

Leishmania infantum e donatori di sangue: quale screening?

Which screening for Leishmania infantum in asymptomatic blood donors?

Giacinta Tordini¹, Camilla Puttini¹, Barbara Rossetti¹, Gabriella Sammarro¹, Alessandra Fanetti¹, Sergio Cianchino¹, Beatrice Valoriani¹, Vittorio Fossombroni², Giuseppe Campoccia², Maria Antonietta Cavion², Giacomo Zanelli¹

¹Sezione Malattie Infettive Universitarie, Dipartimento Biotecnologie, Università di Siena, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy;

²U.O.C. Immunoematologia Trasfusionale, Dipartimento dei Servizi, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

■ INTRODUZIONE

La leishmaniosi è un'infezione protozoaria a trasmissione vettoriale endemica nel bacino del Mediterraneo [1, 2]. È considerata una parassitosi emergente e la sua prevalenza è fortemente sottostimata [3]. L'aumento del numero di soggetti immunodepressi, la difficoltà di controllo sia del serbatoio animale che del vettore e, non ultimo, i cambiamenti climatici, sono considerate le cause principali della crescente diffusione dell'infezione [1, 3, 4]. *Leishmania infantum*, storicamente presente in Italia, è responsabile sia di una grave forma di malattia viscerale (LV), che di patologia a localizzazione cutanea a frequente risoluzione spontanea [5-7]. La possibilità di infezioni asintomatiche e la recente documentazione di parassitemie in donatori di sangue rappresentano un motivo di preoccupazione per la sicurezza trasfusionale [5, 8, 9]. Casi sporadici di trasmissione dell'infezione attraverso le donazioni di sangue sono stati registrati anche in Europa [5, 10, 11]. Poiché non è previsto uno screening parassitologico nei confronti di leishmania, abbiamo effettuato uno studio volto a valutare la presenza del protozoo in donatori di sangue di un'area endemica del centro Italia (Provincia di Siena), durante l'attività stagionale del vettore.

■ PAZIENTI E METODI

Durante il periodo Giugno - Ottobre 2007, 162 donatori di sangue afferenti al Centro di Ema-

tologia Trasfusionale (CET) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese (Siena, Italia) sono stati arruolati nello studio. Di questi, 113 (69,7%) erano uomini e 49 (30,3%) donne; l'età media era di 43 anni (range: 20-67). Tutti i soggetti, residenti nella Provincia di Siena o in aree limitrofe, erano asintomatici e con anamnesi negative per LV. Dieci soggetti avevano recentemente soggiornato in altre aree endemiche per *Leishmania* del bacino del Mediterraneo. Previo consenso informato, da tutti i soggetti sono stati raccolti 5 ml di sangue intero per indagini sierologiche e 5 ml di sangue in citrato di sodio per indagini molecolari.

Indagini sierologiche

Dai campioni di sangue intero è stato raccolto il siero per essere congelato a -80°C fino al momento dell'uso. La ricerca di anticorpi anti-*Leishmania infantum* è stata eseguita in immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando il kit commerciale *Leishmania spot-IF* (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). La diluizione 1/40 è stata considerata come *cut-off* (9).

Indagini molecolari

Dai campioni di sangue in citrato di sodio è stato raccolto l'anello linfomonocitario mediante stratificazione su ficoll. Le cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) sono state congelate fino al momento dell'estrazione. Il DNA è stato estratto con la tecnica del *salting-out* e l'amplificabilità dei campioni è stata saggiata attraverso una PCR per il gene della beta-globi-

na umana. Il DNA di leishmania è stato cercato su tutti i campioni con i primers RV1e RV2 già descritti da Le Fichoux et al. nel 1999, con modifiche minori ed avente come bersaglio il DNA dei minicircoli del chinetoplasto di *L. infantum* [10]. Una *nested*-PCR che utilizza le coppie di primer Ext-E2b e P1 e P2 alle condizioni di reazione descritte da Fisa et al., nel 2002, è stata utilizzata per processare tutti i campioni reattivi alla sierologia e/o positivi al chinetoplasto e per un gruppo di campioni scelti tra soggetti residenti in aree note per focolai di leishmania [12]. È stato inoltre effettuato il sequenziamento di alcuni dei prodotti amplificati tramite la PCR per chinetoplasto.

Come controlli positivi sono stati utilizzati: DNA estratto da 5×10^6 cellule Vero addizionate di promastigoti precisamente contati e DNA da campioni di PBMC di soggetti affetti da LV. In ogni reazione sono stati aggiunti, come controllo di contaminazione, uno o più bianchi (campioni senza DNA).

■ RISULTATI

Indagini sierologiche

Dei 162 campioni di siero testati, nessuno è risultato positivo alla diluizione di 1/40 (Tabella 1); 20 campioni (12,34%) sono risultati debolmente reattivi alla diluizione 1/20.

PCR per chinetoplasto (kDNA)

L'analisi molecolare avente come bersaglio di amplificazione il chinetoplasto ha dato positività per 11 campioni (6,8%) (Tabella 1). Un risultato concordante tra debole reattività sierologica (1/20) e chinetoplasto è stato osservato per 6 campioni.

nested-PCR per il DNA nucleare

L'analisi molecolare eseguita con i primers descritti da Fisa ha dato risultato negativo per tutti i soggetti positivi al kDNA, per tutti i soggetti debolmente reattivi alla sierologia e per altri

soggetti residenti in aree note per focolai di leishmaniosi, per un totale di 55 campioni analizzati (33% del totale dei soggetti) (Tabella 1) [12].

Sequenziamento

L'analisi delle sequenze da un campione di controllo positivo (costituito da promastigoti di *Leishmania infantum* MON 1 IPT1, e cellule Vero) e da 3 campioni di pazienti con LV ha dato come risultato DNA del minicircolo di *L. infantum* (GenBank Z35500, AF 027578.1). L'analisi delle sequenze di 3 campioni di soggetti donatori di sangue arruolati nello studio e positivi al chinetoplasto (due dei quali debolmente reattivi alla sierologia) ha invece dato come risultato DNA mitocondriale umano.

■ DISCUSSIONE

Il rischio di trasmissione di leishmania attraverso le trasfusioni è da tempo documentato [11]. A partire dal primo caso riportato in Cina nel 1948, sono state effettuate varie segnalazioni in aree diverse del mondo (India, Brasile, Svezia, Belgio, Francia e Regno Unito) [8, 11, 13, 14]. Attualmente in Italia non si sono verificati casi e, analogamente ad altri paesi europei, non è previsto per legge uno *screening* nei confronti di questa parassitosi [15].

La crescente preoccupazione nei confronti del rischio trasfusionale per leishmaniosi nasce dal fatto che negli ultimi anni alcuni studi, condotti anche in Europa, hanno documentato una frequenza relativamente alta di soggetti donatori asintomatici parassitemici [8, 10, 16, 18].

Nel 1999, Le Fichoux ha dimostrato che il 13,4% di soggetti donatori del Sud della Francia era positivo alla ricerca sierologica in *Western Blot*, con un 21% di casi parassitemici (PCR o coltura positiva per leishmania da sangue periferico) [10]. Più recentemente Riera, analizzando 1437 donatori asintomatici delle Isole Baleari, ha confermato la presenza di parassitemie nel 5,9% dei soggetti, utilizzando l'analisi moleco-

Tabella 1 - Ricerca di *Leishmania* spp. in 162 donatori di sangue nella provincia di Siena.

	IFAT*	PCR-kDNA	nested-PCR
Positivi (%)	0 (0%)	11 (6,8%)	0 (0%)
Negativi (%)	162 (100%)	151 (93,2%)	55 (100%)
Campioni analizzati	162	162	55
*Positività per cut-off $\geq 1/40$			

lare [8]. In Italia, uno studio condotto in Sicilia nel 2005 ha identificato 11 soggetti su 1449 (0,76%) positivi allo *screening* sierologico con IFI e 4 alla ricerca del DNA di leishmania tramite PCR, mentre Biglino ha sorprendentemente documentato, in un'area del nord-ovest classicamente considerata esente dall'infezione, il 7,41% di positività alla ricerca di anticorpi anti-leishmania mediante *Western blot* [9, 16, 17]. Poiché la Toscana è una zona storicamente endemica per leishmania e negli ultimi anni si è assistito ad un crescente numero di casi di patologia viscerale, abbiamo voluto verificare nella nostra realtà epidemiologica l'eventuale rischio di trasmissione del parassita attraverso le donazioni di sangue durante il periodo di attività stagionale del vettore [2, 5, 19-22].

Uno dei problemi più importanti nella ricerca di portatori asintomatici di leishmania è la scelta della tecnica diagnostica poiché non esiste un *gold standard* validato.

Le differenti tecniche sierologiche, essenziali nella diagnosi di malattia, possono avere una ridotta sensibilità nei soggetti asintomatici per la loro ridotta risposta anticorpale; il *cut-off* di positività proposto (IFAT) è infatti generalmente più basso (1/40) rispetto ai casi di patologia (8-10). Inoltre, la sierologia positiva non corrisponde necessariamente ad una parassitemia e può persistere anche per mesi in soggetti trattati efficacemente per LV [23, 24].

Lo *skin test* è un utile strumento epidemiologico che ha consentito di acquisire la nozione di "infezione asintomatica da *Leishmania*", che tuttavia documenta solo l'avvenuta esposizione al parassita e generalmente è espressione del contenimento dell'infezione stessa, senza associarsi alla presenza di parassitemie (8, 10). La dimostrazione diretta del parassita su materiali biologici (attraverso esame microscopico, PCR o coltura) rimane il test parassitologico per eccellenza [8]. Tuttavia l'esame invasivo, necessario in caso di malattia, non è proponibile in soggetti asintomatici e la coltura, estremamente difficile, rimane appannaggio di centri di riferimento.

L'analisi molecolare tramite PCR si è dimostrata sensibile e vari bersagli vengono utilizzati, con analoghi risultati [8, 10]. A differenza di altri studi condotti sui donatori, in cui la ricerca del DNA di leishmania è stata effettuata solo sui campioni reattivi sierologicamente, nella nostra analisi abbiamo usato una strategia diversa utilizzando su tutti i campioni sia l'IFI che la PCR con lo scopo di valutare la sensibilità delle diverse metodiche [9, 10]. Mentre la sierologia ha

dato esito negativo in tutti i soggetti, un numero relativamente e sorprendentemente alto di campioni è risultato positivo al DNA di chineto-plasto. Tuttavia il dato ottenuto, discordante da quello di altri lavori, non è stato confermato utilizzando una seconda tecnica di PCR avente un bersaglio diverso del DNA di leishmania; inoltre il sequenziamento di tre campioni amplificati dalla PCR del chineto-plasto ha dato esito ad un profilo compatibile con il DNA mitocondriale umano, indicando, in analogia ad una precedente segnalazione di Vergel nel 2005, una possibile cross-reattività di questa metodica diffusamente usata e dimostratasi peraltro utile nella diagnostica di casi di LV anche nella nostra esperienza [10, 25, 26]. Sebbene questi dati meriterebbero di essere confermati, nella maggior parte dei lavori sui donatori di sangue l'analisi molecolare non è accompagnata dal sequenziamento del campione amplificato.

La nostra analisi non consente di confermare la presenza di parassitemie asintomatiche nei soggetti studiati, tuttavia il rischio infettivo non può essere ragionevolmente escluso per vari motivi: le dimensioni ridotte del campione studiato rispetto alle casistiche citate, la ipoendemicità della nostra area rispetto ad altre e non ultimo l'episodicità e la bassa intensità delle eventuali parassitemie [10].

La presenza di leishmania nel sangue di donatori asintomatici è un dato rilevante non solo perché i destinatari delle trasfusioni sono generalmente soggetti più suscettibili alla malattia (bambini o soggetti immunodepressi), ma anche perché fornisce spunti di riflessione sull'epidemiologia e la patogenesi dell'infezione stessa. In particolare, si discute sul possibile ruolo di *reservoir* dell'uomo (antroponosi), fino ad oggi considerato solo ospite accidentale del ciclo biologico di *L. infantum*; la via di trasmissione ematica era già stata peraltro dimostrata attraverso lo scambio di siringhe nei tossicodipendenti, contribuendo alla diffusione della coinfezione HIV/Leishmania [10].

Per ridurre il rischio di trasmissione di leishmania attraverso le trasfusioni sono state proposte varie soluzioni. La scelta di effettuare *screening* routinari ai donatori non è da tutti condivisa, per i relativi costi e per il rischio, in aree a maggior endemia, di ridurre la disponibilità di sangue [8-12]. Tecniche di filtro, in particolare la depleucocitazione, sembrano essere efficaci nel ridurre la carica parassitemica; tuttavia non tutti i centri trasfusionali, così come a Siena, attuano la metodica di routine e la leish-

mania sembra comunque capace di sopravvivere libera nel sangue, essendo stato dimostrato anche un caso di trasmissione attraverso le piastrine [27-29].

La legislazione italiana si muove su un percorso condiviso a livello europeo ed ha identificato nella sorveglianza anamnestica lo strumento più adatto; in caso di storia di LV o sintomi suggestivi viene preclusa la possibilità di donare in modo permanente [15]. Per altri Paesi, l'aver risieduto in aree endemiche rappresenta una controindicazione alla donazione anche per un anno (come proposto per le forze militari statunitensi) [29]. In conclusione, la leishmaniosi è una parassitosi destinata ad aumentare e poiché l'infezione asintomatica è una realtà diffusa, sotto-stimata e poco studiata, appare realistica, se pur

rara, la possibilità di contagio attraverso lo scambio di sangue nelle donazioni. Attraverso le tecniche utilizzate, non abbiamo potuto confermare la presenza di leishmania nel sangue dei soggetti studiati. Problema aperto rimane la scelta del protocollo diagnostico, dal momento che l'analisi molecolare mediante la ricerca del kDNA sembra suggerire, nella nostra esperienza, possibili limiti di specificità. Sulla base dei dati ottenuti non riteniamo utile uno *screening* routinario di questa parassitosi tra i donatori di sangue, mentre è auspicabile l'utilizzo di strumenti di filtro per inattivare i vari patogeni e ridurre considerevolmente il rischio infettivo.

Key words: *Leishmania infantum*, blood donors, kDNA.

RIASSUNTO

La leishmaniosi è un'infezione protozoaria endemica in Italia a prevalenza fortemente sotto-stimata. La recente documentazione di parassitemie in donatori di sangue rappresenta un motivo di preoccupazione per la sicurezza trasfusionale. Poiché non è previsto uno *screening* nei confronti di *Leishmania*, abbiamo effettuato uno studio per valutare la presenza del protozoo in donatori di sangue della Provincia di Siena (Toscana) durante l'attività stagionale del vettore. Nel periodo Giugno-Ottobre 2007, 162 soggetti sono stati sottoposti a ricerca di *Leishmania infantum* mediante immunofluorescenza indiretta (IFAT) e PCR per chinetoplasto (kDNA). Nessun soggetto è risultato positivo alla ricerca di

anticorpi, mentre 11 campioni (6,8%) sono risultati positivi per kDNA. Una seconda PCR (nested-PCR) è risultata negativa per tutti i soggetti positivi al kDNA e per altri soggetti residenti in aree note per focolai di leishmaniosi, per un totale di 55 campioni (33% del totale dei soggetti). L'analisi delle sequenze di 3 campioni positivi al kDNA ha dato come risultato DNA mitocondriale umano. Attraverso le tecniche utilizzate, non abbiamo potuto confermare la presenza di *Leishmania* nel sangue dei soggetti studiati. La scelta del protocollo diagnostico nei donatori di sangue rimane un problema aperto, poiché l'analisi molecolare (kDNA) sembra suggerire, nella nostra esperienza, limiti di specificità.

SUMMARY

*Leishmaniasis is a protozoan infection endemic in Italy with a greatly underestimated prevalence. The recent documentation of parasitaemia in blood donors is a cause of concern for blood safety. Because there is no screening against leishmania, we performed a study to assess the presence of protozoa in blood donors of Siena district (Tuscany) during the seasonal activity of the vector. From June to October 2007, 162 patients were screened for *Leishmania infantum* by indirect immunofluorescence serology (IFAT) and PCR for kinetoplast (kDNA). No subject was positive for antibodies, while 11*

samples (6.8%) were positive for kDNA. A second PCR (nested-PCR) was negative for all kDNA positive individuals and other subjects for a total of 55 samples (33% of total subjects). The sequence analysis of three samples positive for kDNA was compatible with mitochondrial DNA. Through the techniques used, we were unable to confirm the presence of leishmania in the blood of the subjects studied. The choice of the diagnostic protocol in blood donors remains an open issue as molecular analysis (kDNA) seems to suggest, in our experience, limits of specificity.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] Ready P.D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15 (10): 19505, 2010.
- [2] Cascio A., Colomba C. Childhood Mediterranean visceral leishmaniasis. *Infez. Med.* 1, 5-10, 2003.
- [3] Dujardin J.C., Campino L., Canavate C., et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1013-1018, 2008.
- [4] Ashford R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281, 2000.
- [5] Gramiccia M., Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169-1180, 2005.
- [6] Colomba C., Scarlata F., Salsa L., et al. Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. Report of two cases relapsed after specific therapy. *Infez. Med.* 2, 139-143, 2004.
- [7] Nigro L., Montineri A., La Rosa R., et al. Visceral leishmaniasis and HIV co-infection: a rare case of pulmonary and oral localization. *Infez. Med.* 2, 91-94, 2003.
- [8] Riera C., Fisa R., Lopez-Chejade P., et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48, 1383-1389, 2008.
- [9] Scarlata F., Vitale F., Saporito L., et al. Asymptomatic *Leishmania infantum/chagasi* infection in blood donors of western Sicily. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 394-396, 2008.
- [10] Le Fichoux Y., Quaranta J. F., Aueuvre J. P., et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1953-1957, 1999.
- [11] Dey A., Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian. J. Med. Microbiol.* 24, 165-170, 2006.
- [12] Fisa R., Riera C., Ribera E., Gallego M., Portus M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 191-194, 2002.
- [13] Chung H.L., Chow K.K., Lu J.P. The first two cases of transfusion kala-azar. *Chin. Med. J.* 66, 325-326, 1948.
- [14] Singh S., Chaudhry W.P., Wali J.P. Transfusion-transmitted Kala-azar in India. *Transfusion* 36, 848-849, 1996.
- [15] Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore e di emocomponenti. D.M. Ministero della Salute, 3 marzo 2005 (G.U. n. 85 13/04/2005). Disponibile *on line* all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/tras/cont/20050303_DM%203%20mar%202005%20Protocolli%20donatore%202005.1183727749.pdf
- [16] Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Triscioglio A., Romano A., Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *J. Clin. Microbiol.* 48, 131-136, 2010.
- [17] Scarlata F., Li Vecchi V., Abbadessa V., et al. Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors and HIV+ patients living in an endemic area. *Infez. Med.* 1, 21-27, 2008.
- [18] Alborzi A., Pourabbas B., Shahian F., Mardaneh J., Pouladfar G.R., Ziyaeyan M. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in the whole blood of asymptomatic individuals by PCR-ELISA and comparison with other infection markers in endemic areas, southern Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 839-842, 2008.
- [19] Favati V., Macchioni F., Mancianti M. Epidemiologia della leishmaniosi in Toscana. Il progresso veterinario. Anno LV, 23, 2000. Disponibile *on line* all'indirizzo: <http://www.ordiniveterinariapiemonte.it/rivista/00n23/02.htm>
- [20] Kuhn K.G. Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bull. Trop. Med. Int. Health.* 7, 1-2, 1999.
- [21] Bettini S., Pampiglione S., Maroli M. Studies on Mediterranean leishmaniasis: V.A. preliminary epidemiological survey of human leishmaniasis in Tuscany. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 73-9, 1977.
- [22] Bettini S., Maroli M., Gradoni L. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (IV) An analysis of all recorded human cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 338-344, 1981.
- [23] Pagliano P., Rossi M., Rescigno C., et al. Mediterranean visceral leishmaniasis in HIV-negative adults: a retrospective analysis of 64 consecutive cases (1995-2001). *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 264-268, 2003.
- [24] Pasticci M.B., Papili R., Menichetti F., et al. Diagnostic considerations on visceral leishmaniasis. Two case reports. *Infez. Med.* 3, 176-178, 2002.
- [25] Vergel C., Walker J., Saravia N.G. Amplification of human DNA by primers targeted to leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 423-429, 2005.
- [26] Motazedian M., Fakhari M., Motazedian M.H., Hatam G., Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 151-154, 2008.
- [27] Kyriakou D.S., Alexandrakis M.G., Passam F.H., et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transf. Med.* 13, 59-62, 2003.
- [28] Mathur P., Samantaray J.C. The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis. *Transf. Med.* 14, 319-321, 2004.
- [29] Cardo L.J. Leishmania: risk to the blood supply. *Transfusion* 46, 1641-1645, 2006.