

## !!!! LEISHMANIA !!!!

Protozoo flagellato, trasmesso da un vettore biologico, ossia un FLEBONTO ( Dittero ematofago) che possiede una zoofilia pronunciata, in quanto esegue il suo pasto di sangue su animali. È un EMOFLAGELLATO, DIXENO.

Possiede due forme:

- Amastigote: all'interno dell'ospite definitivo.
- Promastigote: all'interno del vettore ematofago.

Vi sono diverse specie di LEISHMANIE patogene per l'uomo le cui caratteristiche morfologiche, metaboliche ed epidemiologiche, si possono sovrapporre in larga misura, imponendone la classificazione in "complessi", definiti sulla base della estrinsecazione clinica della patologia indotta.

1. **Complesso LEISHMANIA DONOVANI:** comprende le specie considerate responsabili della leishmania VISCERALE. Tale complesso, possiede dei sotto complessi con leishmanie sia di interesse medico che veterinario. Di importanza maggiore sono:
  - a. Donovanii Donovanii: leishmaniosi viscerale indiana.
  - b. Donovanii Infantum: Leishmaniosi viscerale medio orientale e Mediterranea.
  - c. Il complesso leishmania DONOVANI, i parassiti diffondono rapidamente dal punto di inoculazione invadendo le cellule del reticolo-endoteliale e parenchimali, soprattutto MILZA, FEGATO, LINFONODI e MIDOLLO OSSEO.
2. **Complesso LEISHMANIA TROPICA:** comprende le specie considerate responsabili di LEISHMANIOSI CUTANEA del VECCHIO MONDO. Comprende sotto specie differenti in base al clima che ci presenta (MAJOR, MINOR e AETHIOPICA).
3. **Complesso LEISHMANIA MEXICANA e LEISHMANIA BRAZILIENIS:** comprende le specie considerate responsabili della LEISHMANIOSI CUTANEA del NUOVO MONDO e MUCOCUTANEA.
4. Il complesso LEISHMANIA TROPICA e BRAZILIENIS i protozoi inoculati sotto forma di promastigote, vengono fagocitati localmente dagli elementi del reticolo-endoteliale, in cui si moltiplicano per scissione binaria sotto forma di AMASTIGOTE, provocando la lisi della cellula ospite e la diffusione per continuità di infezione.

## \_\_Agente eziologico e ciclo vitale\_\_

Le differenti specie sono morfologicamente indistinguibili tra loro in microscopia ottica, sia all'interno dello stesso gruppo, che tra due gruppi differenti.

Le differenze ultrastrutturali identificate in microscopia elettronica sono di lieve entità e non utili ai fini diagnostici di routine.

Le differenze tra i complessi viene effettuata sulla base delle caratteristiche cliniche ed epidemiologiche, mentre la diagnosi differenziale intracomplexo si avvale di tecniche SIEROLOGICHE.

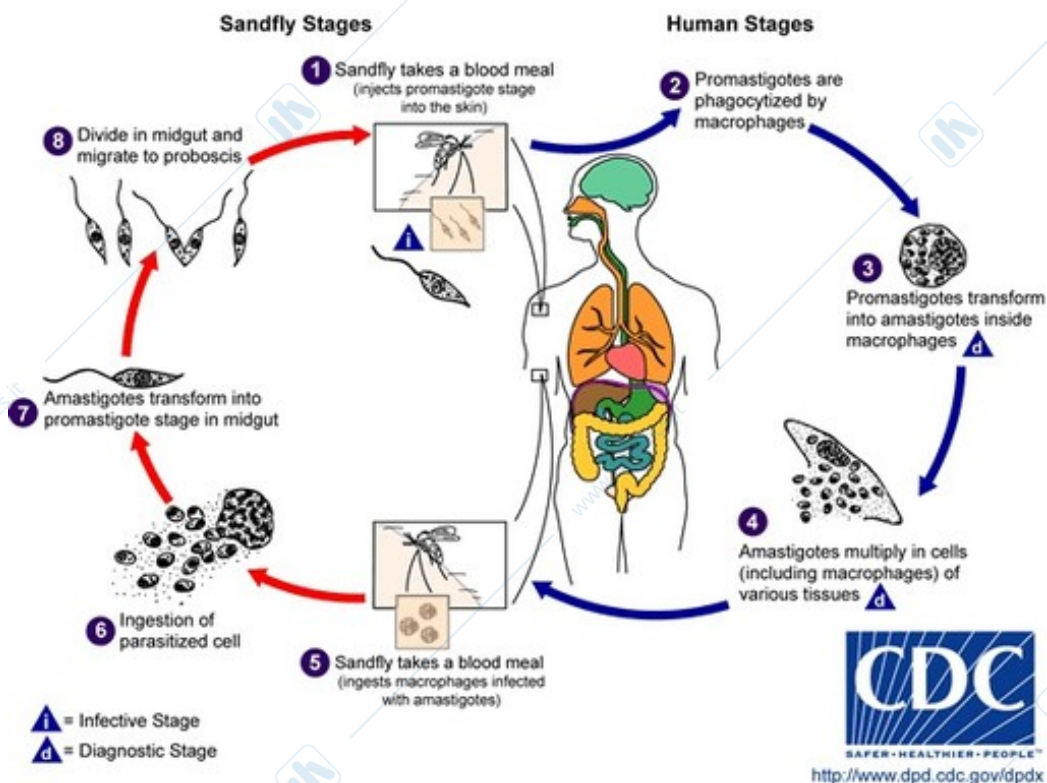
Il ciclo vitale di TUTTE le LEISHMANIE prevede solamente la forma:

- AMASTIGOTE: nell'ospite vertebrato.
- PROMASTIGOTE: nell'insetto vettore ed in coltura.

In Europa, Asia ed Africa, le leishmanie sono veicolate da insetti vettori ematofagi del genere PHLEBOTOMUS.

In America è trasmessa da insetti del genere LUTZOMYIA, che assumono il protozoo sotto forma di AMASTIGOTE durante un pasto ematico, e lo trasmettono sotto forma di PROMASTIGOTE.

## Ciclo Vitale



- Viene trasmessa per mezzo del morso delle mosche di flebotomine di sesso femminile infette. Le quali durante un pasto di sangue, la mosca vola iniettando PROMASTIGOTI MATECICLICI in stato infettivo per mezzo della proboscide.
- I promastigoti sono fagocitati dai macrofagi ed altre cellule fagocitarie mononucleate.
- In queste cellule i promastigoti si trasformano in AMASTIGOTI (Stadio tissutale all'interno dell'ospite vertebrato).
- Gli amastigoti si dividono per scissione binaria, ed infettano altre cellule fagocitarie mononucleate.
- Durante un pasto successivo su un'ospite infetto, i flebonti vengono infettati attraverso l'ingestione di macrofagi infettati con amastigoti.
- Gli amastigoti, si trasformano in PROMASTIGOTI PROCICLICI, all'interno dell'intestino del vettore, questi si riproducono e dai dei PROMASTIGOTI MATURI, ma NON infettanti, migrano nel TERZO MEDIALE dell'INTESTINO e nei pressi della VALVOLA ESOFAGEA dove soggiornano al suo interno fino al prossimo pasto.

- Durante il pasto, il sangue entra dentro l'intestino dove viene lisato e vengono liberate le forme NECTOMONADI le quale dopo 48H risalgono e vanno contro gradiente alla ricerca di nutrimenti nella porzione anteriore dell'intestino.
- Si trasformano in forme LEPTOMONADI.
- Le forme LEPTOMONADI danno in parallelo delle forme METACICLICHE che sono quelle mature, localizzate a livello della parte anteriore del corpo.

## \_\_ Patogenesi e forme cliniche \_\_

### \_\_ Leishmaniosi Viscerale \_\_

In corso di LEISHMANIOSI VISCERALE, il sistema reticolo-endoteliale è ricco di macrofagi, evidentemente non attivati da un efficace risposta linfocitaria, dove al loro interno vi sono numerosi protozoi in forma di AMASTIGOTE.

Successivamente ad un incubazione di 2-3 settimane, si osserva un interessamento clinico generalizzato, con FEBBRE, EPATOSPLENOMEGALIA, LINFOADENOMEGALIA, IPERPLASIA MACROFAGICA del MIDOLLO OSSEO con interessamento delle tre serie EMPOIETICHE (Anemia, leucopenia e trombocitopenia). Si osserva anche l'insorgere di NEFRITE per la formazione di immunocomplessi.

Nelle forme più acute della malattia, lo stadio finale si presenta dopo 3-4 settimane, ma normalmente la malattia possiede un decorso subacuto-cronico di diversi mesi.

Negli ultimi anni si osservano casi di leishmaniosi VISCERALE in pazienti IMMUNOCOMPROMESSI soprattutto con AIDS, nei quali, la forma clinica risulta essere particolarmente severa e prolungata e la risoluzione terapeutica molto difficile.

### \_\_ Leishmaniosi viscerale DIAGNOSI \_\_

Il GOLD STANDARD è la SIERODIAGNOSI associata all'ANALISI dell'ASPIRATO MIDOLLARE mediante puntura sternale o iliaca, in quanto, in tal modo, la diagnosi risulta essere ASSOLUTA.

1. Test sierologico di LEUCOGELIFICAZIONE: il test risulta essere aspecifico, mette in evidenza la presenza di IgG, ma non ne deduce la causa. Si esegue una scomposizione del sangue mediante centrifugazione, si preleva il PLASMA e si aggiunge PARAFORMALDEIDE. In presenza di elevata [] di IgG non vi è un riadattamento del volume, poiché il plasma è stato gelificato dal fissativo.
2. Test di Agglutinazione diretta (DAT): è un test che si basa sulla reazione Antigene-Anticorpo. Gli antigeni utilizzati e fissati come substrato sono PROMASTIGOTI, trattati con TRIPSINA, FISSATI e PRESERVATI con la FORMALINA, i quali presentano agglutinazione in caso di presenza di ANTICORPI SPECIFICI presenti nel siero del paziente. Si eseguono delle diluzioni seriali di 50 uL per determinare una [] di risposta. I

tempi di esecuzione sono abbastanza lunghi, non si riesce a distinguere tra MALATTIA PREGRESSA o in CORSO. NON possiede un valore PROGNOSTICO.

3. ELISA: è un'importante sierodiagnosi per la leishmania, è un test altamente sensibile, e la sua specificità dipende dall'antigene utilizzato. Il saggio immunoenzimatico (ELISA) si basa su questo riconoscimento selettivo e specifico anticorpo-antigene. Sono stati realizzati vari tipi di test ELISA, sia qualitativi che quantitativi. L'esecuzione di un test ELISA prevede l'uso di almeno un anticorpo specifico per ogni particolare antigene. Il principio di fondo è che una di queste componenti immunologiche venga immobilizzata su una fase solida, le cavità di una micropiastra. L'analita prelevato dal campione interagisce con il sistema anticorpo-antigene. Questa interazione può essere visualizzata mediante enzimi, legati a anticorpi o antigeni secondari, e indicano se si è creato il legame anticorpo-antigene. Si aggiunge un substrato che viene convertito dal complesso enzima-anticorpo producendo un cambiamento della colorazione, che è misurabile con uno spettrofotometro.
4. Immunofluorescenza Indiretta (IFAT): è una delle tecniche più avanzate rispetto alle precedenti, e si basa su un'iterazione antigene (fissato in fase solida) ed anticorpo presente all'interno del siero del paziente. Il complesso formatosi, viene reso visibile per mezzo di un anticorpo secondario marcato con un fluoroforo. Possiamo andare a ricerca sia IgG che IgM per mezzo di un microscopio ottico a fluorescenza.
5. DPP Test o Test Rapidi: si basa sulle stesse condizioni delle precedenti, si utilizza sangue intero o plasma, il quale migra per mezzo dell'aggiunta di un tampone di corsa. Si risconterà la presenza di bande, dove sono adesi antigeni specifici (Banda di malattia) ed antigeni generici (Banda di controllo). La formazione del substrato, con la presenza di due bande indicherà la positività per il test.

### Leishmaniosi Cutanea

Andiamo a distinguere due tipologie di Leishmaniosi, ovvero quella cutanea del NUOVO MONDO e del VECCHIO MONDO.

Anche in tal caso, riscontriamo in base al target della pelle dell'ospite, a seconda che sia un animale o un uomo, 3 forme:

- Leishmania cutanea ZOONOTICA:
  - o LEISHMANIA TROPICA.
- Leishmania cutanea ANTROPONOTICA:
  - o LEISHMANIA MAJOR.
  - o LEISHMANIA AETHIOPICA.
- Leishmania cutanea e mucocutanea ZOONOTICA AMERICANA.
  - o Numerose specie di LEISHMANIA.

1. Leishmaniosi cutanea del VECCHIO MONDO: possiede un periodo di incubazione molto lungo dalle 4-8 settimane circa, dove appare la tipica lesione a bottone in sede di inoculo, generalmente sulle porzioni scoperte. La lesione ha aspetto papulo-nodulare non ulcerato oppure esordisce come MACULA ULCERATA al centro che si estende per continuità nei tessuti circostanti. Essa può infettarsi per sovrainfezione batterica.
2. Leishmaniosi cutanea del NUOVO MONDO e MUCOCUTANEA: si intende una molteplicità di patologia mucocutanee causate dalle specie appartenenti al complesso LEISHMANIA MEXICANA e LEISHMANIA BRAZILENIS e generalmente localizzate nelle porzioni scoperte. Vi sono necrosi di pareti vasali e fenomeni liquefattivi delle cartilagini nasali.

### **Prevenzione Leishmaniosi con vaccino sui cani**

Al momento non vi sono vaccini per i cani, che possiedono una copertura del 100%, la ricerca si muove a tal proposito, ma non è semplice da mettere in atto.

- Si progettano delle formulazioni di vaccino in base alle nozioni di biologia Molecolare.
- Si esegue una sperimentazione in vitro, quindi su modelli cellulare senza coinvolgimenti animali.
- Si passa successivamente ad una sperimentazione su animale.
- Si giunge quindi, ad una fase pre-clinica che è una sperimentazione su una corte di volontari, nel momento in cui, tutti i passaggi precedenti sono stati validati.
- Si osservano gli effetti su un numero relativamente basso di soggetti, traendo una conclusione, se la vaccinazione creta ha una buona copertura.

### **Falsi miti sulla Leishmaniosi**

- La malattia nella sua declinazione canina non risulta essere grave: se la si cura in maniera adeguata, si cronicizza, ma non si guarisce.
  - o Vi sono casi, di malattia aggressiva che ne compromette la funzionalità renale, portando il cane alla morte.
- Se il cane risulta essere infetto, non ha più bisogno di misure di protezione contro i pappatacei: i cani, devono essere sempre protetti dai flebonti perché pungendo un cane infetto, vi è la trasmissione. Dobbiamo utilizzare una protezione di massa.
- Un cane colpito da leishmaniosi può essere pericoloso per le persone: in quanto zoonosi può essere trasmessa anche agli esseri umani, ma è sempre necessaria la presenza di un Flebonte, in quanto ospite intermedio.
- Vi è un'emergenza epidemiologica di leishmaniosi nella popolazione umana: non risulta essere vero, in quanto bisogna porre attenzione alla popolazione canina.
- Per prevenire le punture del flebonte, risulta essere sufficiente qualsiasi prodotto antiparassitario: tale non risulta essere vero in quanto il feeding dei flebonti non risulta essere come quello di zecche o pulci.

## Sistema difensivo nei confronti dell'Insetto

L' insetto cercherà di difendersi la protozoo, per mezzo di:

- **Barriere fisiche:** ve ne sono diverse all'interno dell'insetto:
  - la MEMBRANA PERITROFICA rappresenta una barriera fisica dell'insetto durante il pasto di sangue.
  - La CUTICOLA ovvero una protezione esterna, finalizzata a produrre un ESOSCHELETRO all'interno dell'insetto, in quanto, i muscoli si trovano della porzione più interna del vettore, al suo esterno vi è lo scheletro. Necessitano quindi di una protezione maggiore.
  - PORZIONE CHITINOSA: prodotta intorno al substrato alimentare.
  - ENZIMI DIGESTIVI: poiché i protozoi si trovano a livello del tratto del digerente, dove sono a contatto con gli enzimi digestivi i quali lisano la porzione figurata del sangue, ma NON riesco ad attaccare questi parassiti, i quali sono resistenti..
    - Per mezzo della motilità flagellare e la capacità di riconoscere i determinanti di adesione tipici di ogni distretto corporeo, riescono ad evitare l'escrezione del pasto di sangue dell'insetto.
    - Non posso essere assorbiti dall'intestino, in quanto si spostano nella parte anteriore.
  - IL PARASSITA NON DEVE VARCARA ALCUNA BARRIERA FISICA.
- **Immunità innata:** essi possiedono un loro sistema immunitario che opera attraverso due meccanismi:
  - CELLULARE: Isolamento del NON SELF.
    - INCAPSULAMENTO MELANOTICA: è una reazione che prevede un isolamento fisico, dove per mezzo di una CUTICOLA, la quale ha la funzione di protezione ed inibizione degli scambi metabolici con l'organismo parassitato. Prevede l'OSSIDAZIONE dei POLIFENOLI che sono in soluzione nell'EMOCELE.
    - FAGOCITOSI: possiedono delle cellule simili ai macrofagi.
  - UMORALE: difesa contro il protozoo mediata da CELLULE:
    - Si trovano delle cellule a livello dell'emolinfa che producono LINFOCHINE e MOLECOLE TOSSICHE se vi è il riconoscimento di qualcosa di estraneo. Le molecole possiedono un'azione battericida, volte ad inibire la crescita dei batteri negli insetti o altri patogeni procarioti ed hanno in taluni casi effetti contro i protozoi.

- **INCAPSULAMENTO UMORALE:** apposizione di molecole attive per far sì che gli scambi metabolici non avvengano, facendo un capping di molecole solubili sulla superficie.

### Meccanismi di EVASIONE dall'Insetto

- **INGESTIONE:** Per poter trasmettere la malattia il parassita deve eludere le barriere difensive dell'insetto, **SOPRAVVIENDO** in un primo momento al pasto di sangue, dove, mediante l'azione delle **CHITINASI** vi è la rottura della membrana **PERITROFICA**.
  - In un secondo momento, devono resistere agli enzimi digestivi, attraverso il rilascio di **GLICOCOAGNUGATI** e **PROTEOGLICANI**.
- **PROLIFERAZIONE:** Adesione per mezzo di una molecola di membrana **LPG**, nell'epitelio intestinale, e successive adesioni in altri distretti.
  - Tali molecole possono essere un punto chiave per la lotta contro la replicazione della leishmania all'interno del vettore.
- **MIGRAZIONE:** il parassita deve migrare a livello dell'intestino anteriore, e restare in attesa che il flebotomo, rigurgiti una porzione del contenuto dello stomaco, durante il pasto.

### Meccanismi di EVASIONE nell'UOMO

La leishmania riesce ad eludere il sistema immunitario dell'uomo mediante l'induzione di due meccanismi:

- Immunosoppressione.
- Promozione di funzione pro-parassitari: ovvero stimola azioni, da parte del nostro sistema immunitario, che finiscono per promuovere la sopravvivenza del parassita.

Tali sono correlate alla presenza di due molecole sul **GLICOCALICE** del parassita, **Ovvero: LPG e gp63.**

I promastigoti, sono ricoperti dal **GLICOCALICE**, ossia un denso plesso **FILAMENTOSO** costituito da **GLICOCONIUGATI** e **PROTEOGLICANI** legati alla superficie cellulare da **GLICOSILFOSFATIDILINOSITOLO** o **GPI**.

Il GPI è costituito da **LPG** (lipofosfoglicani) e **gp63** (proteasi).

Struttura **LPG** → è **POLIMORFICA**, ovvero costituita da una catena **OLIGOSACCARIDICA** che differisce da specie a specie ed un **CORE OLIGOSACCARIDICO** e **LIPIDI** di **ANCORAGGIO**, uguale in tutte le specie.

**LPG** e **gp63** svolgono ruoli multifattoriali nella sopravvivenza del parassita, all'interno dei fagociti ovvero:

- **LPG** inibisce la **FUSIONE** tra **LISOSOMA** e **FAGOSOMA**.

- In caso di avvenuta fusione gp63 INATTIVA gli enzimi lisosomiali.
- Inibizione della respirazione cellulare dopo la fagocitosi, deficit respiratorio e successiva lisi.
- LPG e gp63 bloccano l'ossidazione per alterazione dell'attivazione della PROTEIN KINASI C inibendo lo stress ossidativo.

Vi sono ulteriori modi di promozione della sopravvivenza da parte del parassita:

- Inibizione dell'APOPTOSI ed ESPRESSIONE delle molecole MCH di classe I e II.
- Modulazione della produzione di mediatori immunologici attraverso la produzione di citochine in grado di modificare l'attività dei linfociti T, macrofagi, cellule NK.
- Inibizione dell'ATTIVAZIONE del complesso del complemento.
- Gp63 CONVERTE il C3b in C3bi sulla superficie del parassita.
- Fosforila i frammenti del complemento C3, C5, C9.

Per mezzo di tali modificazione, il parassita riesce a colonizzare le cellule in maniera elusiva, il macrofago li internalizza ma non riesce ad effettuare la LISI (solo FAGOCITOSI) e questi al posto di essere uccisi, riescono a PROLIFERARE.