Azienda USL della Romagna - A.O.O. Cesena
U.O. Direzione Medica di Presidio; U.O. Direzione Medica Cen
E - 30/07/2014 - Prot. N. 0031070 - 16.13.18
INDIVIDUAZIONE DEL LABORATORIO DI RIFERIMENTO
REGIONE EMILIA-ROMAGNA - DIREZIONE GENERALE SANITA'

Per conoscenza
Direzione

Per competenza
Coord. Serv. Terr.li
DSP
Coord. rete Dip. Osp.li e
reti clin. az.li
OSP.
SIT c/o OSP. RA
LU - FA
CE/FO/RN

Regione Emilia-Romagna

IL DIRETTORE GENERALE SANITÀ E
POLITICHE SOCIALI
TIZIANO CARRADORI

AOO ANNO NUMERO
REG PG 2014 276720
DEL 28 07 2014

AOO: AZIENDA USL DELLA ROMAGNA
U.O. AA.GG. E ... SANITARIA
Protocollo ...
PROT. N. 0051920 ... USCITA
DATA 28.07.2014
TIT. I CL. 2 SC. 1 FASCIC. 1

Ai Direttori generali
Ai Direttori sanitari
delle Aziende sanitarie

Ai Direttori dei Dipartimenti di Sanità Pubblica
delle Aziende Usl

della Regione Emilia-Romagna

Al CRREM Unità Operativa di Microbiologia
Policlinico S.Orsola – Malpighi
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

LORO SEDI

Oggetto: **Individuazione del Laboratorio di riferimento regionale per la diagnosi di leishmaniosi viscerale e cutanea umana.**

Nel corso del 2013, è stato registrato un aumento di casi di leishmaniosi viscerale umana in Emilia-Romagna rispetto agli anni precedenti: sono infatti stati notificati n.30 casi di leishmaniosi viscerale, rispetto a una media di 5-6 casi all'anno del periodo 2008-2012. I casi di leishmaniosi cutanea notificati in Regione sono risultati 9 nel 2013, rispetto ad una media di 3 casi/anno del periodo 2008-2012. È tuttavia probabile che molte forme cutanee dell'infezione non vengano diagnosticate o notificate.

Con oltre 20 casi la provincia di Bologna è risultata la più interessata, in particolare nelle aree della valle del Samoggia (Bazzano, Castello di Serravalle, Crespellano, Monte San Pietro, Monteveglio e Savigno), Sasso Marconi, Monterenzio, Pianoro e zone dell'Imolese. Sono stati identificati 5 casi in provincia di Rimini e 4 in quella di Modena.

Nell'ultimo anno, è stato possibile effettuare una diagnosi di specie in 13 casi di leishmaniosi viscerale: in tutti è stata identificata *Leishmania infantum* dalla Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-universitaria di Bologna.

Potrebbe, tuttavia, essere presente una sotto-diagnosi di casi di leishmaniosi viscerale, sia a causa dell' inefficienza del test di emoagglutinazione passiva per ricerca di anticorpi anti-leishmania, sia a causa della bassa sensibilità dell'esame microscopico su aspirato midollare

Viale Aldo Moro 21 tel 051.527.7161/7162 dgsan@regione.emilia-romagna.it
40127 Bologna fax 051.527.7056 PEC: dgsan@postacert.regione.emilia-romagna.it

3510 600 80 50 10 2014 1

nell'identificazione di casi di leishmaniosi viscerale per i ceppi circolanti in provincia di Bologna (*Varani et al, EuroSurveill 2013 18:20530*).

Definizione
La definizione di caso di *leishmaniosi viscerale* dell'OMS (2010) indica: "una persona che presenta sintomi clinici (febbre irregolare prolungata, splenomegalia e diminuzione di peso) con esame parassitologico positivo (microscopia, coltura o PCR) e/o sierologia positiva".

Un caso di *leishmaniosi cutanea* viene definito come:"una persona con sintomi clinici (lesione cutanea) e con una conferma diagnostica da esame parassitologico (microscopia, coltura)".

Nonostante tali definizioni permettano di classificare dal punto di vista epidemiologico un caso di leishmaniosi anche solo con una diagnosi sierologica, o microscopica, per l'identificazione corretta dei casi di leishmaniosi umana risulta utile associare la diagnosi molecolare alla diagnosi sierologica e microscopica.

Ciò si rende necessario per i seguenti motivi:

- l'esame sierologico prevede la ricerca di IgG specifiche anti-leishmania, e non è in grado di distinguere tra infezioni pregresse e in atto. Un risultato positivo al test sierologico non indica pertanto con certezza la presenza di un'infezione in atto in zone in cui la leishmaniosi è endemica e in cui la prevalenza di portatori asintomatici è elevata (7%-58% in diverse aree geografiche dell'Europa Meridionale, *Banuls et al. Clin Microb Infect 2011; 17:1451-61*);
- gli anticorpi anti-leishmania possono essere assenti nella fase iniziale di leishmaniosi viscerale e sono in genere assenti nei casi di leishmaniosi cutanea (*Bogdan C, Ann Rheum Dis 2012; 71:i60-66*);
- nel caso di leishmaniosi viscerale in individui immunocompromessi, i risultati falsamente negativi per test sierologici sono comuni (*Sundar S., Chapter 212: Leishmaniasis. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th ed., 2012; Bogdan C, Ann Rheum Dis 2011; 71:i60-66*):
- in campioni di aspirato midollare la PCR ha sensibilità più elevata rispetto all'esame microscopico per la diagnosi di leishmaniosi viscerale (*Sundar S, Chapter 212: Leishmaniasis. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th ed., 2012; Chappuis F, Nat Rev Microbiol 2007; 5:873-82*).
- la PCR ha sensibilità più elevata rispetto all'esame microscopico in campioni bioptici per la diagnosi di leishmaniosi cutanea o muco-cutanea (*Sundar S, Chapter 212: Leishmaniasis. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18ma edizione, 2012; Schwartz E, Lancet Infect Dis 2006;6:342-9*).

Per migliorare l'attività diagnostica, sia a fini clinici sia epidemiologici, si identifica pertanto il **Laboratorio di riferimento regionale per la diagnosi di leishmaniosi umana** nel laboratorio CRREM (Centro di Riferimento Regionale per le Emergenze Microbiologiche) presso l'UO Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna (tel. 051-6364316).

In tale laboratorio si effettuano:

a. **la diagnosi sierologica** di leishmaniosi viscerale e muco-cutanea mediante <u>test di primo livello</u>, cioè un test rapido immunocromatografico basato sulla proteina ricombinante rk39, proteina presente in tutti i parassiti appartenenti al *Leishmania donovani complex*. Tale test è quindi in grado di evidenziare anticorpi verso tutte le

specie di leishmania causa di leishmaniosi viscerale. Inoltre, in caso di risultato dubbio o positivo al test di primo livello o in caso di permanenza di forte sospetto diagnostico nonostante la negatività di tale test, si effettua un test di secondo livello (test di immunofluorescenza indiretta). L'immunofluorescenza indiretta permette anche una titolazione degli anticorpi presenti: in caso di leishmaniosi viscerale il confronto tra titolo anticorpale in fase acuta e nel follow up a 3, 6, 12 mesi dall'infezione risulta fondamentale nel monitoraggio post-terapia. Il materiale indicato per tale diagnosi è il siero.

b. **la diagnosi molecolare** mediante utilizzo di test in *real-time* PCR. In dettaglio, il laboratorio dispone di una PCR di genere (in grado di amplificare una porzione di DNA identica in tutte le specie di leishmania) e una PCR di specie per *L.infantum*. **L'esecuzione di test molecolari deve essere concordata con il Laboratorio di riferimento CRREM.** I materiali indicati per la diagnosi molecolare sono:

- in caso di sospetta leishmaniosi viscerale: sangue midollare e sangue periferico (minimo 3 ml di sangue in EDTA). L'esecuzione di test molecolari è indicata nei casi con sintomatologia suggestiva e positività alla ricerca di anticorpi anti-leishmania. L'esecuzione di test molecolari su sangue di pazienti sieronegativi per anticorpi anti-leishmania va concordata con il Laboratorio di Riferimento CRREM.

- In caso di sospetta leishmaniosi cutanea: biopsia a fresco. Si precisa che l'esecuzione di test molecolari per forme cutanee serve da conferma diagnostica di casi **con quadro clinico suggestivo di leishmaniosi**, quindi presenza di papule, placche, ulcere o noduli in zone esposte del corpo.

In corso d'opera sono la messa a punto di: 1) un test di PCR quantitativa per la valutazione e il monitoraggio della parassitemia in soggetti immunocompromessi, 2) PCR specifiche per *L. tropica*, *L. major* e *L. donovani*: uno studio molecolare permetterebbe infatti di monitorare l'eventuale introduzione nel nostro territorio di nuove specie di Leishmania presenti attualmente in aree geografiche limitrofe, quali *L. major* in Nord Africa, *L. tropica* in Grecia e a Cipro, e *L. donovani* a Cipro (*Ready PD. Euro Surveill 2010; 15:19505; Gradoni L. Euro Surveill 2013;18:20539).*

Il Laboratorio di riferimento regionale:

1. opera come Laboratorio di 2° livello; pertanto, tutti i campioni una volta processati nei laboratori delle Aziende sanitarie per la diagnosi diretta e/o indiretta di leishmaniosi umana dovranno essere inviati al Laboratorio CRREM per la conferma diagnostica e per l'individuazione delle specie di Leishmania;
2. agisce anche da Laboratorio di base per il proprio bacino di riferimento e in situazioni di emergenza, o in situazioni di supporto alle realtà periferiche;

3. collabora con i Servizi della Regione Emilia-Romagna, insieme alle Aziende sanitarie e all'Istituto zooprofilattico, per la sorveglianza epidemiologica della Leishmaniosi;
4. organizza la formazione per i Laboratori di base;
5. organizza, d'intesa con il Servizio Sanità pubblica della Regione Emilia-Romagna, corsi di formazione per gli operatori sanitari delle Aziende sanitarie;
6. offre supporto e consulenza alle Direzioni e ai Servizi delle Aziende sanitarie della Regione Emilia-Romagna;
7. effettua controlli di qualità intra e interlaboratorio.

Si fa presente che gli esami richiesti al laboratorio CRREM per diagnosi di leishmaniosi sono supportati da fondi regionali erogati per le funzioni svolte in quanto laboratorio regionale di riferimento e non verranno pertanto fatturati alle singole aziende sanitarie.
Si precisa infine che i campioni dovranno essere inviati al laboratorio CRREM accompagnati dalla scheda allegata compilata in ogni sua parte (le modalità di invio e l'indirizzo esatto sono descritti nella scheda di accompagnamento).
Si chiede di diffondere la presente in particolare ai Responsabili delle U.O. delle Malattie infettive, pediatria, dermatologia e dei laboratori di microbiologia delle Aziende sanitarie.

Cordiali saluti.

Tiziano Carradori

Allegato:1

16.13.18

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna

U.O. AFFARI GENERALI E LEGALI - CESENA

Trasmessa copia ad ogni conseguente effetto, anche ai fini della Legge n. 241/90 e s.m., a:

☒ DIRETTORE GENERALE	☒ Serv. Formaz. e Ricerca
☐ DIRETTORE AMM.VO	☐ DIP. SALUTE MENTALE
☒ DIRETTORE SANITARIO	☒ DIP. SANITA' PUBBLICA
☐ COLLEGIO SINDACALE	☐ DIP. CURE PRIMARIE
☐ COLLEGIO DIREZIONE	☐ DIP. TECNICO
☐ NUCLEO VALUTAZIONE	☐ UO FIS. E TECN. BIOM.
☐ DIR. DISTR. CESENA	☐ UO TECNICO-PATRIM.
☐ DIR. DISTR. RUBICONE	☐ UO SIST. INFORMATICI
☐ DIR. ATT. SOCIO-SANIT.	☐ UO ACQ. E COORD.AVR
☒ DIR. MEDICA PRESIDIO	☐ UO ECONOMATO
☒ Dir. Med. CS Pievesestina	☐ DIP. AMMINISTRATIVO
☐ DIR.ASS.FARMACEUT.	☐ UO Acc.. AccessoServ.San.
☐ DIR. FARM.CENTR.AVR	☐ UO Ge.Amm.Serv.Terr./Osp.
☐ DIR. INFERM. E TECN.	☐ UO COMMITTENZA
☐ UO PROGR.CONTR. AZ	☐ UO AFF. ECON.FINANZ.
☐ UO PUBBL. REL.E COM	☐ UO GEST. RIS. UMANE
☐ Serv. Medicina Legale	☐ UO AFFARI GEN. E LEG.

f. pc

f. pc

Data 30 LUG 2014

IL DIRETTORE
(Avv. Patrizia Casadio)

Laboratorio CRREM
Padiglione 11, primo piano
Ospedale Sant'Orsola, via Massarenti 9
40138 BOLOGNA
Tel: **051-6364316**

SCHEDA ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONE – LEISHMANIOSI

Data: _____

Si inviano i seguenti campioni per ricerca di Leishmania°:

Campione/i di ☐ sangue periferico in EDTA ☐ sangue midollare in EDTA ☐ siero

☐ Prelievo bioptico (specificare localizzazione): _____

prelevato/i il _____

DATI PAZIENTE (in stampatello)

Cognome _____ Nome _____

Sesso M ☐ F ☐ Codice fiscale _____

Nato/a il _____ a _____

Domicilio abituale _____ Contatto con cani _____

Soggiorno all'estero : *SI *NO Luogo_____ Periodo _____

PAZIENTE RICOVERATO: * SI *NO PAZIENTE AMBULATORIALE: *SI *NO

SINTOMI /SEGNI

☐ Febbre
☐ Splenomegalia
☐ Epatomegalia
☐ Linfoadenomegalia
☐ Piastrinopenia
☐ Anemia
☐ Leucopenia
☐ Perdita di peso

☐ Lesione cutanea o singola, localizzata o lesioni multiple o forma diffusa

o ulcera o nodulo o placca o papula
Specificare localizzazione _____

☐ Altri sintomi (specificare quali) _____

Data inizio sintomi _____

E' noto uno stato di immunodepressione: *SI * NO Se SI: specificare quale (HIV+ o altro) _____

Anamnesi positiva per trasfusione di sangue o emocomponenti nei 28 giorni precedenti la segnalazione?
*SI *NO *NON NOTO

Eventuali test diagnostici per leishmania già effettuati e risultati:
_____

MEDICO RICHIEDENTE _____ _____ (nome in stampatello e firma)

TEL._____ FAX._____

° I campioni devono essere inviati **a temperatura ambiente**