed è molto abbondante nei trofozoiti maturi (figg. 12 e 13).

Le emazie parassitate sono frequentemente di dimensioni inferiori rispetto alle emazie non parassitate.

Man mano che il parassita cresce, assume varie forme (figg. da 6 a 13).
Alcuni trofozoiti appaiono distesi come un nastro attraverso la cellula ospite e sono noti come forme a banda (figg. 6, 8, 10, 13).

Le forme a banda si possono trovare anche in altre specie, ma sono più frequenti in *P. malariae* e quindi sono considerate diagnostiche.

Quando inizia la schizogonia l'emazia ospite viene quasi completamente riempita dal parassita in divisione nucleare; il pigmento visibile è scarso (figg. da 14 a 16). Durante l'ulteriore crescita (figg. da 17 a 22), si forma il numero definitivo di nuclei e il citoplasma si divide per dare a ciascun nucleo una piccola quantità di citoplasma. Il numero di merozoiti può essere compreso tra 6 e 12, a volte 14; la media è 8 (Figg. 21 e 22).

Negli schizonti quasi maturi e maturi il pigmento può apparire raggruppato in una massa libera al centro della cellula, circondato dai merozoiti più o meno disposti simmetricamente, per dare l'effetto a "rosetta", caratteristico della specie.

I gametocoti immaturi (fig. 23) sono molto simili ai trofozoiti maturi il che rende quasi impossibile distinguerli tra di loro.

Il macrogametocita maturo presenta un citoplasma di colore blu intenso con un nucleo eccentrico, ben definito, di colore rosso intenso. Il pigmento è sparso. Il parassita riempie completamente la cellula ospite (Fig. 24).

Il citoplasma del microgametocita maturo assume una leggera sfumatura rosa-bluastra. Il pigmento è limitato a quest'area del parassita. Il nucleo è meno compatto che nel microgametocita, assume una colorazione blu-rosata e può occupare circa metà del plasmodio. Il parassita riempie l'intera cellula ospite (Fig. 25).

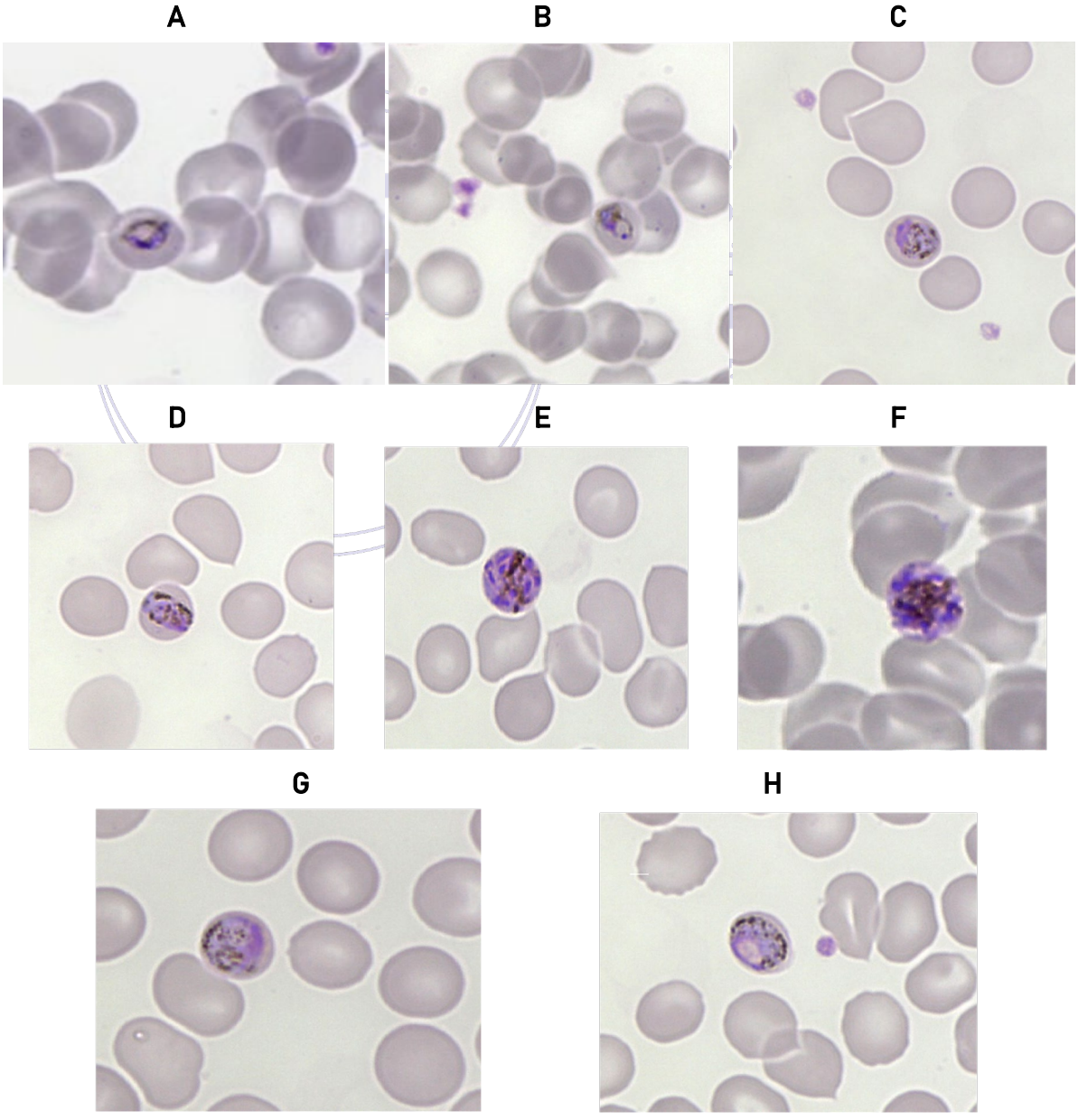
Da: Coatney GR *et al*. *The Primate Malarias*. 1971 [Versione digitale: CDC 2003] (modificato)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

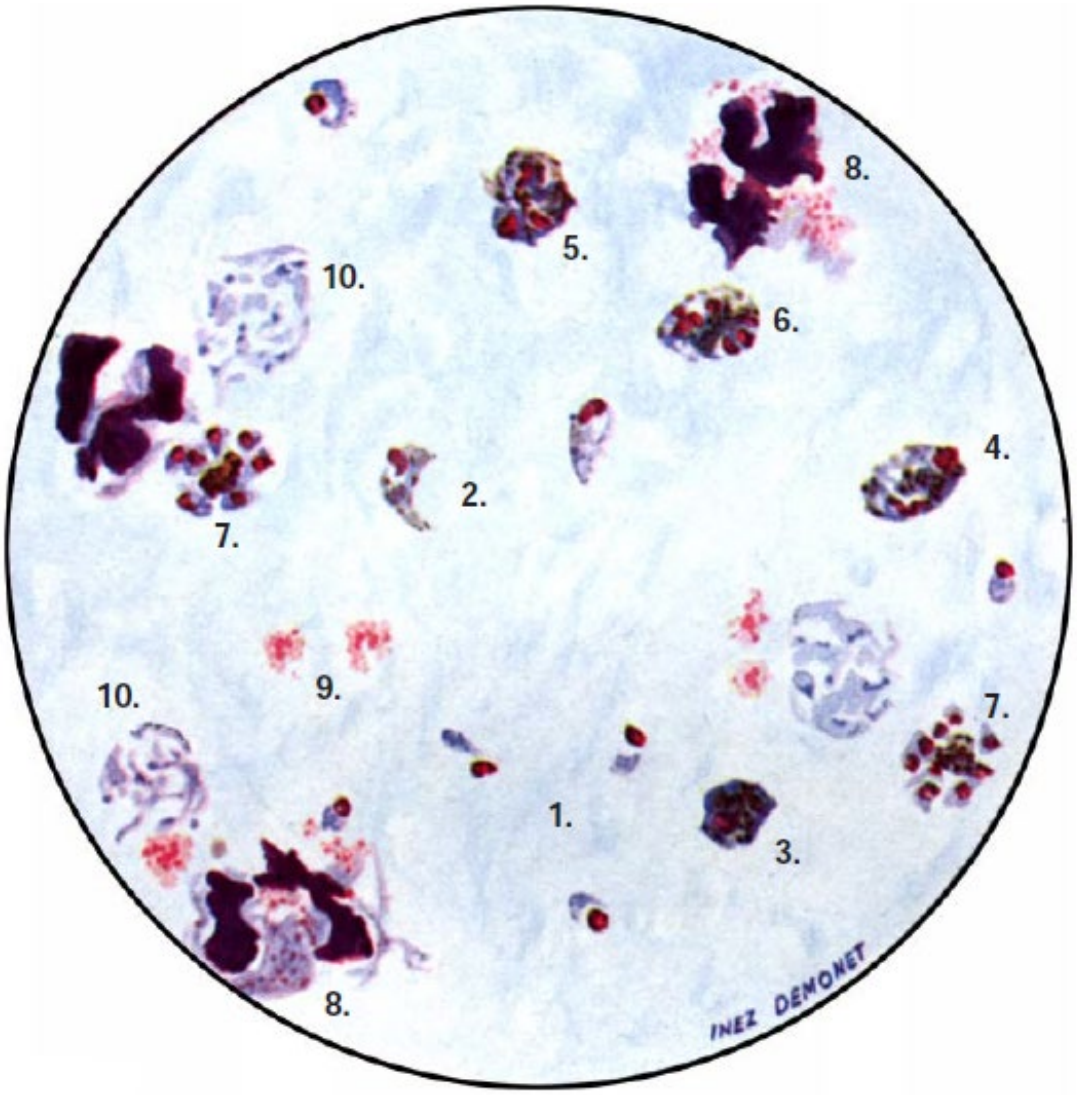
Plasmodium malariae

(Striscio sottile)

- **Immagini A e B**. Trofozoiti giovani ad anello. Di frequente le emazie parassitate sono di taglia diminuita. In genere non è ancora evidente il pigmento.
- **Immagine C**. Trofozoite più "anziano". Il trofozoite diventa più grande e compare il pigmento che diviene, via via, più abbondante; sono difficili da differenziare rispetto ai gametociti.
- **Immagine D.** Alcuni trofozoiti assumono forme quadrangolari, disposti in banda equatoriale, con nucleo, citoplasma e pigmento allungati nel medesimo senso (forme tipiche).
- **Immagini E e F**. Schizonti. Hanno abbondante pigmento spesso centrale contornato dai nuclei (merozoiti). Sono le cosiddette forme a "rosetta" o a "margherita".
- **Immagini G e H**. Gametociti. Quando maturi sono rotondi o ovalari e riempiono, o quasi, l'emazia. Pigmento molto abbondante, grossolano di colore bruno/nero.



Plasmodium malariae
(Goccia spessa)



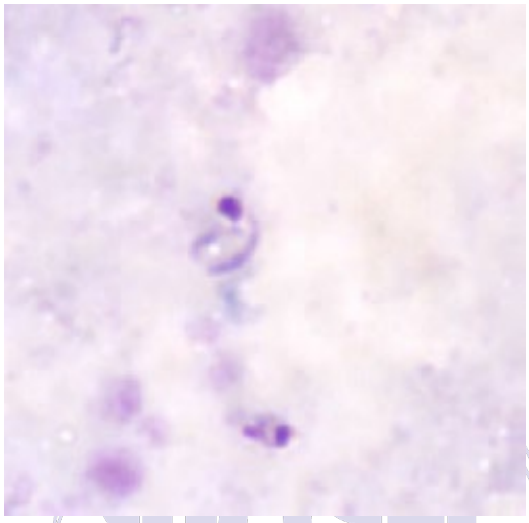
1) Trofozoiti ad anello.
2) Trofozoiti in crescita.
3) Trofozoite maturo.
4), 5), 6) Schizonti in vari stadi di maturazione.
7) Schizonti maturi a rosetta.
8) Nuclei di leucociti.
9) Piastrine.
10) Resti di emazie.

Da: Wilcox A. *Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man*. 1960

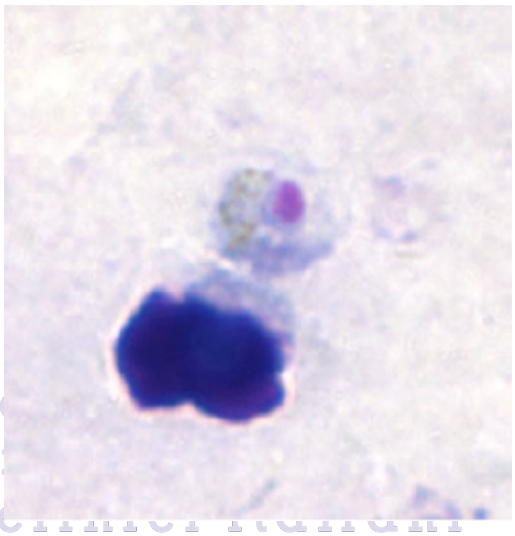
Plasmodium malariae
(Goccia spessa)

- **Immagine A**. Trofozoiti ad anello.
- **Immagine B**. Trofozoite maturo.
- **Immagine C**. Schizonte a rosetta.
- **Immagine D**. Gametocita.

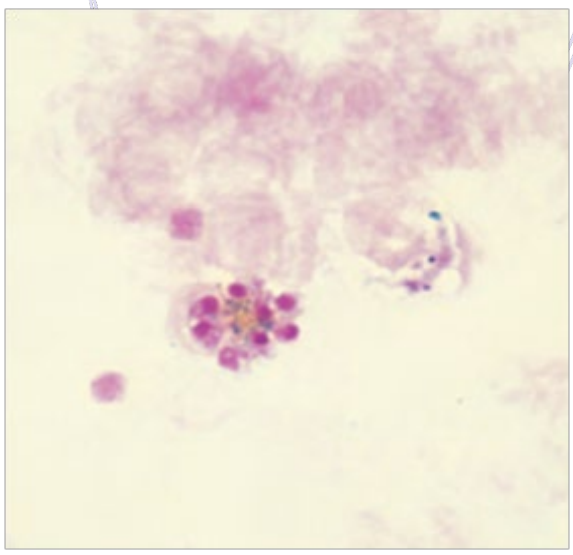
A



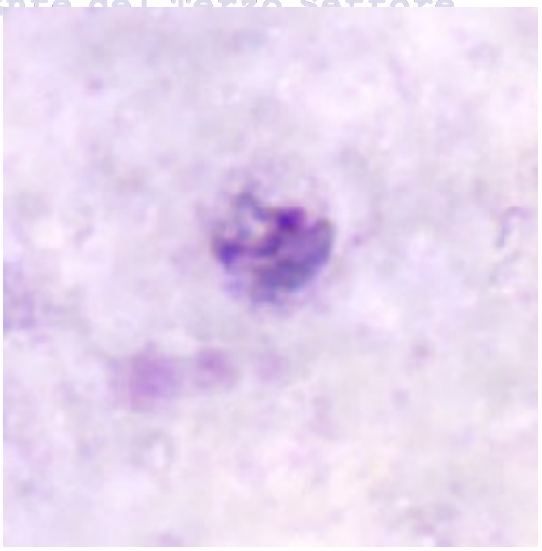
B



C

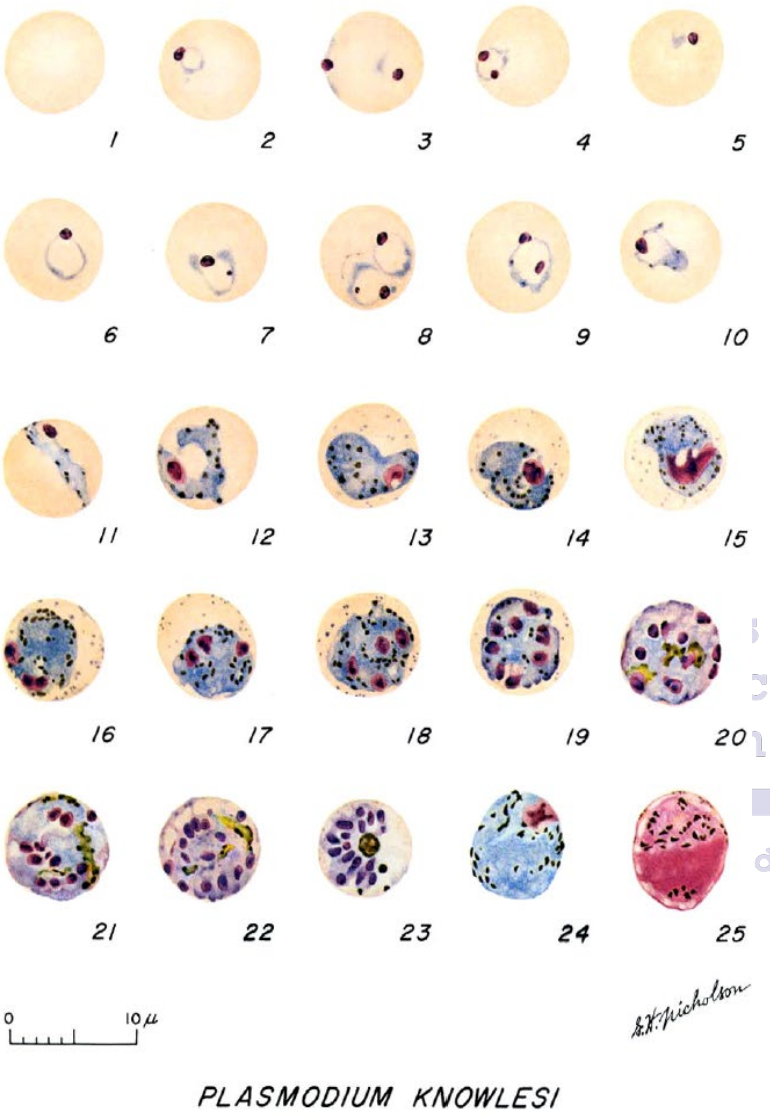


D



Le immagini A, B e D sono tratte da:
https://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Pfalciparum_benchaidV2.pdf
L'immagine C è tratta da: Petithory JC *et al*. *Parasites Sanguins*. 2001

Plasmodium knowlesi
(Striscio sottile)



1: Emazia normale.
2-9: Trofozoiti giovani (forme ad anello).
10-12: Trofozoiti in crescita.
13-15: Trofozoiti maturi.
16-23: Schizonti in maturazione e maturi.
24: Macrogametocita (femminile).
25: Microgametocita (maschile).

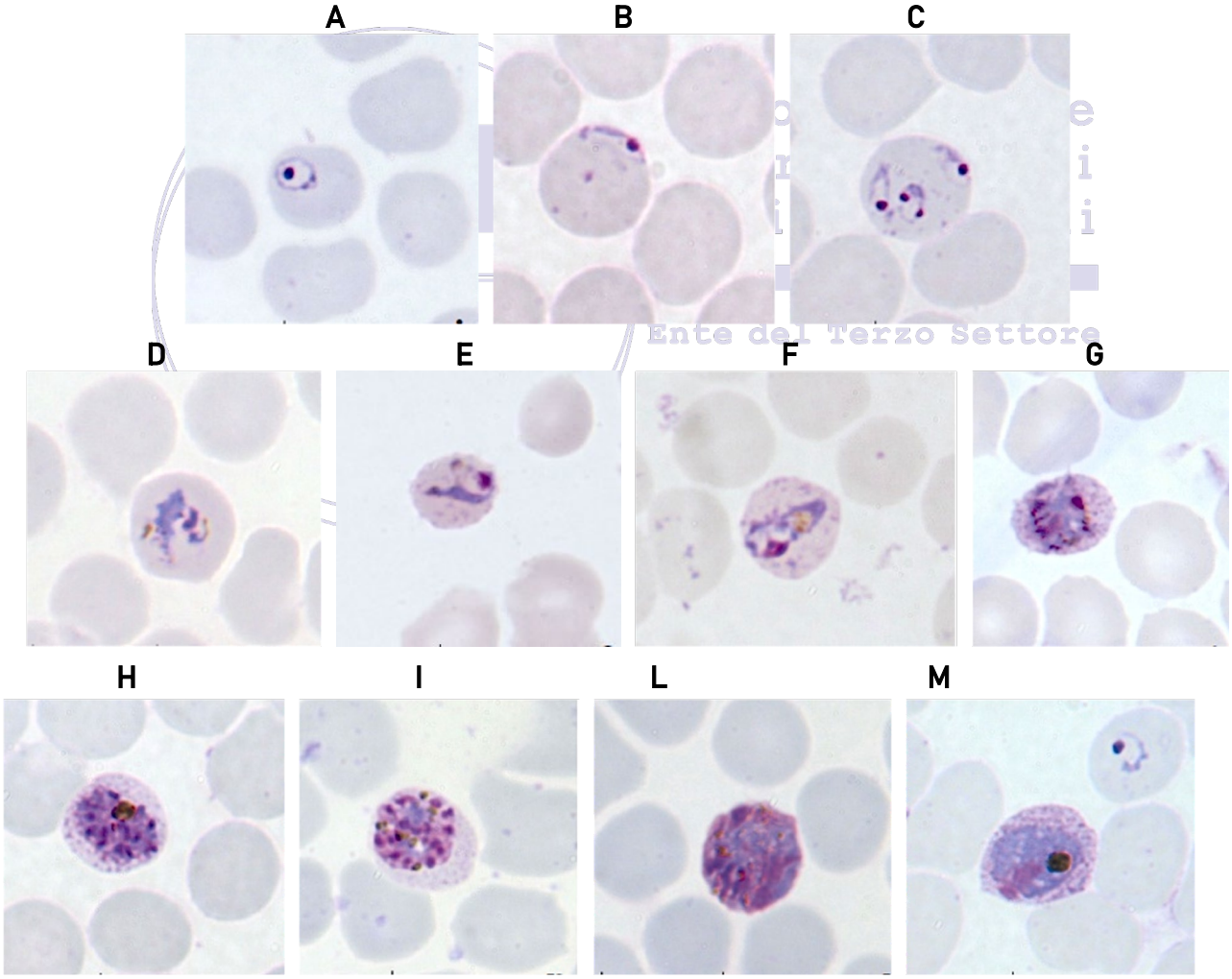
I giovani trofozoiti ad anello assomigliano a quelli di *P. falciparum*, ma la cromatina è più cospicua.
Come per *P. falciparum* sono possibili forme appiattite (fig. 3) e marginali (fig. 4), frequenti anche anelli con due masse di cromatina (figg. 4, e da 7 a 9).
Nella fase di maturazione dei trofozoiti (figg. da 10 a 12) possono comparire forme a banda (fig.11) che ricordano *P. malariae*. In questa fase compare il pigmento malarico sotto forma di grani scuri (figg. 11 e 12).
I trofozoiti maturi (figg. da 13 a 15) possono occupare metà o più dell'emazia ospite. Con la perdita del vacuolo il parassita si restringe, diventa compatto con granuli di pigmento al suo interno; il nucleo aumenta di dimensioni e assume una colorazione rosso intenso. Il citoplasma ha colore blu intenso.
Nell'emazia ospite sono presenti delle granulazioni, più chiare e meno regolari rispetto alle granulazioni di Schüffner di *P. vivax*, dette di Sinton e Mulligan (figg. da 13 a18).

Con l'avvento della schizogonia (figg. da 16 a 23), il nucleo si divide e il processo continua finchè vengono prodotti fino a 16 merozoiti, in media 10. Il processo di schizogonia provoca una certa contrazione del parassita (fig. 19), ma con un ulteriore sviluppo alla fine lo schizonte riempie la cellula ospite (fig. 20). Inizialmente, il pigmento è sparso ma poi si raccoglie in una o più masse nero-giallastre, e infine in una singola massa nello schizonte maturo (fig. 23). Possono assumere una forma a "rosetta" simile a quella di *P. malariae*.
Il macrogametocita maturo è generalmente sferico e riempie o quasi la cellula ospite. Il citoplasma si colora in blu e il nucleo, posto in modo eccentrico, assume una colorazione rosa intenso che racchiude un'area irregolare colorata più intensamente. I granuli di pigmento nero sono ben evidenti e sparsi in modo irregolare nel citoplasma (fig. 24). Il microgametocita è talvolta più piccolo del macrogametocita, ma questo non è sempre vero. Il citoplasma ha colore rosa e i granuli di pigmento sono sparsi al suo interno. Il nucleo assume una tonalità più scura e costituisce circa la metà del corpo del parassita (fig. 25).

Da: Coatney GR *et al. The Primate Malarias*. 1971 [Versione digitale: CDC 2003] (modificato)

Plasmodium knowlesi
(Striscio sottile)

- **Immagini A, B e C**. Trofozoiti giovani ad anello. Hanno una o, a volte, due evidenti masse cromatiniche. Possono essere presenti forme marginali o appiattite. Nelle emazie parassitate, di taglia generalmente normale, possono essere presenti granulazioni (*dots*) dette di Sinton e Mulligan, più chiare e meno regolari rispetto alle granulazioni di Schüffner di *P. vivax*. È possibile il poliparassitismo. In questo stadio i trofozoiti possono essere confusi con quelli di *P. falciparum*.
- **Immagini D, E, F e G**. Trofozoiti più "anziani". Il citoplasma appare di forma irregolare, leggermente ameboide (D, E), la cromatina nucleare è più grande di quella dei trofozoiti giovani (E, F). Il citoplasma e il nucleo possono allungarsi e disporsi a banda (F, G). Il pigmento è assente o presente in piccola quantità. In questo stadio i trofozoiti possono essere confusi con quelli di *P. malariae*.
- **Immagini H e I**. Schizonti. Hanno fino a 16 merozoiti e occupano tutta, o quasi, l'emazia. Il pigmento può essere in piccoli granuli o aggregato in un unico ammasso bruno/nero. Possono assumere la forma a "rosetta". Gli schizonti possono essere confusi con quelli di *P. malariae*.
- **Immagini L e M**. Gametociti. Riempiono per 2/3 l'emazia (immaturi) o quasi per intero (maturi). I gametociti immaturi sono difficili da distinguere dai trofozoiti maturi. Pigmento di colore bruno/nero irregolarmente disperso, ma a volte in massa compatta nei macrogametociti (gametociti femminili).



Le immagini sono tratte da: Lee KS *et al. Morphological features and differential counts of Plasmodiumknowlesi parasites in naturally acquired human infections*. Malaria Journal, 2009 (modificate)

10. APPENDICE ETIMOLOGICA

In questa appendice vengono proposti l'origine e il significato dei termini che descrivono i parassiti, i cicli vitali e i vettori delineati nel testo, senza peraltro volere essere esaustivi, bensì offrire al lettore, al professionista, allo studioso indicazioni utili ed esplicative in un contesto non soltanto strettamente diagnostico.

In alcuni casi il significato dei termini utilizzati e dei nomi scientifici è intuitivo, ma in altri meno.

Per i sostantivi sono riportati il nominativo e la desinenza del genitivo (es. "filum -i", "όφελος -ου"), solo in alcuni casi il genitivo è riportato per esteso (es. "falx, falcis", φλέψ, φλεβός").

Per i verbi sono riportate la prima persona dell'indicativo presente e la desinenza dell'infinito (es. "divergo -ere", "κινέω – ειν").

Per gli aggettivi sono riportate le uscite del maschile, del femminile e del neutro (es. "magnus -a, -um", "στρογγύλος -η, -ον").

Gli avverbi e le proposizioni (es. "πᾶν", "ἐπί") sono indeclinabili.

Nella traduzione dal greco antico e dal latino sono stati riportati i termini attinenti all'argomento trattato. In altri contesti gli stessi vocaboli, in particolare gli avverbi, possono assumere un diverso significato.

Le parole greche sono anche translitterate. Si è seguito un criterio molto semplificato che non tiene conto degli spiriti (aspro: ῾, dolce: ᾽) né dei diversi tipi di accenti (acuto: ΄, grave: `, circonflesso: ῀), nella traslitterazione l'accento è sempre grave. Non si è tenuto conto neanche della lunghezza delle vocali: quindi: ε/η = e; o/ω = o.

Nella tabella 7 a pag. 100 è riportato l'alfabeto greco e la relativa translitterazione.

amcli Associazione Microbiologi Clinici Italiani
Ente del Terzo Settore

MALARIA

Il termine "malaria" contiene, nella sua etimologia, l'ipotesi dell'etiologia miasmatica, in particolare i miasmi palustri, di origine Ippocratica. Questa teoria è rimasta sostanzialmente in auge fino alla scoperta dei parassiti malarici e del ruolo della zanzara *Anopheles* nella trasmissione (seconda metà del XIX secolo). Il *Dizionario Etimologico Italiano* fa risalire l'uso della forma "mal'aria" al 1571, a Venezia; mentre il *Dizionario Etimologico della lingua italiana* registra il termine per la prima volta nel 1572. L'espressione "mal'aria" si trova già nel 1560 in un trattato sull'agricoltura di Francesco Sansovino (che firmava con lo pseudonimo Giovanni Tatti). Ma almeno dal 1440 con la locuzione "mal aere" o "mal aire" si indicava la cattiva aria causata dalla formazione delle paludi alla foce dei fiumi che si immettevano nella laguna veneta e che producevano "molte febre".

A partire dagli anni 20-30 del 1800 l'apostrofo non compare più nei riferimenti alla malattia.

Da allora la parola malaria è entrata in uso in quasi tutte le lingue occidentali tranne che in francese che utilizza il termine *paludisme* e in spagnolo che, oltre a malaria, utilizza di frequente il termine *paludismo*; anche questi termini risentono dell'antica teoria miasmatica.

Agenti etiologici

Plasmodium. Dal greco "πλάσμα -ατος [plasma -atos]" = cosa plasmata, figura + "εἶδος -ους [èidos –ous] = aspetto, forma: riferimento alla forma spesso ameboide del citoplasma di questi protozoi.

- *P. falciparum*. Dal latino "falx, falcis" = falce + suffisso "-parum" = simile, derivato dal verbo "pareo -ere" = apparire; riferimento alla forma dei gametociti.
- *P. malariae*. Latinizzazione della parola italiana "malaria".
- *P. ovale*. Dal latino "ovatus -a, -um" = ovale: riferimento alla forma assunta dalle emazie infettate.
- *P. vivax*. Dal latino "vivax -vacis" = ricco di vita, vivace: riferimento ai rapidi movimenti del trofozoita all'interno dell'emazia.
- *P. knowlesi*. Di Knowles: in onore del medico e parassitologo britannico Robert Knowles (1883 – 1936).

Ciclo vitale

Sporozoite- Dal greco "σπόρος -ου [spòros -ou]" = seme, semente + "ζώον -ου [zòon ou]" = essere vivente.

Schizonte. Dal greco "σχίζω -ειν [schìzo -ein]" = dividere, separare.□

Merozoite. Dal greco "μέρος -εος [mèros eos]" = parte + "ζώον -ου [zòon -ou]" = essere vivente.

Trofozoite. Dal greco "τροφός -όν [trofòs -òn]" = che nutre + "ζώον -ου [zòon -ou]" = essere vivente.

Gametocita. Dal greco "γαμέω -εῖν [gamèo -èin]" = sposare, unirsi in matrimonio + "κύτος -εος [kùtos -eos]" = cavità (cellula).

Macrogametocita Dal greco "μακρός -ά, -όν [makròs -à, -òs]" = grande, lungo + "γαμέω -εῖν [gamèo -èin]" = sposare, unirsi in matrimonio + "κύτος -εος [kùtos -eos]" = cavità (cellula): gametocita femminile.

Microgametocita. Dal greco μικρός -ά, -όν [mikròs -à, -òn]" = piccolo + "γαμέω -εῖν [gamèo -èin]" = sposare, unirsi in matrimonio + "κύτος -εος [kùtos -eos]" = cavità (cellula): gametocita maschile.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Zigote. Dal greco "Ζυγόν -οῦ [zugòn -òu]" = coppia, legame.

Oocinete. Dal greco "ᾠόν -οῦ [oòn -òu]" = uovo + κινέω -ειν [kinèo -ein]" = muovere.

Oocisti. Dal greco "ᾠόν -οῦ" = uovo + "κύστις -εως" = vescica, cisti.

Vettori

Anopheles. Dalla particella privativa greca "ἀν- [an-]" = senza, privo, non + "όφελος -ου [ofèlos -ou]" = utilità, utile, vantaggio: che è privo di utilità, che è svantaggioso.

- *A. gambiae* (complex). Del Gambia: dalla zona geografica (Africa occidentale) ove fu per la prima volta descritto.
- *A. maculipennis* (complex). Dal latino "macula -ae" = macchia + "pinna -ae" = penna (in particolare delle ali e della coda), al plurale per metonimia = ali: riferimento alle macchie scure sulle ali.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

BABESIASI – BABESIOSI

- iasi dal greco "-ιασις"; -osi dal greco "-ωσις": suffissi che indicano uno stato, una condizione, un processo.

La malattia è nota anche come Piroplasmosi dal latino "pirum -i" = pera e dal greco "πλάσμα -ατος [plasma -atos]" = cosa plasmata, figura: riferimento alla forma che spesso assumono i trofozoiti.

Agenti etiologici

Babesia. Di Babes: in onore del medico batteriologo romeno Victor Babeș (1854 – 1926).

- *B. bovis*. Dal latino "bos, bovis": riferimento alla patogenicità nei bovini.
- *B. divergens*. Dal latino "divergo -ere" = divergere: riferimento all'angolo ottuso (divergente) formato dalle coppie di trofozoiti, maggiore che in altre specie.
- *B. microti*: dei roditori: riferimento ai piccoli roditori del genere *Microtus*.

Ciclo vitale

Sporozoite- Dal greco "σπόρος -ου [spòros -ou]" = seme, semente + "ζώον -ου [zòon -ou]" = essere vivente.

Trofozoite. Dal greco "τροφός -όν [trofòs -òn]" = che nutre + "ζώον -ου [zòon -ou]" = essere vivente.

Merozoite. Dal greco "μέρος -εος [mèros eos]" = parte + "ζώον -ου [zòon -ou]" = essere vivente.

Gamete. Dal greco "γαμέω -εῖν [gamèo -èin]" = sposare, unirsi in matrimonio.

Zigote. Dal greco "ζυγόν -οῦ [zugòn -òu]" = coppia, legame.

Oocinete. Dal greco "ᾠόν -οῦ [oòn -òu]" = uovo + κινέω -ειν [kinèo -ein]" = muovere.

Vettori

Ixodes. Dal greco "ἰξώδης -ες" [ixòdes -es] = simile a vischio, viscoso, tenace.

- *I. ricinus*. Dal latino "ricinus -i" = zecca, insetto, ricino: riferimento alla somiglianza con un grano di ricino.

AMCLI Associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

LEISHMANIASI – LEISHMANIOSI

- iasi dal greco "-ιασις"; -osi dal greco "-ωσις": suffissi che indicano uno stato, una condizione, un processo.

Agenti etiologici

Genere e sottogenere *Leishmania*: in onore del medico scozzese William Boog Leishman (1865 – 1926).

Sottogenere: *Viannia*: in onore del medico brasiliano Gaspar de Oliveira Vianna (1885 – 1914).

- *L. chagasi*. Di Chagas: in onore del medico brasiliano Carlos Chagas (1879-1934).
- *L. donovani*. Di Donovan: in onore del medico irlandese Charles Donovan (1863 – 1951).
- *L. infantum*. Dal latino "infans -antis" = infante, bambino: riferimento alla diffusione tra i bambini.
- *L. major*. Dal latino "magnus -a, -um" = grande, comparativo "maior" = più grande: riferimento alle grandi dimensioni delle lesioni cutanee, maggiori di quelle causate da altre specie.
- *L. tropica*. Dal latino "tropicus -i" = tropico: riferimento alle aree di diffusione della specie.
- *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*: i nomi delle specie fanno riferimento alle aree geografiche di prima individuazione e/o di diffusione tra i serbatoi animali.
- *L.* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *guyanensis*, *L.* (*V.*) *panamensis*, *L.* (*V.*) *peruviana*: i nomi delle specie fanno riferimento alle aree geografiche di prima individuazione e/o di diffusione tra i serbatoi animali.

Ciclo vitale

Promastigote. Dal greco "πρό [prò]" = davanti + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello: riferimento al flagello che inizia dal cinetoplasto posto anteriormente al nucleo e che emerge dall'estremo anteriore.

Amastigote. Dalla particella privativa greca "ἀ- [à-]" = senza, privo, non + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello; senza flagello.

Vettori

Phlebotomus. Dal greco "φλέψ, φλεβός [flèps, flebòs]" = vena + "τομός -ή, -όν [tomòs -è, -òn]" = tagliente, il tagliare: riferimento all'apparato pungente che "taglia" i vasi sanguigni capillari.

- *P. papatasi*. latinizzazione della parola italica pappataccio = che mangia tacendo: riferimento al volo silenzioso dell'insetto.
- *P. perniciosus*. Dal latino "perniciosus -a, -um" = pernicioso, dannoso, funesto.
- *P. perfiliewi*. Di Perfiliew: in onore dell'entomologo russo Petr Pavlovich Perfil'ev (1897-1977).

Lutzomia spp. Di Lutz + dal greco "μυῖα -ας" [myìa -as] = mosca: in onore del medico brasiliano Adolfo Lutz (1855 – 1940).

TRIPANOSOMIASI – TRIPANOSOMOSI

-iasi dal greco "-ιασις"; -osi dal greco "-ωσις": suffissi che indicano uno stato, una condizione, un processo.

Agenti etiologici

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.

- *T. brucei*. Di Bruce; in onore del medico e microbiologo scozzese David Bruce (1855 – 1931).
- *T. b. gambiense*. Del Gambia: riferimento al suo primo ritrovamento lungo il fiume Gambia in Africa occidentale.
- *T. b. rhodesesiense*. Della Rhodesia (Zambia e Zimbabwe): riferimento alla regione geografica del primo ritrovamento.
- *T. cruzi*. Di Cruz: in onore del medico e igienista brasiliano Oswaldo Gonçalves Cruz (1872 – 1917).
- *T. rangeli*. Di Rangel: in onore del medico venezuelano Rafael Rangel (1877- 1909).

Ciclo vitale

Amastigote. Dalla particella privativa greca "ἀ- [à-]" = senza, privo, non + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello: senza flagello.

Epimastigote. Dal greco "ἐπί" [èpi] = sopra, dinanzi + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello: riferimento al flagello che è anteriore al nucleo e attaccato al corpo cellulare con una breve membrana ondulante.

Tripomastigote. Dal greco "τρύπανον -ου [trỳpanon -ou]" = trapano + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello: termine derivato dalla fusione diTrip(anosoma) e mastigote.

- metaciclico. Dal greco "μετά [metà]" = tra, in mezzo + κυκλικός -ή, -όν [kyklicòs -è, -òn] = circolare, ciclico: che è a meà del ciclo, non ancora del tutto sviluppato.

Vettori

Glossina. Dal greco "γλῶσσα -ης [glòssa -es]" = lingua: riferimento al lungo apparato pungitore non retrattile che assomiglia a una lingua.

- *G. morsitans* (gruppo). Dal latino "morsico -are" = morsicchiare: che dà piccoli morsi.
- *G. palpalis* (gruppo). Dal latino "palpo -are" = lisciare, accarezzare; da "palpare" deriva la parola palpo (organo sensoriale): che ha i palpi.

Panstrongylus. Dal greco "πᾶν [pàn]" = del tutto + "στρογγύλος -η, -ον [strongỳlos -e, -on" = arrotondato, rotondo: riferimento alla forma arrotondata dell'insetto.

- *P. megistus*. Dal greco "μέγιστος -ή, -όν"[mègistos -è, -òn] = grandissimo: riferimento alla grandezza dell'insetto.
- *P. rhodnius*. Etimologia incerta, probabilmente dal greco "ῥόδον -ου [ròdon -ou]" = rosa: possibile riferimento al colore rosa dei fluidi corporei dell'insetto.
- *R. prolixus*. Dal latino "prolixus -a, -um" = molto lungo: riferimento alla lunghezza dell'insetto.

Triatoma. Dal greco"τρεῖς, τρία [trèis, trìa]" = tre; + "τομή -ῆς, -ή [tomè -ès, è]" = taglio, divisione: riferimento alla segmentazione delle antenne dell'insetto. In realtà i segmenti sono quattro, ma non ostante l'errore il nome è rimasto.

- *T. infestans*. Dal latino "infesto -are" = infestare, molestare: che molesta.

FILARIASI – FILARIOSI

-iasi dal greco "-ιασις"; -osi dal greco "-ωσις": suffissi che indicano uno stato, una condizione, un processo.

Agenti etiologici

Brugia. Di Brug: in onore del parassitologo olandese Steffen Lambert Brug (1879 – 1946).

- *B. malayi*. Della Malesia; dal nome della zona geografica, Malaysia, ove fu scoperta la specie.
- *B. timori*. Di Timor; dal nome della zona geografica, isola di Timor, ove fu scoperta la specie.

Loa loa. Etimologia incerta. La parola "loa" o "l'awo", di origine africana, dalla lingua Yoruba parlata in aree della Nigeria, Benin e Togo, significa: mistero. I Loa sono divinità (spiriti) della religione Vudù, (originaria dell'africa occidentale). A mezzogiorno, col sole a picco, le ombre non sono visibili e senza ombra si è anche senza anima e di conseguenza esposti alla possessione, non voluta, da parte dei Loa. Possibile riferimento alla periodicità diurna con picco delle filarie a mezzogiorno.

Mansonella. Di Manson: in onore del medico e parassitologo scozzese Patrick Manson (1844 – 1922).

- *M. ozzardi*. Di Ozzard: in onore del medico britannico Albert Tronson Ozzard (1862? – 1929).
- *M. perstans*. Dal latino "persto -are" = restar fermo, permanere, persistere: riferimento alla aperiodicità delle microfilarie, esse permangono in circolo nelle 24 ore.

M. streptocerca. Dal greco "στρεπτός -ή, -όν [streptòs -è, -òn]" = attorcigliato, curvo + "κέρκος -ου [kèrkos -ou]" = coda: riferimento alla forma della parte caudale della microfilaria.

Onchocerca. Dal greco "ὄγκος -ου [ònkos -ou]" = curvatura, uncino + "κέρκος -ου [kèrkos -ou]" = coda: riferimento alla curvatura della parte caudale del verme maschio.

- *O. volvulus*. Dal latino "volvo -ere" al passivo = avvolgersi, voltolarsi: riferimento ai vermi che vivono aggrovigliati all'interno di noduli, per lo più sottocutanei.

Wuchereria. Di Wucherer: in onore del medico e naturalista brasiliano Otto Wucherer (1820 – 1873).

W. bancrofti. Di Bancroft: in onore del chirurgo e parassitologo australiano Joseph Bancroft (1836 – 1894).

Ciclo vitale

Filaria: dal latino "filum -i" = filo; riferimento alla forma sottile e allungata di questi nematodi.

Microfilaria: dal greco "μικρός -ά, -όν [mikròs -à, -òn]" = piccolo + dal latino "filum -i" = filo: piccola filaria.

Vettori

Aedes spp. Dal greco "ἀηδής -ές [aedès -ès]" = spiacevole: che è spiacevole.

Anopheles spp. Dalla particella privativa greca "ἀν- [-àn]" = senza, privo, non + "ὄφελος -ου [òfelos -ou]" = utilità, utile, vantaggio: che è privo di utilità, svantaggioso.

Culex spp. Dal latino "culex -icis" = zanzara.

Mansonia spp. Di Manson: in onore del medico e parassitologo scozzese Patrick Manson (1844 – 1922).

Chrysops spp. Dal greco "χρυσός -οῦ [krysòs òu]" = oro + "ὄψις -εως [òpsis -eos]" = vista, occhio: riferimento al colore degli occhi.

Culicoides spp. Dal latino "culex -icis" = zanzara + dal greco "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, figura: che ha l'aspetto di una zanzara.

Simulium spp. Dal latino "simulus -a, -um" = un po' appiattito, leggermente rincagnato: riferimento alla forma tozza dell'insetto.

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore

Tabella 7. Alfabeto Greco

Maiuscola	Minuscola	Nome	Translitterazione	Esempio
Α	α	alpha	a	ἀηδής = *spiacevole*
Β	β	beta	b	βίος = *vita*
Γ	γ	gamma	g/n	γόνιμος = *generativo*
Δ	δ	delta	d	δενδρίτης = *arboreo*
Ε	ε	epsilon	e	εἶδος = *aspetto*
Ζ	ζ	zeta	z	ζώον = *essere vivente*
Η	η	eta	e	ἦπαρ = *fegato*
Θ	θ – ϑ	theta	th	θ(ϑ)άνατος = *morte*
Ι	ι	iota	i	ιξώδες = *viscoso, tenace*
Κ	κ	kappa	k	κεφαλή = *testa*
Λ	λ	lambda	l	λεπίς = *squama*
Μ	μ	mi	m	μετά = *dopo*
Ν	ν	ni	n	νάνος = *nano*
Ξ	ξ	xi	x	ξένος = *straniero*
Ο	ο	omikron	o	ὄρχις = *testicolo*
Π	π	pi	p	παρά = *presso, vicino*
Ρ	ρ	rho	r	ῥάβδος = *bastone*
Σ	σ – ς	sigma	s	στρογγύλος = *arrotondato*
Τ	τ	tau	t	τρύπανον = *trapano*
Υ	υ	hypsilon	y/u	υμήν = *membrana*
Φ	φ	phi	ph	φύλλον = *foglia*
Χ	χ	chi	ch	χώρα = *regione*
Ψ	ψ	psi	ps	ψευδής = *falso*
Ω	ω	omega	o	ὠκύς = *veloce*

In greco antico, ma non solo, la lettera θ (theta minuscola) può avere la forma grafica: ϑ.

La lettera σ (sigma minuscola) quando al termine di una parola ha la seguente forma grafica: ς.

La lettera γ (gamma minuscola) quando precede un'altra γ o una κ (kappa) o una ξ (xi) o una χ (chi) è translitterata e pronunciata come: n; esempio: ἄγγελος -ου [àngelos -ou] = messaggero.

La lettera υ (hypsilon minuscola) è translitterata con y tranne quando fa parte di dittonghi; in tal caso

è trascritta con u; esempio: αυ, ευ, ου = au, eu, ou.

La lettera γ (gamma) è sempre dura come nelle parole italiane: gusto, ghiro.

La lettera ζ (zeta) è sempre dolce come nelle parole italiane: pranzo, razzo.

11. FONTI BIBLIOGRAFICHE

La bibliografia è suddivisa nelle seguenti parti: Libri/Manuali, Malaria, Babesiosi, Leishmaniosi, Tripanosomiasi Africana, Tripanosomiasi Americana, Filariosi ematiche.

In ciascuna parte le citazioni sono presentate in ordine cronologico di pubblicazione.

Con l'eccezione delle voci 2, 4, 6, 7, 8, 9, 11 e 15, tutti i lavori citati sono reperibili in Internet.

Libri/Manuali

1. Coatney GR, Collins WE, Warren M, Contacos PG. **The Primate Malarias**. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda MD, 1971. (Versione digitale: Sullivan J, Nolan G, Ward L. Division of Parasitic Disease, CDC Atlanta GA, 2003).
2. Golvan YJ, Ambroise-Thomas P. **Les Nouvelles techniques en parasitologie et immuno-parasitologie**. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1994.
3. Petithory JC, Ardoin-Guidon F. Parasites Sanguins. Cahier de Formation N° 23, Bioforma, Paris, 2001.
4. Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. **Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica**. Selecta Medica, Pavia, 2001.
5. World Health Organization. Manual of basic techniques for a health laboratory-2nd ed. WHO, Geneva, 2003. https://apps.who.int/iris/handle/10665/42295
6. Scaglia M, Gatti S, Rondanelli G. **Parassiti e parassitosi umane. Dalla clinica al laboratorio**. Selecta Medica, Pavia, 2005.
7. Ash LR, Orihel C. **Atlas of Human Parasitology, 5th ed**. American Society for Clinical Pathology Press, Chicago, IL, 2007.
8. Brandonisio O, Bruschi F, Genchi C, Pozio E. **de Carneri-Parassitologia Medica e Diagnostica Parassitologica**. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2012.
9. Garcia LS. **Diagnostic Medical Parasitology – 6th Ed**. ASM Press, Washington, DC, 2016.
10. Cancrini G. **Parassitologia medica illustrata. 3ª ed**. Edizioni EDRA, 2017.
11. GISPI. Orientamenti Diagnostici e Terapeutici in Patologia di Importazione-3ª Edizione. SIMET, 2017.
12. Bruschi F, Gradoni L editors. The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases. Springer International Publishing, 2018.

Malaria

13. Wilcox A. **Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man**. U.S. Department of Health, Education and Welfare,Washington DC. 1960.
14. Corbellini G, Merzagora L. **La malaria tra passato e presente. Storia e luoghi della malattia in Italia**. 1998; Editore Università di Roma "La Sapienza".
15. World Health Organisation. **Bench aids for the diagnosis of malaria infections**. WHO. 2000.
16. Wongchotigul V, Suwanna N, Krudsood S *et al*. **The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites**. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2004; 35(3): 552-559.

17. Petithory JC, Ardoin-Guidon F, Ash LR. Rapid and Inexpensive Method of Diluting Giemsa Stain for Diagnosis of Malaria and Other by Blood Parasites. J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 528.
18. Bigaillon C, Fontan E, Cavallo JD et al. **Ineffectiveness of the Binax NOW Malaria Test for diagnosis of *P. ovale* malaria**. J Clin Microbiol. 2005; 43(2): 1011.
19. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N *et al*. **Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9**. PNAS. 2007; 104(6): 1919–1924.
20. Boccolini D, Romi R, Majori G et al. **Lineamenti epidemiologici della malaria d'importazione in Italia (2002-2006)**. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità. 2007; 20(2): 3-7.
21. Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. **Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections**. Malaria Journal. 2009; 8: 73.
22. Romi R, Boccolini D, Majori G et al. **Malaria surveillance in Italy: the 2000-2008 national pattern of imported case**. Giornale Italiano di Medicina Tropicale. 2010; 15: 1-4.
23. World Health Organisation. **Basic Malaria Microscopy-2nd ed**. WHO. 2010.
24. Proux S, Snounou G et al. **Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection**. Malaria Journal. 2011; 10: 323.
25. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF *el al*. **Clinical and molecular aspects of malaria fever**. Trends Parasitol. 2011; 27(10): 442-449.
26. Capizzi B, Suppi R, Graziani MS. **Due casi di malaria diagnosticati incidentalmente con un analizzatore ematologico**. Biochim Clin. 2012; 36(3): 204-208.
27. Romi R, D Boccolini D, Menegon M, Rezza G. **Probable autochthonous introduced malaria cases in Italy in 2009–2011 and the risk of local vector-borne transmission**. Euro Surveill. 2012; 17(48): pii: 20325.
28. Ministero della Salute. **Malaria**. Informativa n.94 dicembre 2012. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1879_allegato.pdf
29. Singh B, Daneshvar C. **Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi***. Clin Microbiol Rev. 2013; 26: 2:165.
30. Norgan AP, Arguello HE, Sloan LM et al. A method for reducing the sloughing of thick blood films for malaria diagnosis. Malar J. 2013; 12: 231.
31. Ruizendaal E, Dierickx S, Grietens KP. et al. **Success or failure of critical step in community case management of malaria with rapid diagnostic tests: a systematic review**. Malar J. 2014; 13: 229.
32. Lee PC, Chong ET, Anderios F *et al*. **Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNex™ multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR**. Malar J. 2015; 14: 28.
33. Ministero della Salute. **Decreto 2 novembre 2015: Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti**. G.U. 28 dicembre 2015. https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/12/28/15A09709/sg
34. Inyushin M, Kucheryavih Yu., L. Kucheryavih L *et al*. **Superparamagnetic Properties of Hemozoin**. Sci Rep. 2016; 6 : doi: 10.1038/srep26212.

35. Ministero della Salute. **Circolare "Prevenzione e controllo della malaria in Italia"**. 27 dicembre 2016. https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2016&codLeg=57366&parte=1%20&serie=null
36. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. **Prise en charge et prévention du paludisme d'importation**. SPILF. 2017.
37. Mathison BA, Pritt BS. **Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization**. J Clin Microbiol. 2017; 55(7): 2009-2017.
38. World Health Organization. **Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015–2016)**. WHO. 2017.
39. Jimenz A, Rees-Channer RR, Perera R *et al.* **Analytical sensitivity of current best-in-class malaria rapid diagnostic tests**. Malar J. 2017; 16(1): 128.
40. Ponce C, Kaczorowski F, Perpoint T *et al.* **Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting**. Parasite. 2017; 24: 53.
41. Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH *et al.* **Nested multiplex PCR for identification and detection of human *Plasmodium* species including *Plasmodium knowlesi***. Asian Pac J Trop Med 2017; 10(3): 299–304.
42. European Centre for Disease Prevention and Control. **Epidemiological update-indigenous *Plasmodium falciparum* malaria cases in the Apulia region, Italy**. 2017. https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-indigenous-plasmodium-falciparum-malaria-cases-apulia-region
43. Centro Nazionale Trapianti. **Protocollo per la valutazione di idoneità del donatore di organi solidi**. CNT. 2017.
44. Yerlikaya S, Campillo, A, Gonzalez IJ. **A Systematic Review: Performance of Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* Monoinfections in Human Blood.** J Infect Dis. 2018, 218(2): 265-276.
45. Cheaveau J, Nguyen H, Chow B, Marasinghe D *et al.* **Clinical Validation of a Commercial LAMP Test for Ruling out Malaria in Returning Travelers: A Prospective Diagnostic Trial**. Open Forum Infect Dis. 2018; 5(11): 260.
46. Singh G, Raksha, Urhekar AD. **Quantitative Buffy Coat: A Useful Tool for Diagnosis of Malaria**. Int J.Adv Microbiol Health Res. 2018; 2(3): 31-36.
47. Amir A, Wen Cheong F, Ryan de Silva J *et al.* **Laboratory challenges of *Plasmodium* species identification in Aceh Province, Indonesia, a malaria elimination setting with newly discovered *P. knowlesi***. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(11): e0006924.
48. Zammarchi L, Di Lauria N, Bartalesi F *et al.* **Cryptic severe *Plasmodium falciparum* malaria in a Moroccan man living in Tuscany, Italy, August 2018**. Euro Surveill. 2018; 23(41): doi: 10.2807/1560-7917.
49. Mangano V, Perandin F, Tiberti N *et al.* **Risk of transfusion-transmitted malaria: evaluation of commercial ELISA kits for the detection of anti-Plasmodium antibodies in candidate blood donors**. Malar J. 2019; 18(17): https://doi.org/10.1186/s12936-019-2650-0.
50. World Health Organization. **False-negative RDT results and *P. falciparum* histidine-rich protein 2/3 gene deletions**. WHO. 2019.

associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

51. World Health Organisation. **World Malaria Report 2019**. WHO. December 4, 2020. https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721
52. World Health Organisation. **World Malaria Report 2020. 20 years of global progress & challenges**. WHO. November 30. https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791
53. W orld Health Organization. **Guidelines for malaria**. WHO. February 16, 2021. https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria
54. World Health Organization. **Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021** update. WHO. July 19, 2021. https://www.who.int/publications/i/item/9789240031357
55. World Health Organisation. **World Malaria Report 2021**. WHO. December 6, 2021. https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496
56. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Diagnostic Procedures for Blood Parasitology**. https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/index.html (ultimo accesso: 15 dicembre 2021).

Babesiosi

57. Sanders M. ***Ixodes dammini*: A Junior Synonym for *Ixodes scapularis***. EID. 1998; 4(1): 132.
58. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Teleford SR III. **Babesiosis**. Clin Microbiol Infect. 2000; 13(3): 451-469.
59. Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. **Human Babesiosis**. Infect Dis Clin North Am. 2008; 22(3): 469–ix.
60. Leiby DA. **Transfusion-Transmitted *Babesia* spp.: Bull's-Eye on *Babesia microti***. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(1): 14-28.
61. Martinot M, Zadeh MM, Hansmann Y. **Babesiosis in Immunocompetent Patients, Europe**. EID. 2011; 17(1): 114-116.
62. Lempereur L, Shiels B, Heyman P *et al*. **A retrospective serological survey on human babesiosis in Belgium**. Clin Microbiol Infect. 2015; 21: 96.e1–96.e7.
63. Ord RL, Lobo CA. **Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis, and Treatment**. Curr Clin Micro Rpt. 2015; 2: 173–181.
64. Al-Hosary AAT. **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Diagnosis of Bovine Babesiosis (*Babesia bovis* infection) in Egypt**. J Adv Vet Res. 2017; 7(3): 71-74.
65. Saetre K, Godhwani N, Maria M *et al*. **Congenital Babesiosis After Maternal Infection with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti***. JPIDS. 2018; 7(1): e1–e5.
66. Bloch EM, Kasubi M, Levin A *et al*. ***Babesia microti* and Malaria Infection in Africa: A Pilot Serosurvey in Kilosa District, Tanzania**. Am J Trop Med Hyg. 2018; 99(1): 51–56.
67. Bloch EM, Kumar S, Krause PJ. **Persistence of *Babesia microti* Infection in Humans**. Pathogens. 2019; 8: 102; doi:10.3390.
68. Krause PJ. **Human Babesiosis**. Int J Parasitol. 2019; 49: 165–174.

Leishmaniosi

69. Chappuis F, Rijal S, Soto A *et al*. **A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis**. BMJ. 2006; 333: 723.
70. Lukes J, Mauricio IL, Schönian G *et al*. **Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy**. PNAS. 2007; 104(22): 9375–9380.
71. Antinori S, Calattini S, Longhi E *et al*, **Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature**. Clin Infect Dis. 2007; 44(12): 1602-10.
72. World Health Organisation. **Control of the Leishmaniases. Technical Report N° 949**. WHO. 2010.
73. Richter J, Hanus I, Häussinger D. **Mucosal *Leishmania infantum* infection**. Parasitol Res. 2011; 109(3): 959-62.
74. Maia Z, Lirio M, Mistro S *et al*. **Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis**. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(1): e1484.
75. Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodriguez-Granger J *et al*. **Diagnosis of leishmaniasis**. J Infect Dev Ctries. 2014; 8(8): 961-972.
76. Boelaert M, Verdonck K, Menten J. **Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease (Review).** CDSR. 2014; 6: doi10.1002/14651858.
77. de Ruiter CM, van der Veer C, Leeflang MM *et al*, **Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic**. JCM. 2014; 52(9): 3147-3155.
78. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. **Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management.** Am J Clin Dermatol. 2015;16(2): 99-109.
79. Ashrafmansouri M, Sarkari B, Hatam G. **Utility of Western Blot Analysis for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis**. Iran J Parasitol. 2015; 10(4): 599-604.
80. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M *et al*. **Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH).** Clin Infect Dis. 2016; 63(12): 1539-1557.
81. Seyyedtabaei SJ,Rostami A, Haghighi A. **Detection of Potentially Diagnostic *Leishmania* Antigens with Western Blot Analysis of Sera from Patients with Cutaneous and Visceral Leishmaniasis**. Iran J Parasitol. 2017; 12(22): 206-214.
82. Varani S, Ortalli M, Attard L *et al*. **Serological and molecular tools to diagnose visceral leishmaniasis: 2-years' experience of a single center in Northern Italy**. PLoS ONE, 2017; 12: e0183699.
83. Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M. **Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European region**. WHO. 2017.
84. Burza S, Croft SL, Boelaert M. **Leishmaniasis**. Lancet. 2018; 392(10151): 951-970.

associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

85. Sarkari B, Rezaei Z, Mohebali M. **Immunodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Challenges: A Review Article**. Iran J Parasitol. 2018; 13(3): 331-341.
86. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP *et al*. **Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain.** PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(3): e0006277.
87. Heidari S, Gharechahi J, Mohebali M *et al*. **Western Blot Analysis of *Leishmania infantum* Antigens in Sera of Patients with Visceral Leishmaniasis**. Iran J Parasitol. 2019; 14(1): 10-19.
88. Zanetti AS, Camila Massae Sato CM, Gulin Longhi F *el al*. **Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review.** Rev Inst Med Trop São Paulo. 2019; 61: dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961042.
89. Najafi A, Somar EA, Sayehmiri K *et al*. **Evaluation of Diagnostic Tests for Visceral Leishmaniasis in Iran: A Meta-Analysis**. JMID. 2019; 9(1): 16-22.
90. Kuhne V, Rezaei Z, Pitzinger P *et al*. **Systematic review on antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis, with a focus on East Africa**. PLOS Negl Trop Dis. 2019; 13(8): e0007658.
91. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). **Parasites-Leishmaniasis**. https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/diagnosis.html (ultimo accesso: 15 dicembre 2021).

Tripanosomiasi Africana

92. Cattand P, Miezan BT, De Raadt P. **Human African trypanosomiasis: use of double centrifugation of cerebrospinal fluid to detect trypanosomes**. Bull World Health Organ. 1988; 66(1): 83-86.
93. Ancelle T, Paugam A, Bourlioux F *et al*. **Detection of trypanosomes in blood by the Quantitative Buffy Coat (QBC) technique: experimental evaluation**. Med Trop. 1997; 57(3): 245-248.
94. Chappuis F, Stivanello E, Adams K *et al*. **Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) End-Dilution Titer and Cerebrospinal Fluid Cell Count as Predictors of Human African Trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among Serologically Suspected Individuals in Southern Sudan**. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71(3): 313–317.
95. Chappuis F , Louis Loutan L, Simarro PP *et al*. **Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis**. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(1): 133-146.
96. Simarro PP, Cecchi G, Paone M *et al*. **The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases**. Int. J. Health Geogr. 2010; 9: Art. 57.
97. World Health Organisation. **Control and surveillance of human African trypanosomiasis. Technical Report 294**, WHO. 2013.
98. Foundation for Innovative New Diagnostics. **Developing New Diagnostic Tests for Human African Trypanosomiasis. Current Status and Future Plans**. FIND. 2013; 1–20.
99. Büscher P, Mertens P, Leclipteux T *et al*. **Sensitivity and specifi city of HAT Sero-*K*-SeT, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study**. Lancet Glob Health. 2014; 2(6): e359-e363.

100. Mitashi P, Hasker E, Mumba Ngoyi DM *ete al*. **Diagnostic Accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* Detection Kit for Diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Clinical Samples**. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Sep; 7(10): e2504.

101. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V *et al*. **Human African trypanosomiasis**. Lancet. 2017; 390(10110): 2397-2409.

102. Lumbala C, Biéler S, Kayembe S *et al*. **Prospective evaluation of a rapid diagnostic test for *Trypanosoma brucei gambiense* infection developed using recombinant antigens**. PLoS Negl Trop Dis .2018; 12(3): e0006386.

103. Boelaert M, Mukendi D, Bottieaua E *et al*. **A Phase III Diagnostic Accuracy Study of a Rapid Diagnostic Test for Diagnosis of Second-Stage Human African Trypanosomiasis in the Democratic Republic of the Congo**. EBioMedicine. 2018; 27: 11–17.

104. Akazue PI, Ebiloma GU, Ajibola O *et al*. **Sustainable Elimination (Zero Cases) of Sleeping Sickness: How Far Are We from Achieving This Goal?** Pathogens. 2019; 8(3): e135.

105. Grab DJ, Nikolskaia OV, Courtioux B *et al*. **Using detergent-enhanced LAMP for African trypanosome detection in human cerebrospinal fluid and implications for disease staging**. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(8): e0007631.

106. World Health Organisation. **Human African trypanosomiasis**. https://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/ (ultimo accesso: 15 dicembre 2021).

Tripanosomiasi Americana

107. World Health Organisation. **Control of Chagas Disease. Technical Report N° 904**. WHO. 2002.

108. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E *et al*. **Maternal *Trypanosoma cruzi* Infection, Pregnancy Outcome, Morbidity, and Mortality of Congenitally Infected and Non-Infected Newborns In Bolivia**. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(2): 201–209.

109. Sanmartino F. **100 years of Chagas (1909-2009): a review, balance and perspective**. Rev Soc Entomol Argent. 2009; 68(3-4): 243-252.

110. Gomes YM, Lorena MBV, Luquetti AO. **Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(Sup. I): 115-121.

111. Sosa-Estani S, Rodolfo Viotti R, Elsa Segura EL. **Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(Sup. I): 167-180.

112. Flores-Chavez M, Cruz I, Rodrıguez M *et al*. **Comparacion de tecnicas serologicas convencionales y no convencionales para el diagnostico de la enfermedad de Chagas importada en España**. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(5): 284–293.

113. World Health Organisation. **Anti-*Trypanosoma cruzi* Assays: operational characteristics**. WHO. 2010.

114. Basile L, Jansà JM, Carlier Y *et al*. **Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system**. Euro Surveill. 2011; 16(37): pii=19968.

115. Angheben A, Anselmi M, Gobbi F *et al*. **Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence**. Euro Surveill. 2011; 16(37): pii=19969.

116. World Health Organisation. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical Report N° 975**. WHO. 2012.

117. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease)**. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26(2): 275-291.

118. Moure Z, Angheben A, Molina I *et al*. **Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries**. CMI. 2016; 22: 788-792.

119. Gottdenker NL, Chaves LF, Jose E. Calzada JE *et al*. ***Trypanosoma cruzi*** **and** ***Trypanosoma rangeli*** **co-infection patterns in insect vectors vary across habitat types in a fragmented forest landscape**. Open Parasitol J. 2016; 2(e10): doi10.1017.

120. Connersa EE, Vinetz JM, Weeks JR *et al*. **A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants**. Acta Trop. 2016; 156: 68–78.

121. Álvarez-Hernándeza A, Franyuti-Kellya GA, Díaz-López-Silva R *et al*. **Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease**. Rev Med Hosp Gen Méx. 2018; 81(3): 154-164.

122. Miranda-Schaeubinger M, Chakravarti I, Freitas Lidani KC *et al*. **Systematic Review of the Epidemiology of Chagas Disease in the Americas: a Call for Standardized Reporting of Chagas Disease Prevalence**. Curr Trop Med Rep. 2019; 6(1): 23-24.

123. Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H *et al*. **Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women**. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(10): e0007694.

Filariosi ematiche

124. Ruby JD, Hall JE. **Etymology of *Loa***. Parasitol. Today, 1991; 7(7): 173.

125. World Health Organization. **Bench Aids for the diagnosis of filarial infections**. WHO. 1997. https://www.who.int/publications/i/item/9241544899

126. Rao RU, Atkinson LJ, Ramzy RMR *et al*. **A Real-Time PCR-Based Assay for Detection of *Wuchereria Bancrofti* DNA in Blood and Mosquitoes**. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74(5): 826–832.

127. Shenoy RK. **Clinical and Pathological Aspects of Filarial Lymphedema and Its Management.** Korean J Parasitol. 2008; 46(3): 119-125.

128. Zoure HGM, Wanji S, Noma M *et al*. **The Geographic Distribution of *Loa loa* in Africa: Results of Large-Scale Implementation of the Rapid Assessment Procedure for Loiasis (RAPLOA)**. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(6): e1210.

129. World Health Organization. **Lymphatic Filariasis**. WHO. 2011.

130. Singh G, Raksha, Urhekar AD. **Advanced Techniques for Detection of Filariasis-A Review.** IJRSB. 2013; 1(1): 17-22.

131. Mullerpattan JB, Udwadia ZF, Udwadia FE. **Tropical pulmonary eosinophilia-A review**. Indian J Med Res. 2013; 138(3): 295–302.

132. Cano J, Rebollo MP, Golding N *et al*. **The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present**. Parasites Vectors. 2014; 7: Art. 466.

133. Wanji S, Amvongo-Adjia N, Njouendou AJ *et al*. **Further evidence of the cross-reactivity of the Binax NOW® Filariasis ICT cards to non-*Wuchereria bancrofti* filariae: experimental studies with *Loa loa* and *Onchocerca ochengi***. Parasites Vectors. 2016; 9: Art. 267.

134. Pedram B, Pasquetto V, Drame PM *et al*. **A novel rapid test for detecting antibody responses to *Loa loa* infections**. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(7): e0005741.

135. Gobbi F, Beltrame A, Buonfrate D *et al*. **Imported Infections with *Mansonella perstans* Nematodes, Italy**. Emerg Infect Dis. 2017; 23(9): 1539-1542.

136. Chesnais CB, Awaca-Uvon NP, Bolay FK *et al*. **A multi-center field study of two point-of-care tests for circulating *Wuchereria bancrofti* antigenemia in Africa**. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(9): e0005703.

137. Barwad A, Singh SK, Phulware R. **Breast filariasis**. IDCases. 2018; 14: e00453.

138. Kelly-Hope LA, Blundell HJ, Macfarlane GL *et al*. **Innovative Surveillance Strategies to Support the Elimination of Filariasis in Africa**. Trends Parasitol. 2018; 34(8): 694-711.

139. Ta-Tang TH, Crainey JL, Post RJ *et al*. **Mansonellosis: current perspectives**. Res Rep Trop Med. 2018; 9: 9–24.

140. Akue JP, Eyang-Assengone ER, Dieki R. ***Loa loa* infection detection using biomarkers: current perspectives**. Res Rep Trop Med. 2018; 9: 43–48.

141. The Carter Center. **Onchocerciasis Transmission in the Americas**. https://www.cartercenter.org/resources/pdfs/health/river_blindness/OEPA-foci.pdf (ultimo accesso: 15 dicembre 2021).

142. World Health Organization. **Lymphatic filariasis**. https://www.who.int/lymphatic_filariasis/en/ (ultimo accesso: 15 dicembre 2021).

associazione microbiologi clinici italiani
Ente del Terzo Settore