

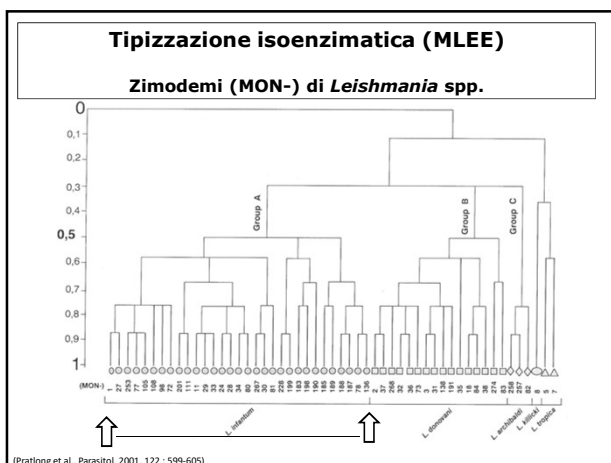
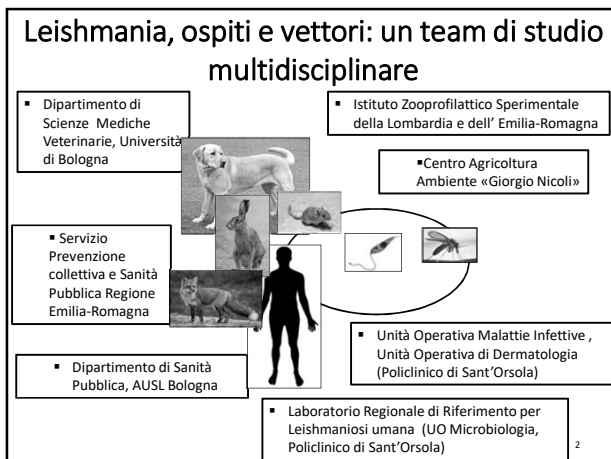

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**
"BRUNO ZERBINI"
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

**Esperienze di ricerca integrata:
leishmaniosi viscerale in Emilia-Romagna:
studio di epidemiologia molecolare**

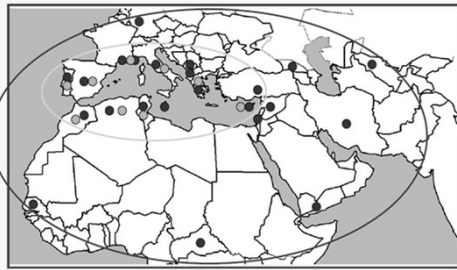
Gianluca Rugna
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
 Lombardia e dell'Emilia-Romagna
 Sede Territoriale di Modena

Stefania Varani
 UO Microbiologia
 Azienda Ospedaliero-Universitaria di
 Bologna/
 DIMES UNIBO

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Distribution of *L. infantum* zymodemes (n=37)

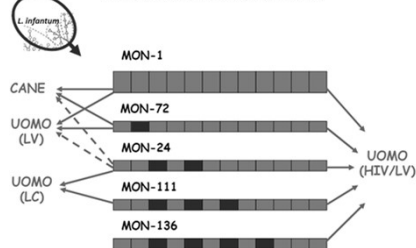


Zymodemes MON-1 ● → 61.7 % of strains
MON-24 ○

F. Pratlong, C. Ravel, P. Bastien & J.-P. Dedet

Zimodemi presenti in Italia

Il polimorfismo di *Leishmania infantum* e relazioni con l'ospite mammifero
I PRINCIPALI ZIMODEMI IN ITALIA



Epidemiologia molecolare di *Leishmania*

- 1) **Identificare la specie in una indagine in focolaio epidemico**
Introduzione di nuove specie in Europa/Italia?
- 2) **Determinare la struttura di popolazione e il grado di migrazione dei patogeni o dei vettori**
- 3) **Supporto alla diagnosi clinica e management del caso**
Reinfezione o recidiva?
- 4) **Studiare lo sviluppo e la diffusione di resistenza farmacologica**

Tipizzazione molecolare di *Leishmania*

→ Tipizzazione di specie

ITS-1: PCR e sequenziamento

heat shock protein (hsp)70: PCR e sequenziamento

considerati metodi di riferimento per tipizzazione di specie (van Der Auwera, EuroSurv 2016)

→ Tipizzazione a livello di ceppo

K26 discrimina tra MON1 e non-MON1

rnr.chr31 (Minodier et al) discrimina specie e alcuni zimodemi

Cpb E/F discrimina tra *L. infantum* e *L. donovani*

Multilocus microsatellite typing (MLMT)

- Analisi di 15 marker altamente polimorfici nell'ambito del *L. donovani* complex (Kuhls et al PLOS Negl Trop Dis 2008; Reale et al Transbound Emerg Dis 2010)
- Dati analizzati in parallelo mediante statistica Bayesiana e sulla base delle distanze genetiche

Genotipi presenti in Emilia Romagna (RER)

○ Cane RER (N=28)

□ Uomo VL RER (N=3)

□ Uomo VL extra RER (n=9)

△ Flebotomi RER (N=31 pools)

Ceppi di riferimento MON-1 e MON-72

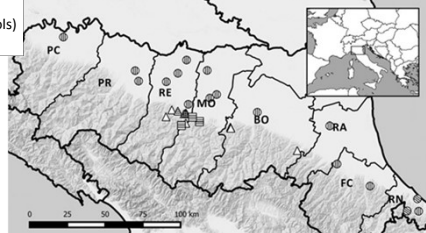
RER

Cane A/cpbE/626

Uomo C/cpbF/680

30 Flebotomo C

1 Flebotomo A



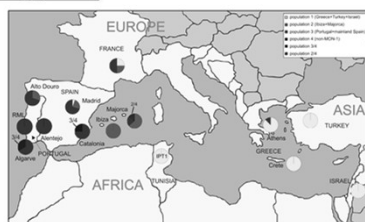
Genotipi circolanti nell'uomo e nei flebotomi diversi da genotipi circolanti nel cane in RER
Tranne 1 = infezione mista k26 626/680

Genetica di popolazione

Metodologia

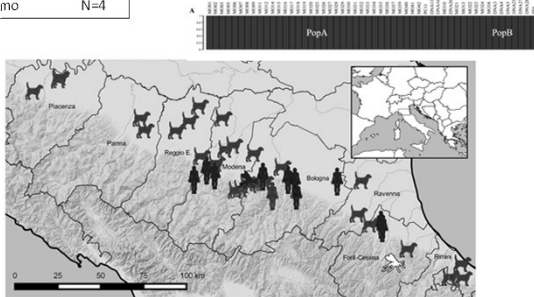
MLMT (Multilocus Microsatellite Typing)

	Id.	MO	LI41-56	LI46-67	LI21-34	LI22-35	LI23-41	Lm2TG	Lm4TA	LI715/2	LI5T7 039	LI71-33	LI71-7	CS20	LI45-24	TubCA	LI5T7 031
	LEISH 01	10	10	10	15	15	17	24 26	12	9	13	11	13	20	15	9	11
	LEISH 02	10	10	10	15	19	17	24	12	9	13	11	12	20	14	9	11

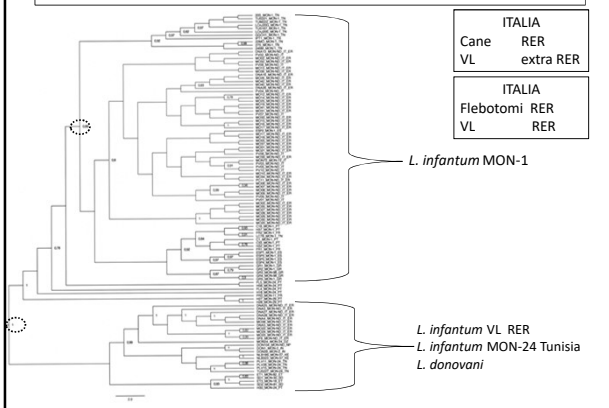


Genetica di popolazione in RER

Cane N=40
Uomo VL (RER) N=11
Uomo VL (extra RER) N=10
Flebotomo N=4



L. infantum RER vs altri Paesi



Isolation and Molecular Typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus perfiliewi* in a Re-Emerging Focus of Leishmaniasis, Northeastern Italy

Mattia Calzolari ^{1,*}, Elena Carra ¹, Gianluca Rugna ¹, Paolo Bonilauri ¹, Federica Bergamini ¹, Romeo Bellini ², Stefania Varani ^{3,4} and Michele Dottori ¹

Table 1. Sampled sand flies in the Valsamoggia municipality (Bologna province, north-eastern Italy), July–September 2016.

Date	N	Tested in Pool	Individuals-Tested	pos/pr	Leish-Pos Pools/Total Pools
27-07-16	2728	1000	209	95/5	1/50
11-08-16	431	300	87	16/2	3/5
18-08-16	821	300	80	10/4	3/5
31-08-16	1064	300	176	100/3	5/5
14-09-16	1050	700	80	10/1	6/7
2514	8030	402	413	096.75/135	20/50
Female					
Date	N	<10 (%)	≥10 (%)	N	<10 (%)
27-07-16	51	6 (11.8)	-	30	-
11-08-16	52	5 (9.6)	-	5	-
18-08-16	50	20 (40.0)	3 (6.0)	30	3 (10.0)
31-08-16	50	19 (38.0)	4 (8.0)	32	11 (34.4)
14-09-16	50	6 (12.0)	5 (10.0)	30	-
-	253	56 (22.1)	12 (4.7)	127	14 (11.0)


**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**
"IRIS" UNIVERO
ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO



Esperienze di ricerca integrata: leishmaniosi tegumentaria in Emilia-Romagna: aspetti clinici e epidemiologia molecolare


Gianluca Rugna
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
 Sede Territoriale di Modena

Stefania Varani
 UO Microbiologia
 Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna/
 DIMES UNIBO

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Leishmaniosi tegumentaria umana in Italia

•L.infantum (ceppi dermatotropi) MON-1, MON-24, MON-78, MON-111
(Gramiccia and Gradoni, 2007)

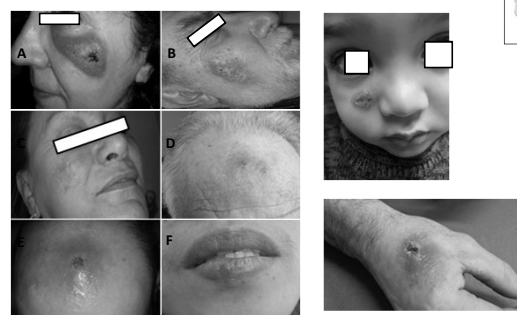



- Sottodiagnosi e sottotifica al Ministero della Salute
- Prevalenza reale è sconosciuta
- Nessun dato su tipizzazione molecolare di ceppi dermatotropi circolanti
- Serbatoio canino? Mancano evidenze conclusive

<https://www.who.int/leishmaniasis/Map-CL-Ita-2016.png>

Leishmaniosi tegumentaria in Italia

Leishmaniosi cutanea, CL





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

Leishmaniosi tegumentaria in Italia Leishmaniosi mucosa, ML



- Interessa la mucosa nasale, orale, faringea
- Casi riportati in Italia meridionale, Sicilia e Sardegna
- In RER: circa il 5% dei casi di leishmaniosi tegumentaria sono ML



Dr.ssa Gaspari UO Dermatologia, S.Orsola, Bologna
Dott. Mastroianni, UO Malattie Infettive, Forlì

Leishmaniosi tegumentaria in pazienti HIV-positivi

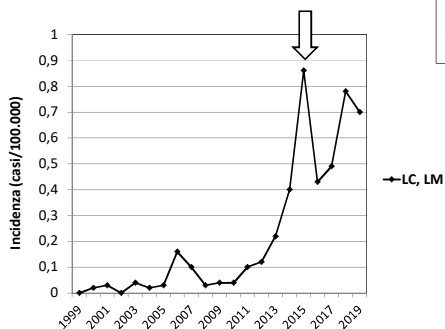
- Sinergismo tra i due patogeni
- I pazienti co-infettati presentano frequentemente coinvolgimento cutaneo (anche diffuso) o mucosale da Leishmania



Dr. Mastroianni-Malattie Infettive, Forlì

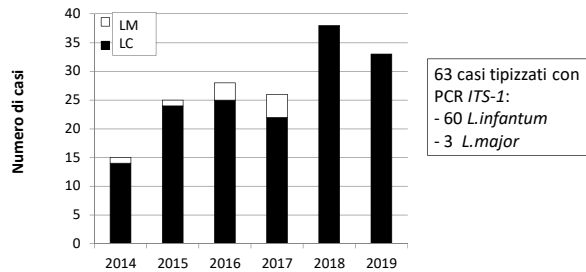
Dr.ssa Gaspari
UO Dermatologia, Bologna

Casi di leishmaniosi tegumentaria in RER (1999-2019)



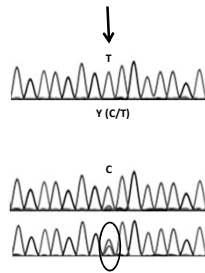
Casi di leishmaniosi tegumentaria in RER (2014-2019)

- Incidenza nel 2019: 0,7/100.000 abitanti
- Incidenza media 2014-2019: 0,6/100.000 abitanti



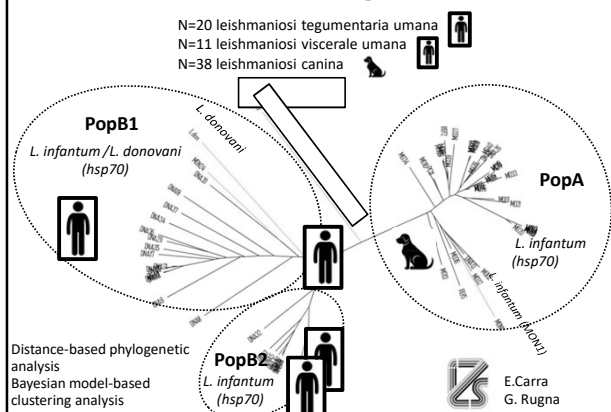
Diagnosi di specie mediante PCR *hsp70* (n=28 casi)

Casi di leishmaniosi tegumentaria	<i>hsp70</i> PCR
11	<i>L. infantum</i>
2	<i>L. major</i>



15/15 casi tipizzati come *L. infantum* mediante PCR ITS-1

MLMT di leishmaniosi tegumentaria- RER



Conclusioni

- Incidenza di leishmaniosi tegumentaria aumentata di oltre 5 volte in RER nel 2014-2019 rispetto al 2009-2013: aumento reale?
- Specie identificate: *L.infantum* e *L.major* (quest'ultima solo da importazione)
- Due diversi ceppi appartenenti a *L.donovani complex* causano leishmaniosi tegumentaria in RER: un ceppo di *L.infantum* sovrapponibile al ceppo causa di LV in RER e un ceppo con caratteri misti *L.infantum/L.donovani*

I dati MLMT indicano che i ceppi di leishmaniosi tegumentaria umana sono diversi dai ceppi causa di leishmaniosi canina della stessa regione → **reservoir?**

Un progetto di studio a Pianoro

In relazione alla residenza dei pazienti con CL e VL, è stata individuata una zona di 2 km² quadrati

- circa lo 0,06% rispetto al territorio dell'AUSL di Bologna

- Presenza di 11 di 90 casi (12%) di leishmaniosi autoctona registrati nel territorio aziendale nel periodo 2004 -2018

-Incidenza locale: 49 casi/100.000 abitanti all'anno



Dr R Todeschini –AUSL Bologna

23

Studio del serbatoio di Leishmania in provincia di Bologna



24

Studio del serbatoio di Leishmania in provincia di Bologna -2

	Emilia Romagna				Bologna		
	2018	2019	tot		2018	2019	tot
Capriolo	35	272	307		6	86	92
Cervo	20	16	36		20	13	33
Cinghiale	75	11	86		40	9	49
Coniglio	2	21	23			6	6
Daino	3	21	24		2	3	5
Faina	2	5	7		2	1	3
Gatto	6		6		5		5
Ghiro	5	8	13		4	7	11
Istrice	30	40	70		2	10	12
Lepre	68	58	126		34	21	55
Lupo	24	19	43		13	11	24
Nutria	3		3				
Pipistrello	21	23	44		1	3	4
Ratto	4	23	27		1		1
Riccio	46	137	183		6	30	36
Scoiattolo	6	6	12		3	3	6
Tasso	43	50	93		3	12	15
Topo	1		1				0
Volpe	519	448	967		151	104	255

2071

317

25



Thank you!

Policlinico S. Orsola-Malpighi

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

- UO Microbiologia: M Ortali, AM De Pascali, MC Re, P Gaibani, G Rossini, C Vocale
- UO Dermatologia: V Gaspari, A Patrizi
- UO Malattie Infettive: L Attard, E Vanino

UO Malattie Infettive e Tropicali, Ospedale di Cosenza: A Mastroianni

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna

UO Anatomia Patologica e UO Dermatologia: MP Foschini, A Lanzoni

Dipartimento di Sanità Pubblica:
Servizio Igiene Pubblica: R Todeschini
Servizio Sanità Animale: S Natalini

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"VIRGO OBITUUS"

E Carra, F Bergamini
M Calzolari, A Santi, M Tamba, M Renzi

Dipartimento di Scienze Mediche
Veterinarie: R Baldelli R, G Poglayen, D Salvatore, A Di Francesco

INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE
ANTWERP

G Van der Auwera

Regione Emilia Romagna

R Cagarelli, A. Lombardini

CAA Centro Agricoltura Ambiente
Giorgio Nicoli

Centro Agricoltura Ambiente
G Nicoli: R Bellini

IZS Sicilia:
F Vitale

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena

Pathology Unit: A Cesinaro
Infectious Disease Unit: M Codeluppi, E Franceschini
Dermatology Unit: G Pellacani