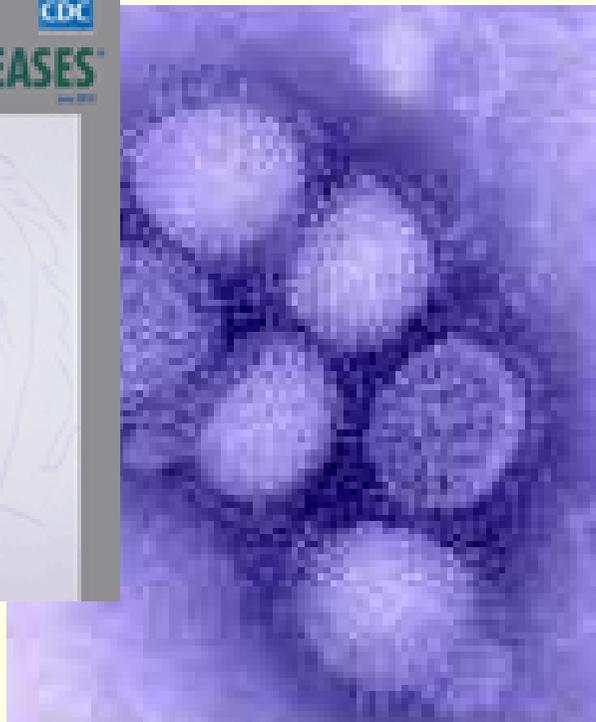
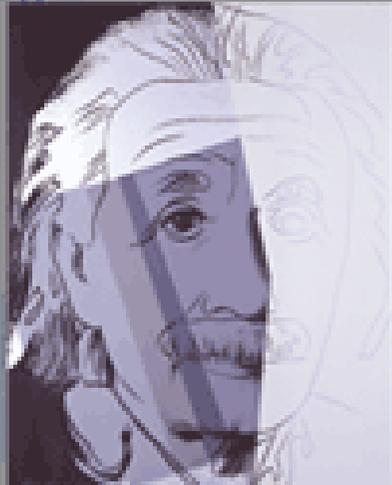


**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES**
September 2008

CDC



-
- Arbovirus
 - Famiglia Bunyaviridae
 - Genere Phlebovirus
 - Sierotipo del Sandfly fever Naples virus
 - RNA a singola elica; dotato di envelope.
 - Isolamento nel 1971 da *Phlebotomus perniciosus* sul monte Argentario (Grosseto)
 - Isolamento nel 1983 da LCR in un paziente con meningite a liquor limpido.

Sources of isolation

Family/genus	Virus	Year	Place	Viral detection
Bunyaviridae Phlebovirus	Arbia	1981	Tuscany Marche	<i>P. pernicious</i> <i>P. Perfiliewi</i>
	Sandyfly fever Neaples	1944	Campania	Human
	Sandyfly fever Sicilian	1943	Sicily	Human
	Toscana	1971	Central and Southern Italy	Human <i>P. pernicious</i> <i>P. perfiliewi</i>
Rhabodiviridae Vesciculovirus	Radi	1983	Tuscany	<i>P. pernicious</i>
		1994	Marche	<i>P. perfiliewi</i>

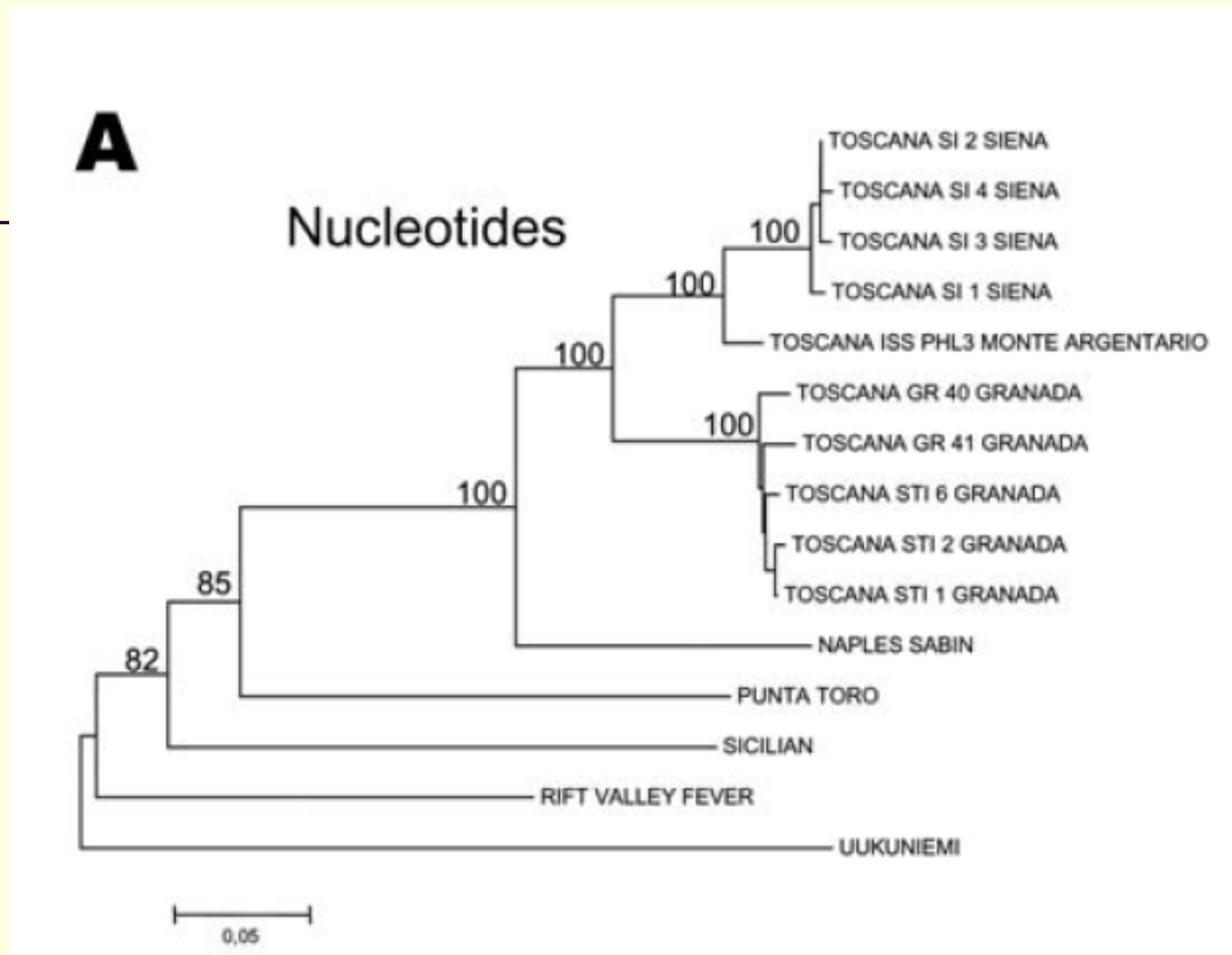


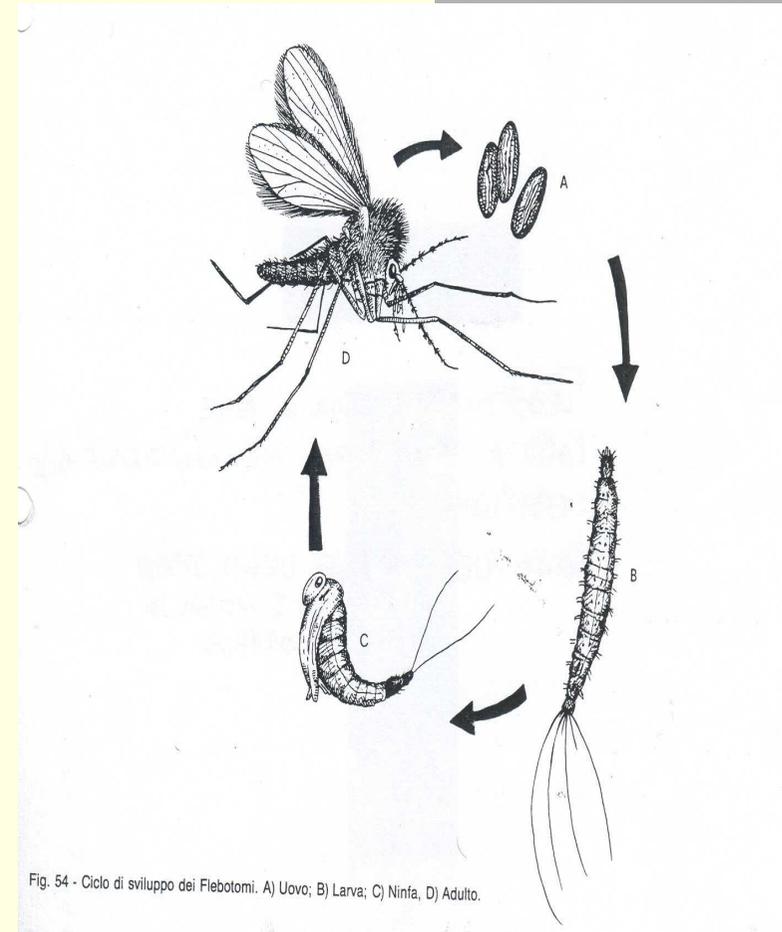
Figure 2. Phylogenetic trees reconstructed from nucleotide (A) and amino acid (B) sequences corresponding to a 236-nucleotide fragment of the N gene.

-
- Trasmesso da *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus perfiliewi*.
 - Il flebotomo costituisce anche il reservoir del virus = trasmissione transovarica



figura 2 Femmina di flebotomo (dimensioni 2,5 mm)

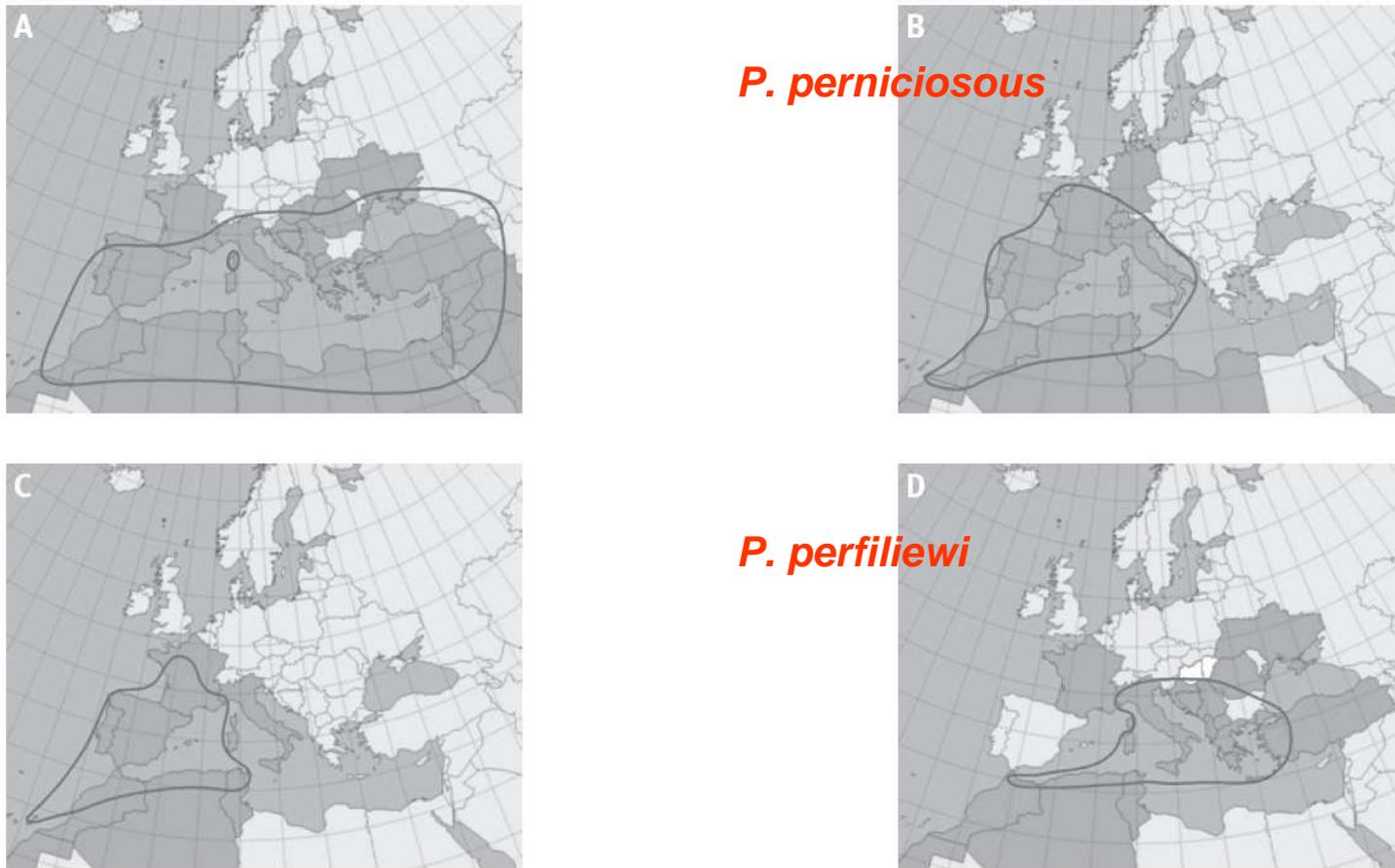
- PICCOLI INSETTI di 2-3 MM SIMILI AD UNA ZANZARA DI PICCOLE DIMENSIONI.
- COLORE GIALLO, UNA FITTA PELURIA RICOPRE CORPO E MARGINE ALI; IL CAPO FORMA ANGOLO RETTO CON IL TORACE.
- A RIPOSO LE ALI PELOSE VENGONO TENUTE VERTICALMENTE SUL CORPO.
- ATTACCANO ALL'IMBRUNIRE E DI NOTTE; DI GIORNO SI RIFUGIANO NELLE FESSURE DEL SUOLO NELLE GROTTI, RUDERI, TANE DI RODITORI.
- DEPONGONO CIRCA 50-100 UOVA ALLA VOLTA.



-
- Vivono nelle lettiere e tane di animali selvatici e nel loro sterco.
 - Depositano le uova in luoghi molto umidi e bui.
 - Presentano 4 stadi larvali con apparato masticatore (si cibano di materiale organico in decomposizione) .
 - Gli adulti frequentano gli stessi ambienti delle larve; alcune specie si sono adattate agli insediamenti umani e sono antropofile.
 - Pessimi volatori: volo saltellante a poca altezza dal suolo.
 - Solo le femmine sono ematofaghe.
 - Attività da giugno a settembre, con picco massimo in luglio-agosto.

FIGURE 3

Distribution of main vectors in the European Union and neighbouring countries around the Mediterranean Sea up to 2009



From left to right and from top to bottom: (a) *Phlebotomus papatasi*, (b) *P. perniciosus*, (c) *P. ariasi*, and (d) *P. perfiliewi s. st.* Countries with confirmed presence are depicted in mid grey, estimated distribution limits are depicted in dark grey. Source: V-borne project; reproduced with permission from the European Centre for Disease Prevention and Control.

■ **Italia:**

- ✓ Sieroprevalenza variabile dal 3% nel nord Italia (Torino) ¹ al 16% in Umbria ² ed al 22% Centro Italia.
- ✓ Il virus è ampiamente distribuito in diverse regioni, quali Toscana, Piemonte, Marche, Umbria ed Emilia Romagna (primo isolamento 2002)
- ✓ Isolamento virale nel 5,6% dei LCR di sogg. con meningite a liquor limpido (n = 126) nel napoletano ³
- ✓ Sieroprevalenza nel 37% delle meningiti a liquor limpido (n = 60) e nel 7% delle meningoencefaliti (n = 30) in Umbria ².

- **Europa: recente estensione a Francia (12%), Spagna (5-26%), Slovenia, Grecia, Cipro e Turchia.**

¹ Pugliese et al. *Cell Biochem Funct.* 2007) ² Francisci et al. *Eur J Epidemiol.* 2003) ³ Di Nicuolo G et al *JCM* 2005)

FIGURE 1

Distribution of (a) Toscana, (b) Sicilian, and (c) Naples viruses in the European Union and neighbouring countries around the Mediterranean Sea up to 2009



Age-Dependent Seroprevalence of Toscana Virus in Central Italy and Correlation with the Clinical Profile[∇]

C. Terrosi,¹ R. Olivieri,² C. Bianco,² C. Cellesi,² and M. G. Cusi^{1*}

Microbiology Section¹ and Infectious Diseases Section,² Department of Molecular Biology, University of Siena, Policlinico S. Maria delle Scotte, Siena, Italy

Received 13 October 2008/Returned for modification 29 December 2008/Accepted 10 June 2009

In order to estimate the antibody prevalence rates for Toscana virus (TOSV) among children and adults, we evaluated the seroprevalence of TOSV in a population ($n = 2,737$) living in Tuscany during the period of 1999 to 2006. The seroprevalence rate was 19.8% in adults and 5.8% in children, showing an age-dependent increase in TOSV-specific immunity. Meningitis due to TOSV infection was more frequent in adults than in children.

TABLE 1. TOSV seroprevalence in the age-grouped population

Age group (yr)	No. of patients TOSV IgG:		Total no. of patients	Seroprevalence (%)
	Positive	Negative		
Children				
1–5	61	1,346	1,407	4.3
6–10	30	416	446	6.7
11–15	30	214	244	12.3
Total	121	1,976	2,097	5.8
Adults				
16–20	6	50	56	10.7
21–30	42	158	200	21.0
31–40	26	116	142	18.3
41–50	36	106	142	25.4
51–60	17	83	100	17.0
Total	127	513	640	19.8

-
- Rischio stagionale di infezione in estate ed inizio autunno: agosto > luglio > settembre > giugno > ottobre
= periodo di maggiore attività dei Phlebotomi.

-
- Forme asintomatiche o paucisintomatiche
+++
 - Sindrome acuta febbrile “estiva” + + +
 - Meningite
 - Encefalite

-
- Periodo di incubazione variabile da 2 a 14 giorni
 - Manifestazioni di intensità marcata (70%) :
 - cefalea (100%, 18 ore–5 giorni),
 - febbre (76%–97%),
 - nausea and vomito (67%–88%),
 - mialgie (18%).
 - Esame obiettivo
 - Rigidità nucale (53%–95%),
 - Kernig (87%),
 - Alterazione del sensorio (12%),
 - Tremori (2.6%),
 - Paresi (1.7%),
 - Nistagmo (5.2%)

- Nei casi di meningite:

- GCS normale nel 70% dei casi, e valore sempre > 12
- pleiocitosi (30-900 cell/mm³, 60-90% linfociti) liquorale con elevazione protidiorachia e normoprotidiorachia.
- Indagini di neuroimaging normali
- EEG: alterazioni aspecifiche nel 60% dei casi.
- Es. ematologici: leucocitosi (29%) o leucopenia (6%).
- Durata media dei sintomi 7 giorni.
- Decorso generalmente favorevole.
- Rari i casi con manifestazioni neurologiche gravi.

Unusual Presentation of Life-Threatening Toscana Virus Meningoencephalitis

Franco Baldelli,¹ Maria Grazia Ciufolini,² Daniela Francisci,¹ Antonella Marchi,² Giulietta Venturi,² Cristiano Fiorentini,² Maria Laura Luchetta,¹ Lidia Bruto,¹ and Sergio Pauluzzi¹

¹Clinica di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, and ²Arbovirus Unit, Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Clinical Infectious Diseases 2004;38:515–20

This case report describes a brother and a sister with severe meningoencephalitis caused by Toscana virus (TOSv). The clinical presentation was characterized by stiff neck, deep coma, maculopapular rash, diffuse lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, renal involvement, tendency to bleeding, and diffuse intravascular coagulation. The boy had epididymo-orchitis. Recovery with neurologic sequelae as hydrocephalus was observed. Microbiological diagnosis was obtained by serological tests and reverse transcriptase–polymerase chain reaction. Sequencing of polymerase chain reaction products from the S and M segments was carried out. TOSv may be a causative agent in severe meningoencephalitis.

Encephalitis without Meningitis Due to Sandfly Fever Virus Serotype Toscana

**Daniele Dionisio,¹ Marcello Valassina,⁴ Maria Grazia Ciufolini,⁵
Angela Vivarelli,¹ Francesco Esperti,¹ Maria Grazia Cusi,⁴
Antonella Marchi,⁵ Franca Mazzoli,³ and Cinzia Lupi²**

¹Infectious Diseases Unit, Pistoia Hospital, ²Pistoia Hospital, ³Prevention Department, Local Health Unit, ³Area Valdinievole, Pistoia; ⁴Department of Molecular Biology, Section of Microbiology, University of Siena, Siena, and ⁵Laboratory of Virology, Arbovirus Unit, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Clinical Infectious Diseases 2001;32:1241–3

The role of Toscana (TOS) virus in producing encephalitis without meningitis is uncertain. We studied 2 cases of TOS virus encephalitis without meningitis by means of nested polymerase chain reaction assay and DNA sequencing. Findings confirm that TOS virus may directly cause encephalitis and suggest the usefulness of DNA sequencing in investigating relationships between TOS virus molecular patterns and the spectrum of neurological involvement.

- Ricerca anticorpale su sangue e su liquor e nei casi positivi ricerca virale su LCR in tutti i casi adulti di meningite a liquor limpido nel periodo giugno- nov 2010 nell'ambito del Programma di “ Sorveglianza WNV umana dell' Emilia-Romagna):
 - Pazienti di età ≥ 15 anni con meningite, meningoencefalite, poliradiculoneurite, paralisi flaccida acuta + liquor limpido
 - ricerca su liquor e su sangue di IgG anti-TOSV con test ELISA e di IgM con test a cattura;
 - nei campioni positivi, conferma con IIFA e ricerca del virus mediante RT-PCR.
 - Sede di effettuazione delle indagini: U.O. Microbiologia Policlinico Sant'Orsola Malpighi Bologna.

120 campioni testati
per TOSV

44/120 positivi (36,6%)

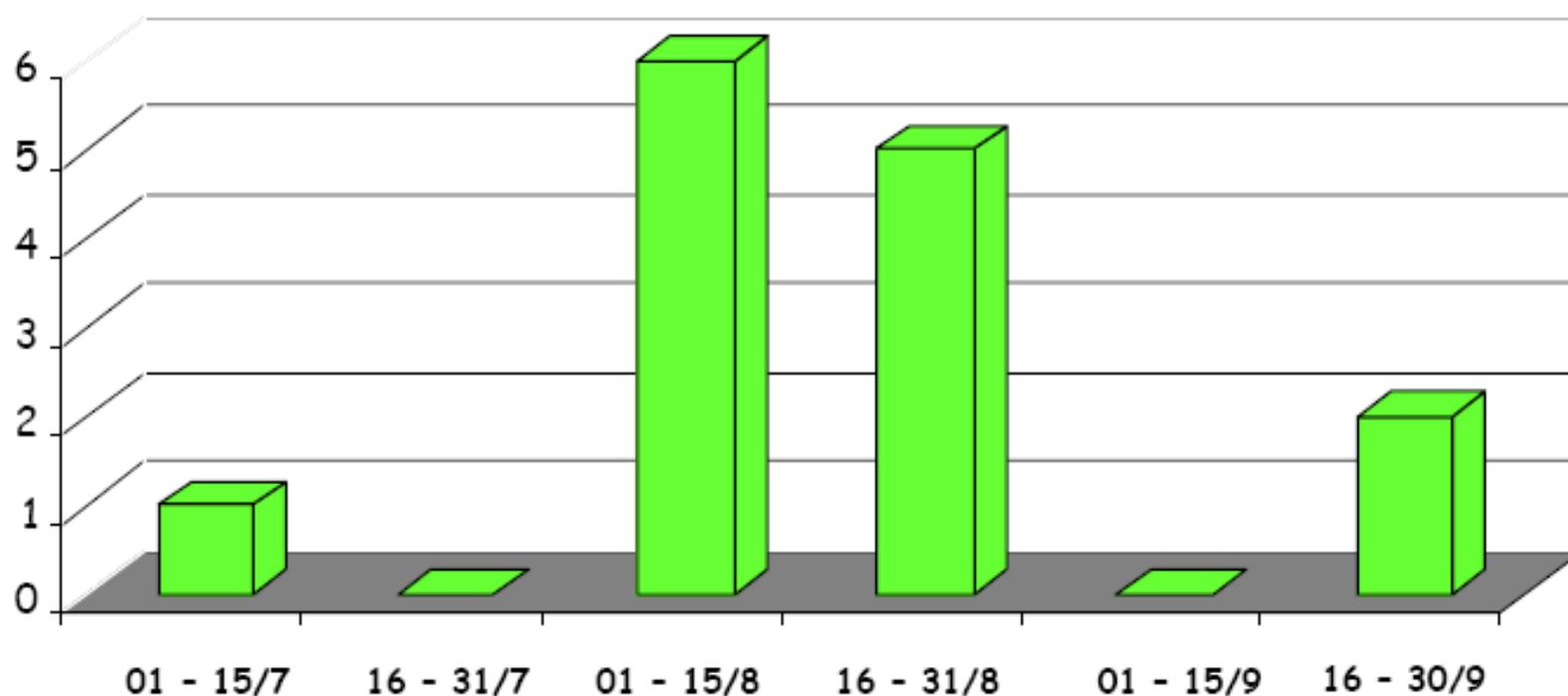
IgG+/IgM-
30/120 positivi

IgG+/IgM+
13/120 positivi

IgG-/IgM+
1/120 positivi

Ricerca genoma positiva in
11/11 liquor disponibili

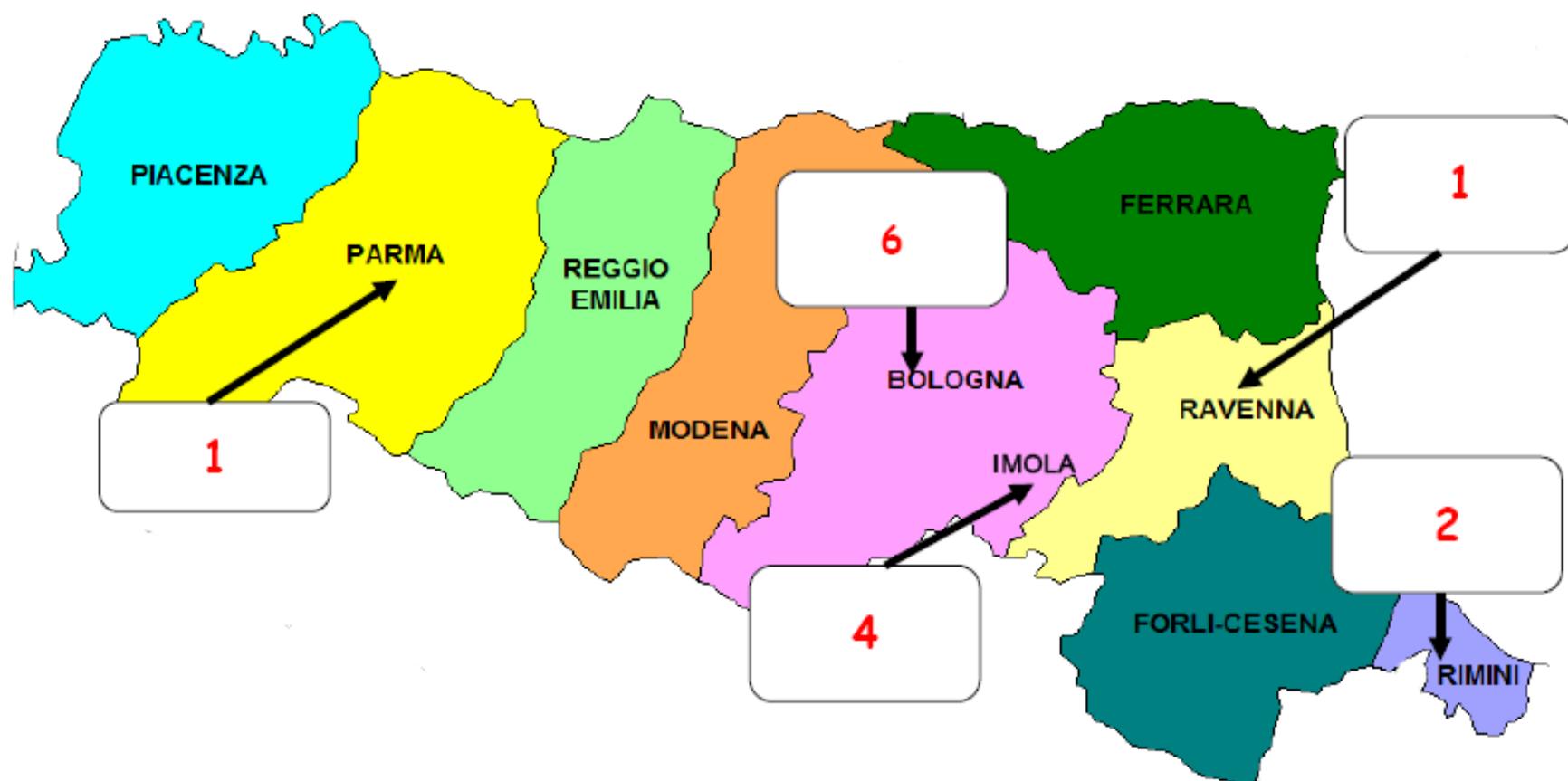
DISTRIBUZIONE TEMPORALE DEI 14 CASI ACCERTATI

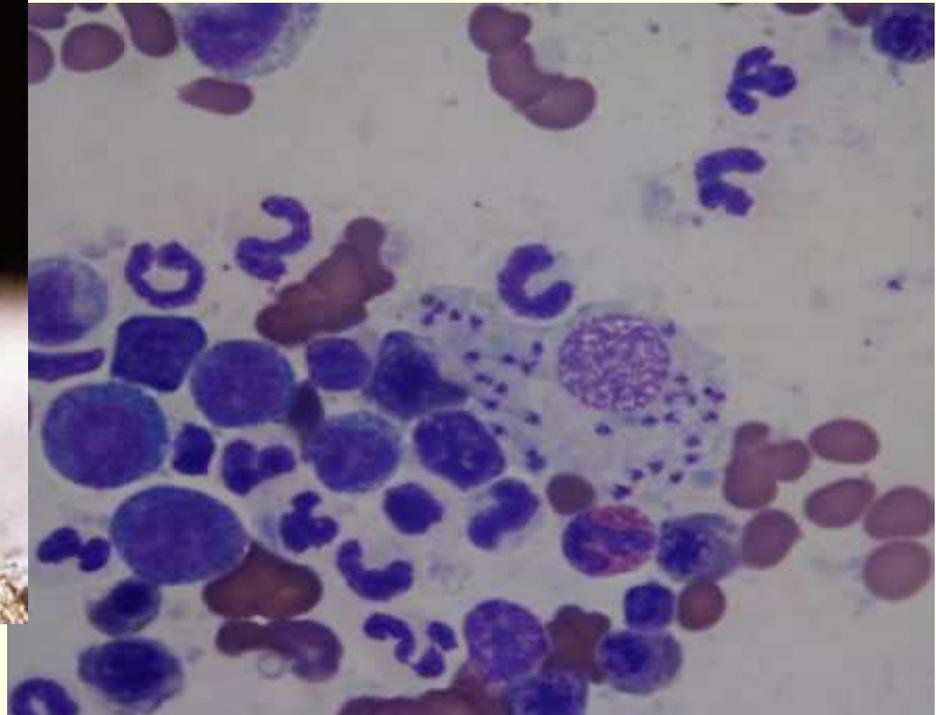


**11/29 campioni
totali (37,9%)**

Data di esordio clinico

DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA DEI CASI ACCERTATI (n=14)





Leishmaniosi

Agente eziologico

- “**Complessi**” **principali** che causano nell’uomo una malattia generalizzata (LV) o localizzata (LC e LMC)
- I principali complessi filogenetici sono nove:
 - *L. donovani* (*L. donovani*, *L. archibaldi*);
 - *L. infantum* (*L. infantum*, sin. *L. chagasi*);
 - *L. tropica* (*L. tropica*);
 - *L. major* (*L. major*);
 - *L. aethiopica* (*L. aethiopica*);
 - *L. mexicana* (*L. mexicana*, sin. *L. pifanoi*);
 - *L. amazonensis* (*L. amazonensis*, sin. *L. garnhami*);
 - *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. peruviana*);
 - *L. guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamensis*).

LV : agente eziologico

- *L. infantum* (Mediterraneo, America)
- *L. donovani* (Africa, India)

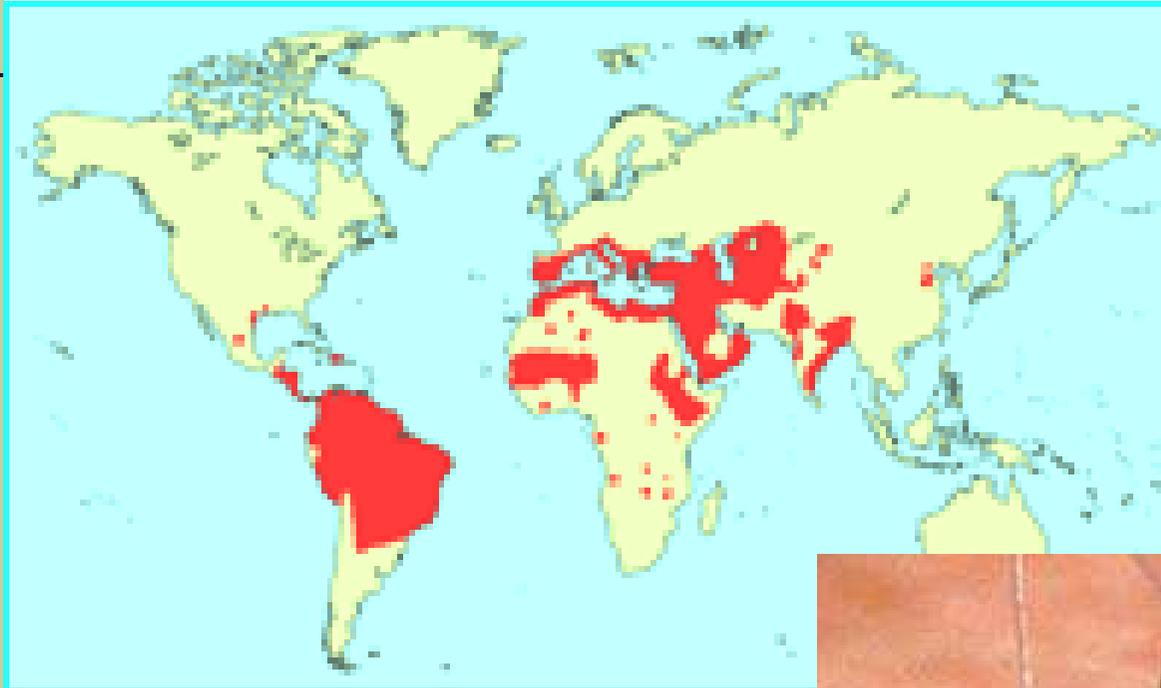
Epidemiologia

- 350 milioni di persone a rischio ogni anno
- LV: ~ 500,000 nuovi casi/anno stimati nel mondo
- LC: ~ 1.5 milioni nuovi casi/anno stimati nel mondo
- > 12 milioni di individui infetti in 88 Paesi
- Almeno 70,000 decessi/anno nel mondo

Aree endemiche (90% dei casi)

- LV : Bangladesh, Brasile, India e Sudan.
- LC: Afghanistan, Iran, Arabia Saudita, Siria, Brasile, Peru.
- LMC: Bolivia, Brasile e Peru.

Aree endemiche per leishmaniosi

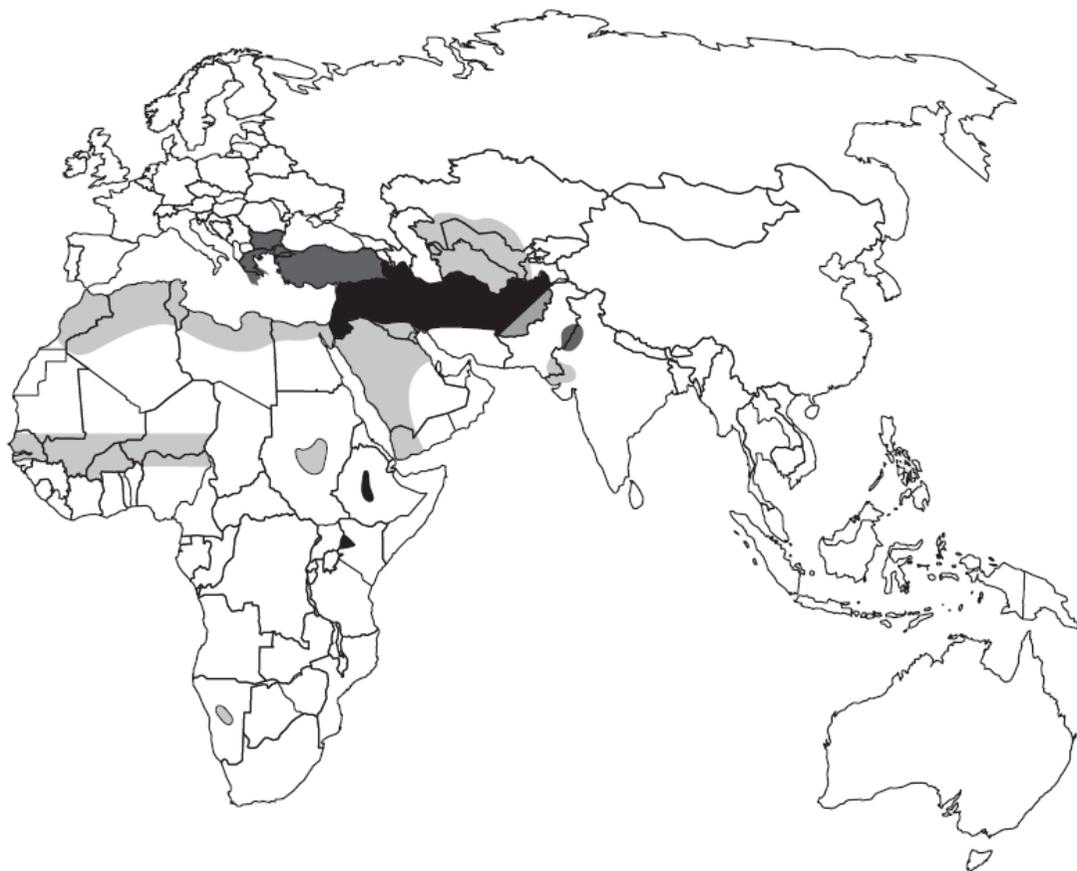


Circa 350 milioni di persone vivono in zone a rischio con una prevalenza globale di 12 milioni di soggetti infetti

La diffusione della malattia è associata alla distribuzione e densità dei flebotomi vettori (specie ubiquitaria: *Phlebotomus perniciosus*)

BMJ 2003;326:378

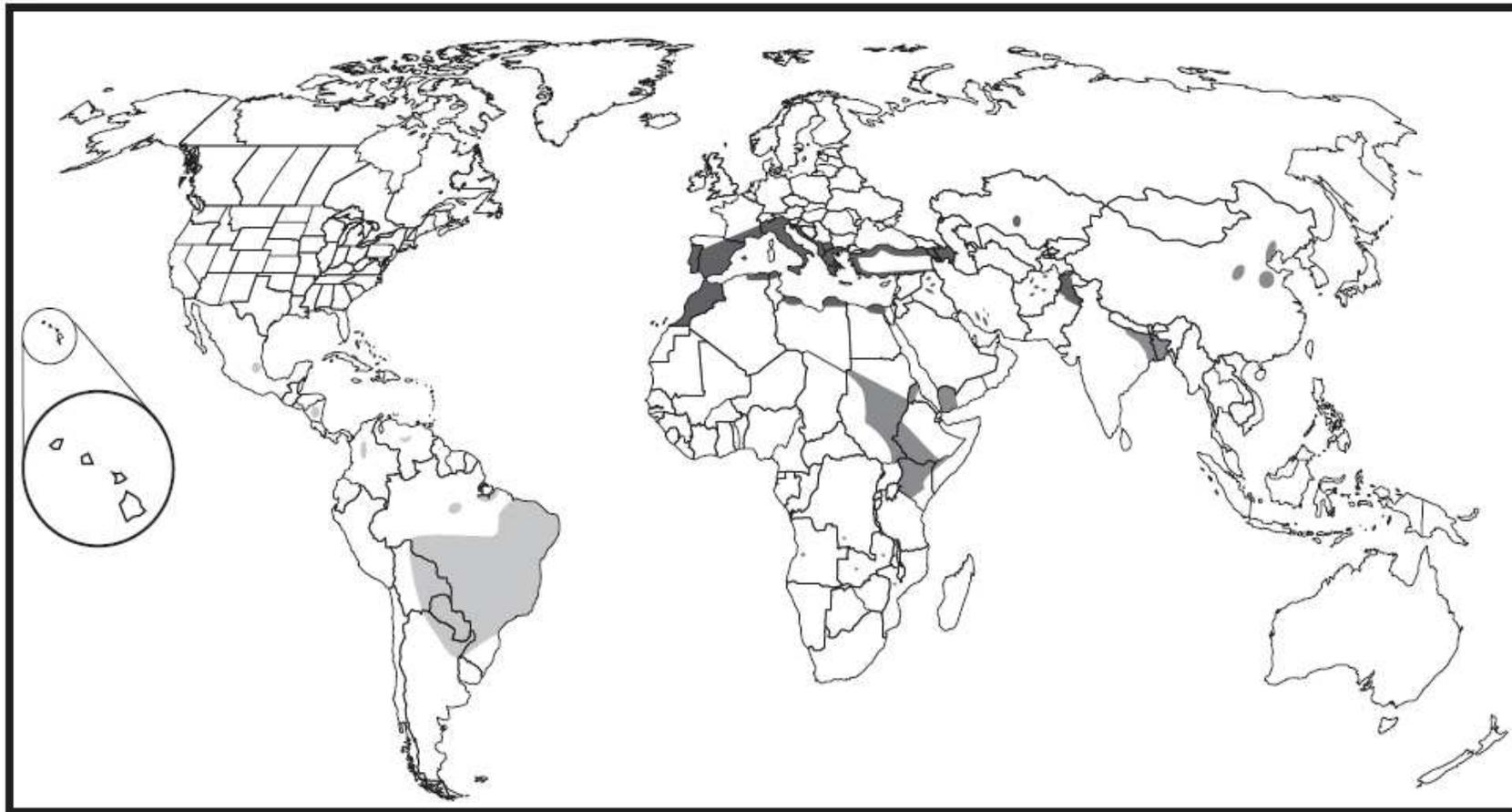




Cutaneous Leishmaniasis (Old World)

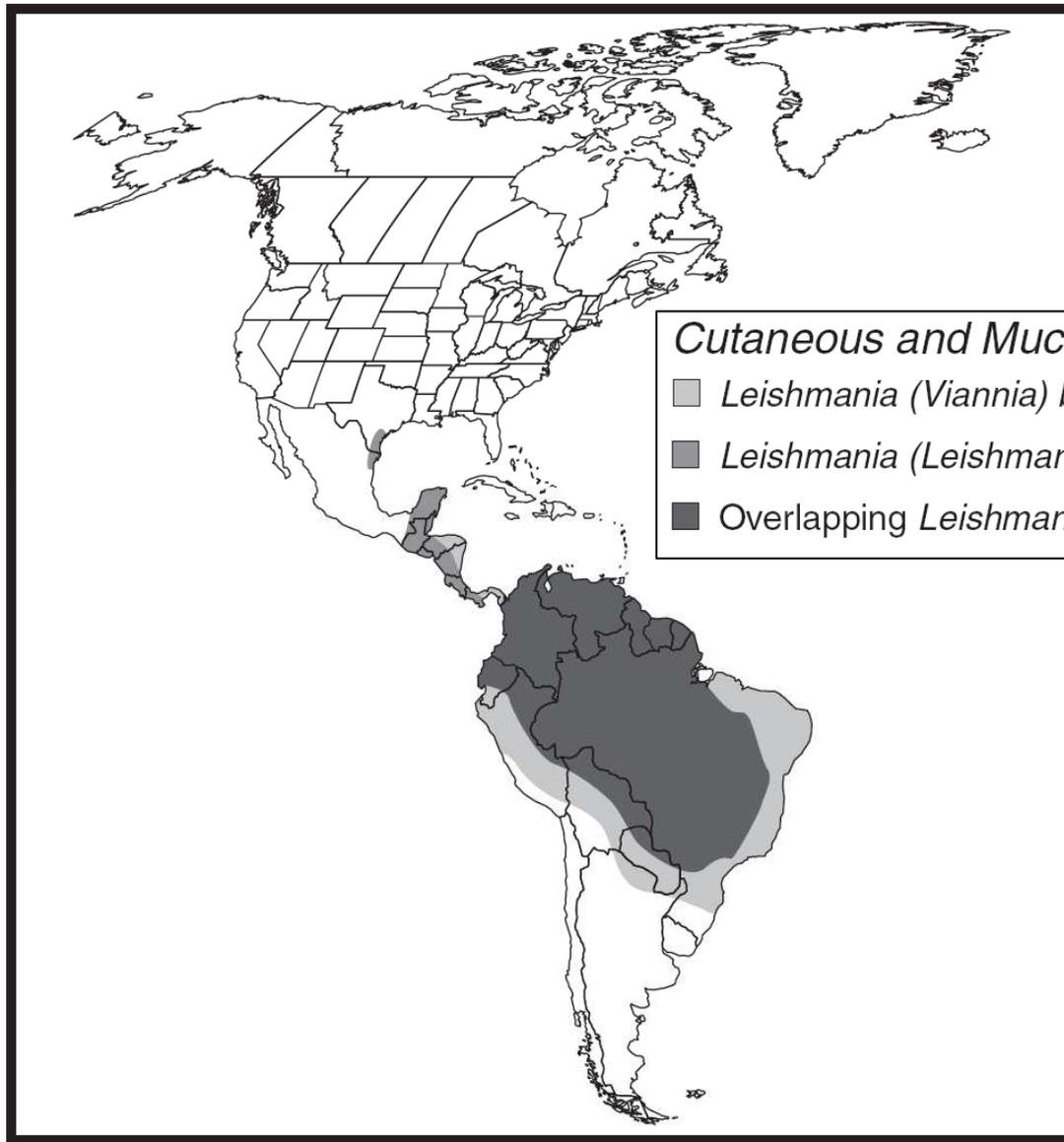
- *Leishmania (L.) major*
- *Leishmania (L.) tropica**
- Overlapping *Leishmania (L.) major* and *Leishmania (L.) tropica*
- *Leishmania (L.) aethiopica*

**L. tropica* caused cutaneous and viscerotropic disease among troops in Saudi Arabia in the Persian Gulf War.



Visceral Leishmaniasis

- *Leishmania (L.) chagasi*
- *Leishmania (L.) donovani*
- *Leishmania (L.) infantum*



Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis (New World)

- *Leishmania (Viannia) brasiliensis*
- *Leishmania (Leishmania) mexicana*
- Overlapping *Leishmania (V.) brasiliensis* and *L.(L.) mexicana*

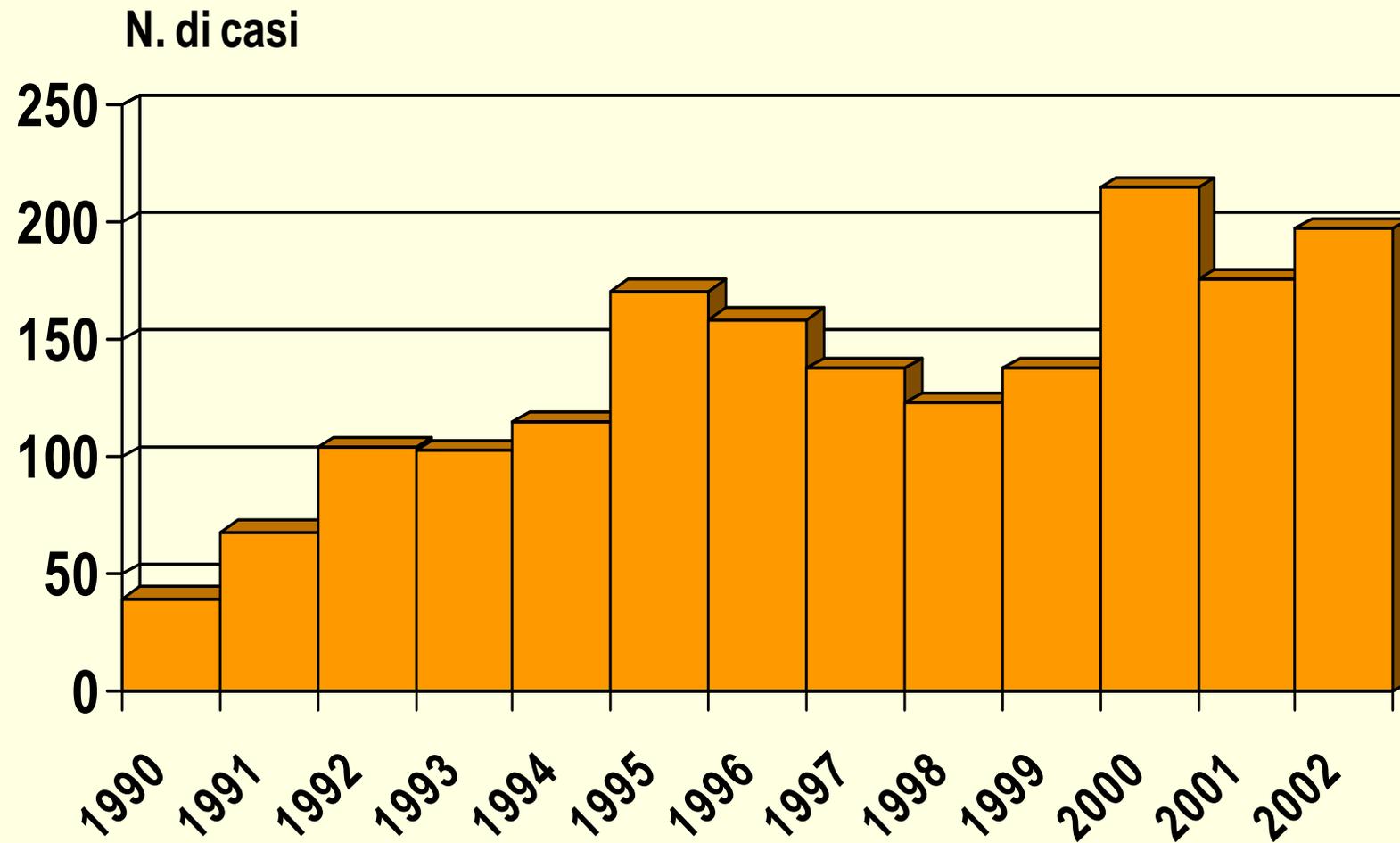
Leishmaniosi in Italia

- Agente responsabile: *L. infantum* (*L. chagasi*).
- Presente lungo la fascia costiera e nell'entroterra collinare.
- Spettro di malattia nell'uomo molto variabile: infezione asintomatica, malattia cutanea e viscerale.
- La variabilità clinica della espressione di malattia è legata in parte alla forma infettante, in parte all'ambiente immunologico dell'ospite.

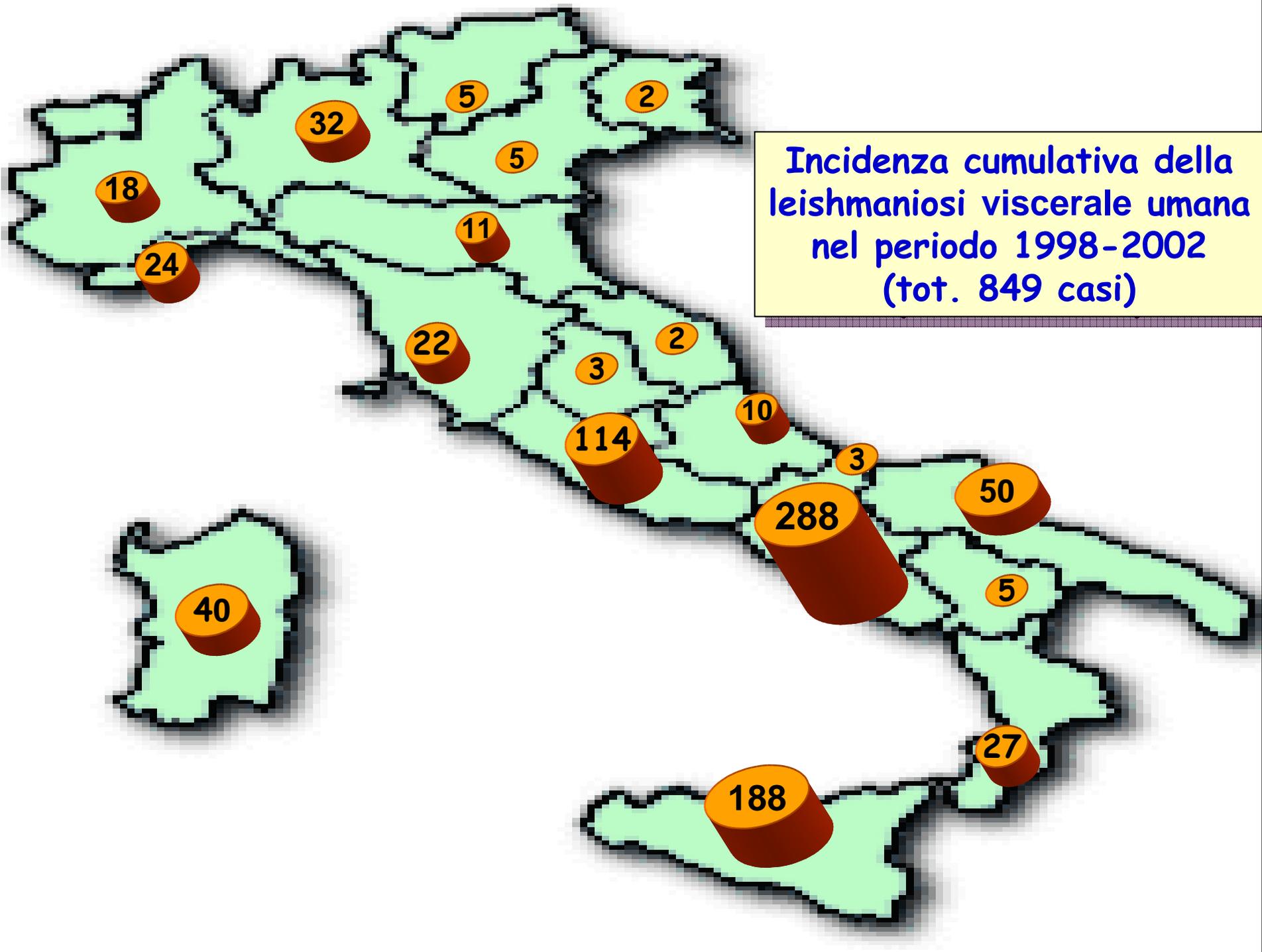
La leishmaniosi viscerale zoonotica umana: una malattia relativamente sporadica

Paese	Periodo	Casi (media/a.)	Bibliografia
Francia del Sud	1996-2001	26	P. Marty, pers. comm.
Italia	1996-2002	164	ISS
Albania	1997-2001	173	Velo et al., 2003
Nord Est Iran	1997-2001	238	Mazloumi Gavgani et al., 2002

Casi di leishmaniosi viscerale umana diagnosticati in Italia

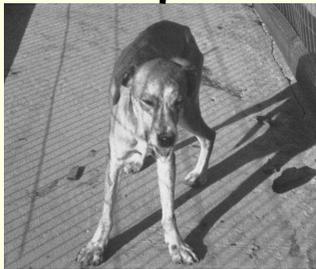
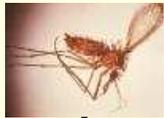


Incidenza cumulativa della leishmaniosi viscerale umana nel periodo 1998-2002 (tot. 849 casi)

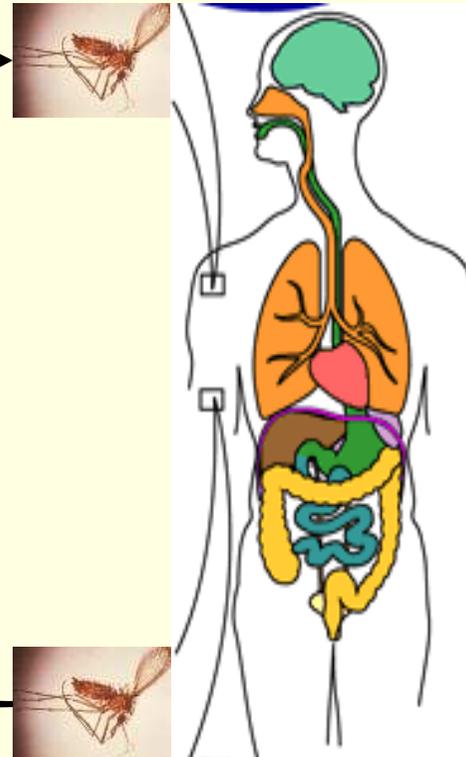


Ciclo biologico

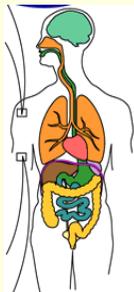
1- Puntura di flebotomo di animale infetto ed ingestione di sangue infetto con *Leishmania* (amastigote)



2- Il flebotomo punge l'uomo iniettando *Leishmania* (proamastigote)



4- Il ciclo continua quando il flebotomo punge un altro uomo o un animale infetto .



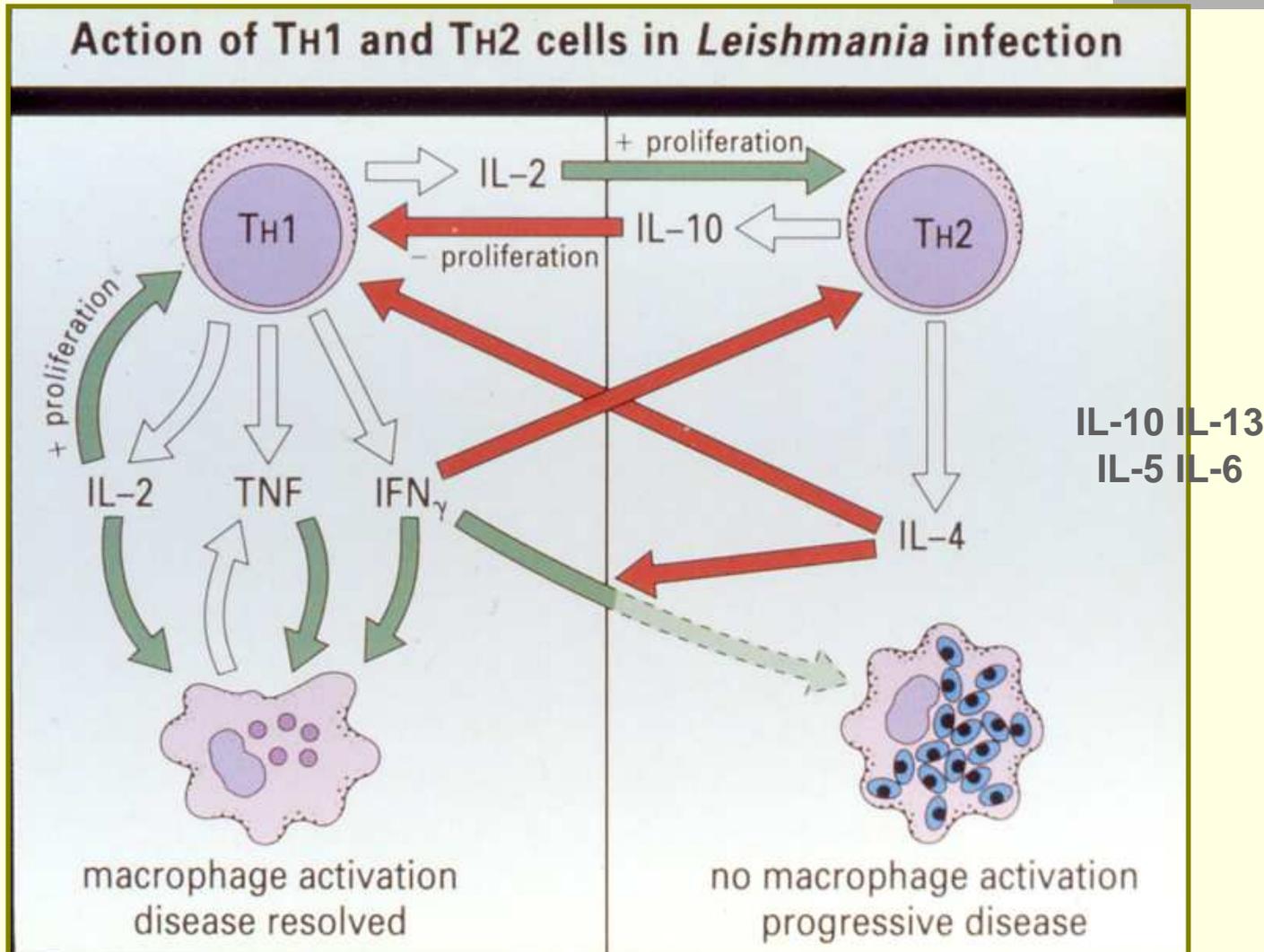
3- Un altro flebotomo punge l'uomo infettandosi con *Leishmania*



Patogenesi

- Il parassita è inoculato in forma flagellata (promastigote)
- Nell'uomo viene fagocitato dai monociti, perde il flagello (amastigote) ed è trasportato nel SRE (MO, fegato, milza).
- IFN γ e TNF α sono essenziali per l'eliminazione del parassita dalle cellule infette.
 - Un profilo citochinico Th2 (IL4, IL10) è associato alla persistenza di malattia;
 - lo switch in senso TH1 (IL2, IFN γ -TNF α) viene indotto dalla terapia.
- La risposta anticorpale specifica non ha efficacia protettiva; può contribuire alle manifestazioni di malattia con la precipitazione di immunocomplessi e sviluppo di auto-anticorpi.

Patogenesisi





Leishmaniosi Cutanea

Leishmaniosi cutanea

■ ***Forma cutanea “classica”***

- Incubazione: qualche settimana
- Papula, nodulo duro, lesione ulcerata singola (talora multiple) a bordi rilevati nelle zone scoperte del corpo, talvolta accompagnate da adenomegalia regionale.

■ ***Forma cutanea diffusa***

- Lesioni papulo-nodulari disseminate (con ricca componente protozoaria)

Distribuzione della LC classica nel Mediterraneo (zoonosi?)



Leishmaniosi cutanea

- La maggior parte delle lesioni si sviluppano nel giro di poche settimane dalla puntura del flebotomo.
- Le lesioni possono guarire spontaneamente, ma spesso dopo mesi o anni.
- Le lesioni possono lasciare cicatrici rilevanti, che sono deformanti se interessano la faccia.
- In caso di infezione da *L. tropica* la lesioni può estendersi alle mucose contigue (dal labbro superiore al naso) .

















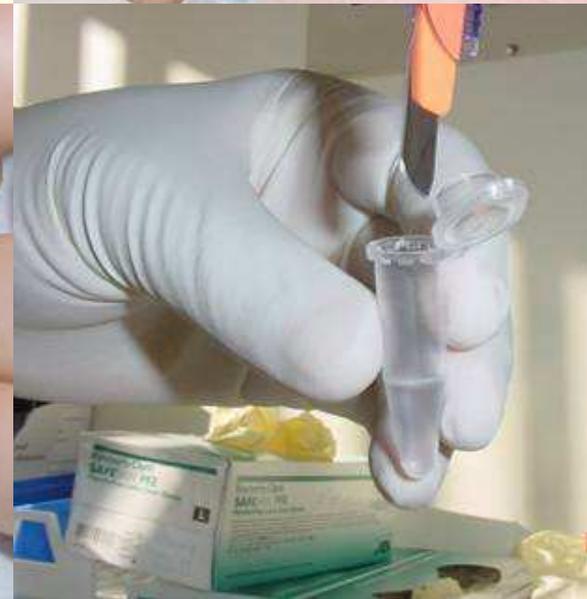
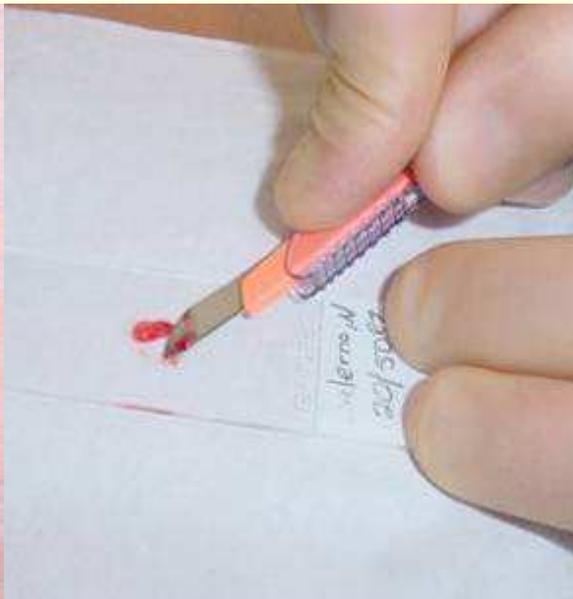


Leishmaniosi cutanea: diagnosi

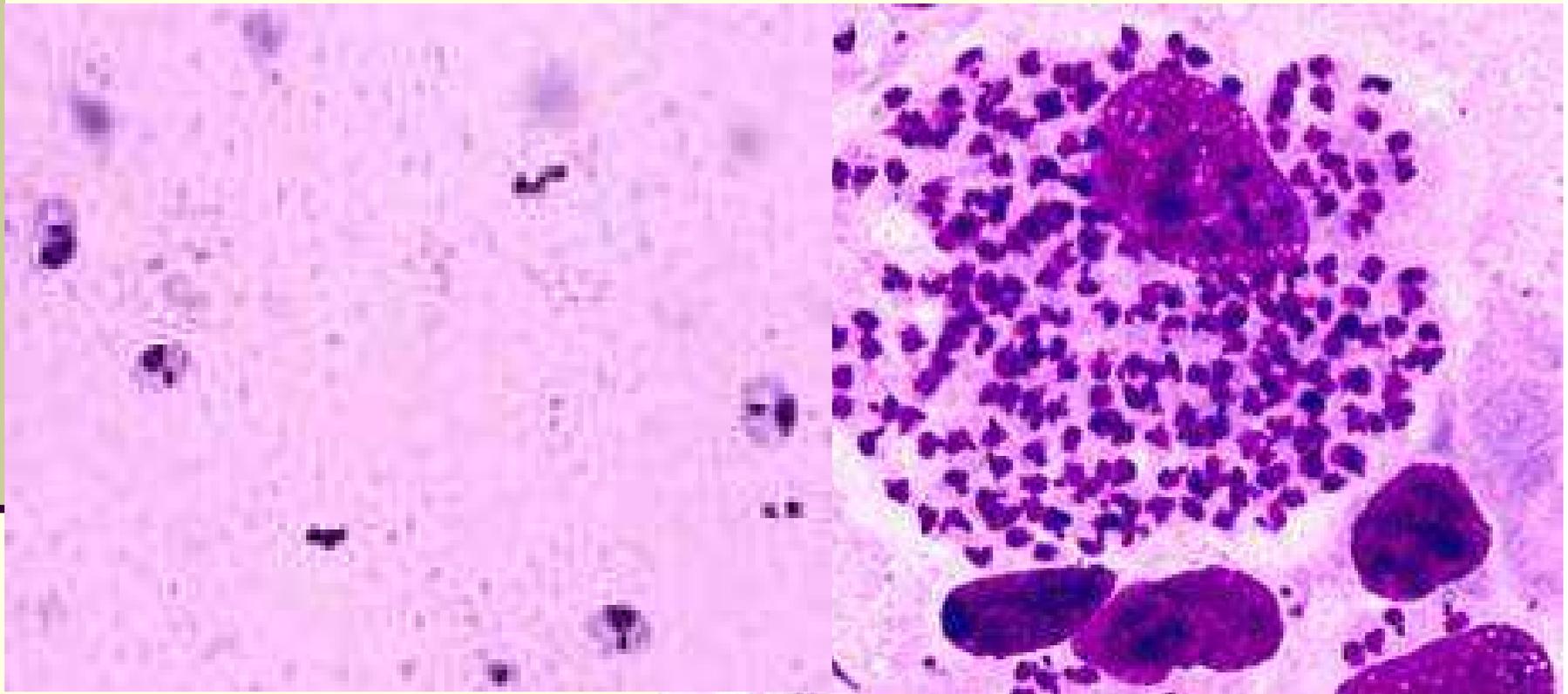
- **Raccolta campioni**
 - Scraping
 - Biopsia
- **Tecniche diagnostiche**
 - Microscopia
 - Biologia molecolare
 - Colture

Leishmaniosi cutanea: diagnosi

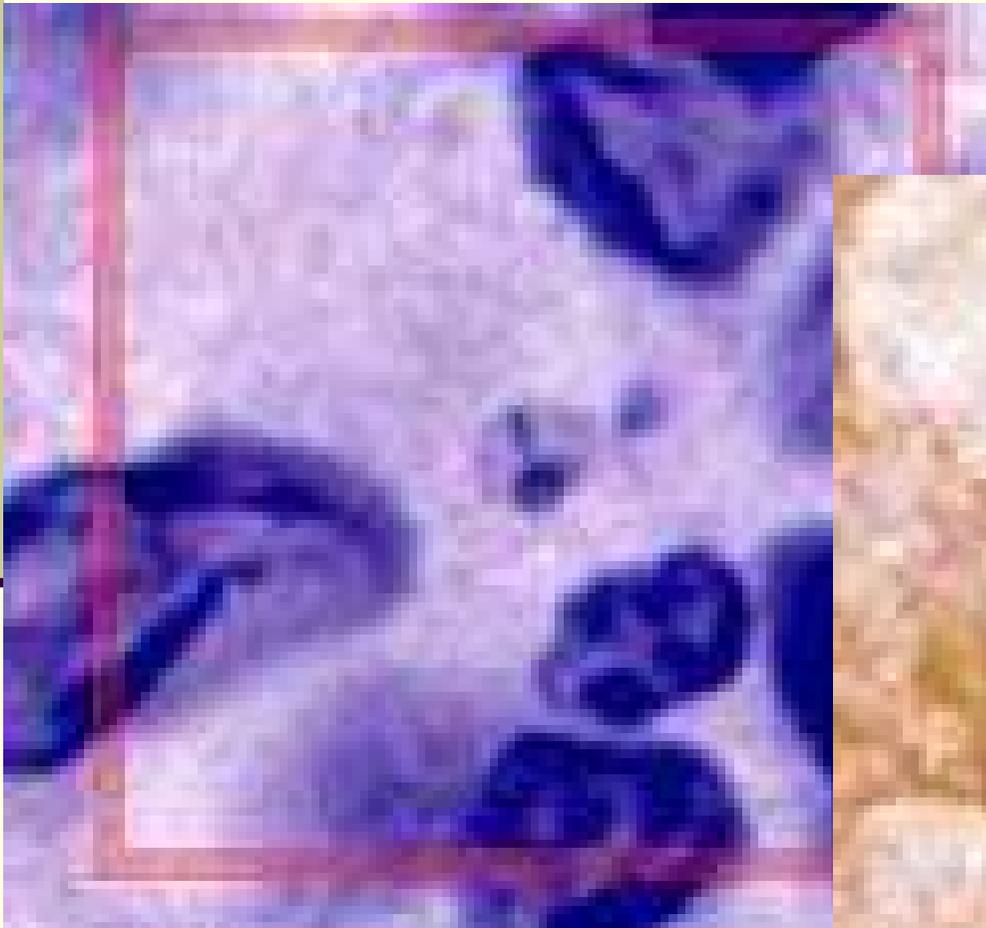
Raccolta campioni



Leishmaniosi : Citologia



Leishmaniosi : Istologia



Leishmaniosi cutanea: opzioni terapeutiche

- Nessun trattamento
- Crioterapia
- Calore
- Sodio Stibogluconato (Pentostam®)
- Paramomicina
- Imidazoli
- Terapia antibiotica topica



Leishmaniosi Viscerale





LV

- La maggior parte delle infezioni sono inapparenti e si risolvono spontaneamente
- Solo una minima parte di casi evolve verso la forma conclamata
- Fattori favorenti l'evoluzione : fattori genetici, malnutrizione, immunodepressione.

LV: segni clinici

- Incubazione: tra 2-8 mesi (range < 10 giorni-anni)
- Segni clinici classici:
 - febbre irregolare; 30% con andamento tipico con due cuspidi “a orecchie di gatto”;
 - Perdita di peso;
 - Splenomegalia (di solito imponente = fino all’ombelicale traversa, di consistenza dura);
 - Epatomegalia (di grado non elevato, consistenza duro-elastica);
 - Edemi peri-malleolari e petecchie (in fase molto avanzata);
 - Linfadenopatia (può mancare nella forme del mediterraneo).

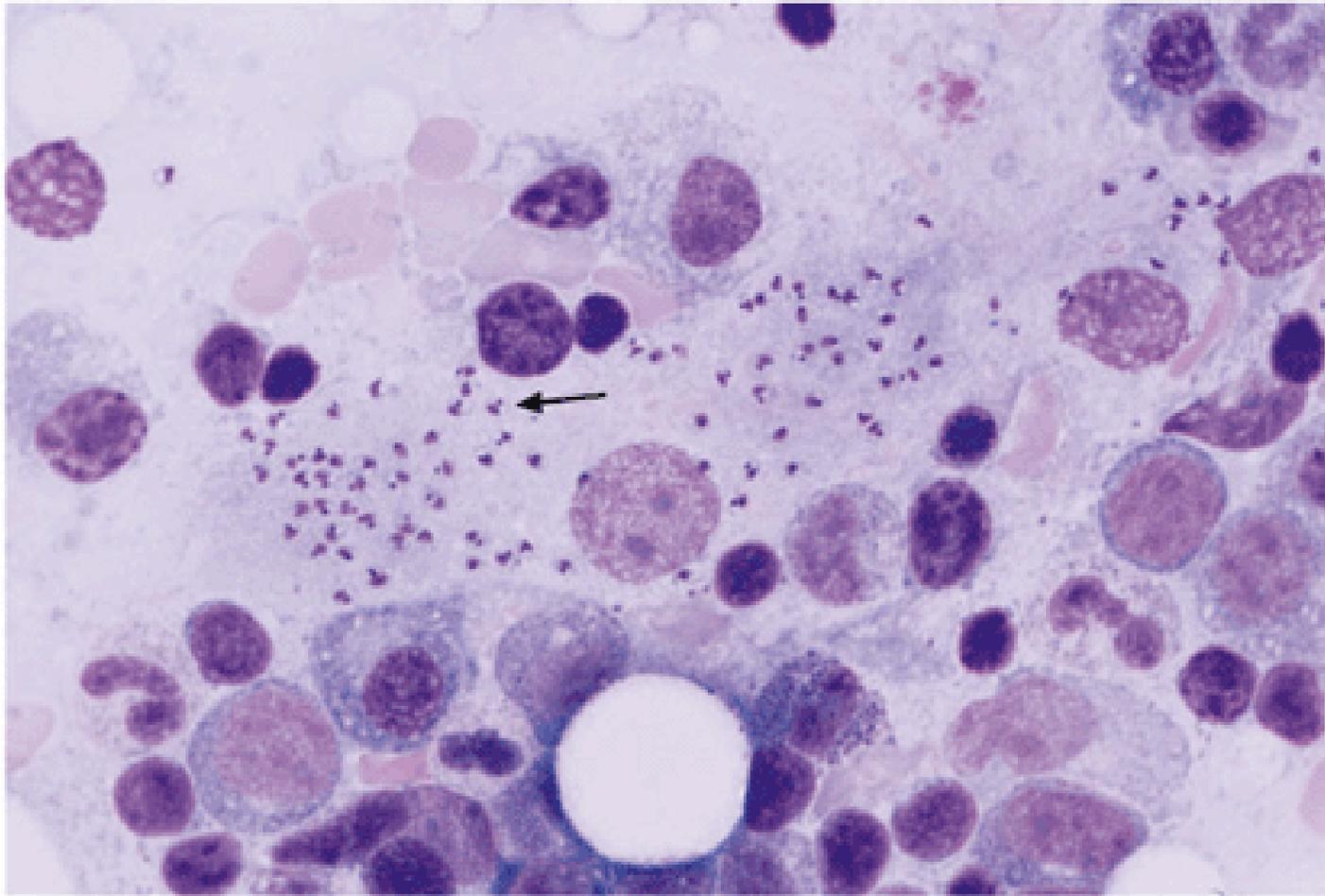
LV: alterazioni di laboratorio

- Anemia,
- Leucopenia (fino a 1000 globuli bianchi/ μ l)
- Piastrinopenia (<80.000/ μ l);
- Aumento valore della VES (70-100 mm);
- Ipoalbuminemia (<3 g/dl)
- Ipergammaglobulinemia (>3 g/dl);
- Aumento delle aminotrasferasi (2-3x);
- Bilirubina e γ -Gt normali.

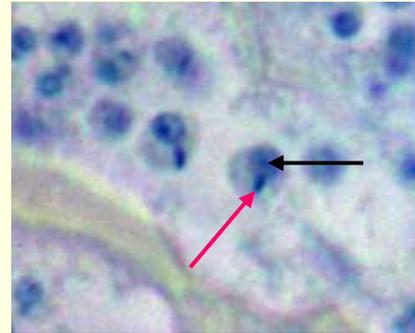
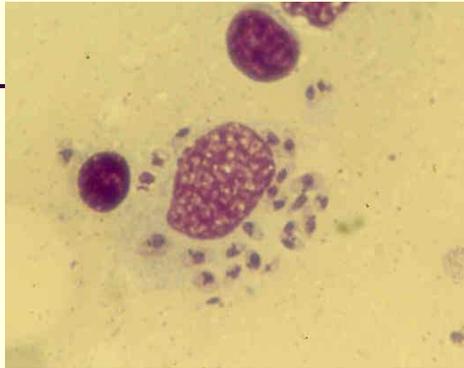
Decorso

- Decorso in assenza di terapia specifica:
 - Progressivo decadimento dello stato generale,
 - Aplasia midollare, manifestazioni dissenteriche, compromissione cardiaca e renale, edemi, ascite
 - Morte per infezioni o complicanze intercorrenti.

A bone marrow biopsy demonstrating the presence in the aspirate of the intracellular amastigotes typical of visceral leishmaniasis (hematoxylin and eosin, x400).

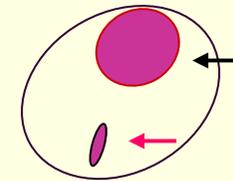


Esame microscopico del midollo osseo (1)



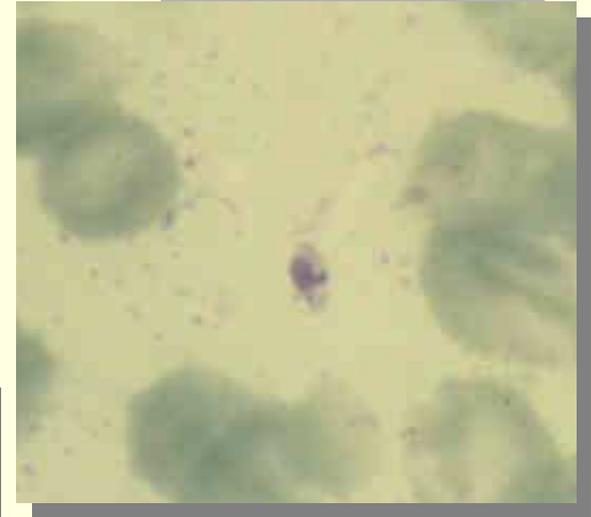
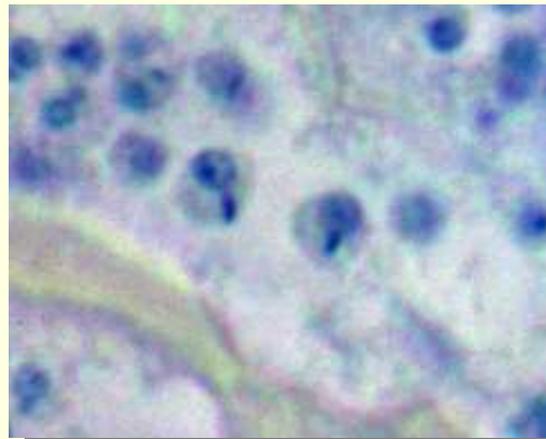
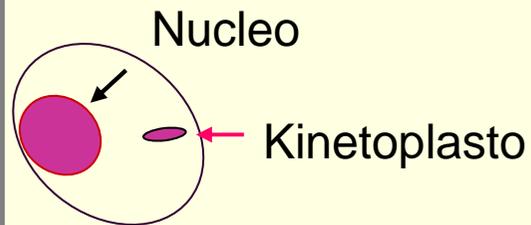
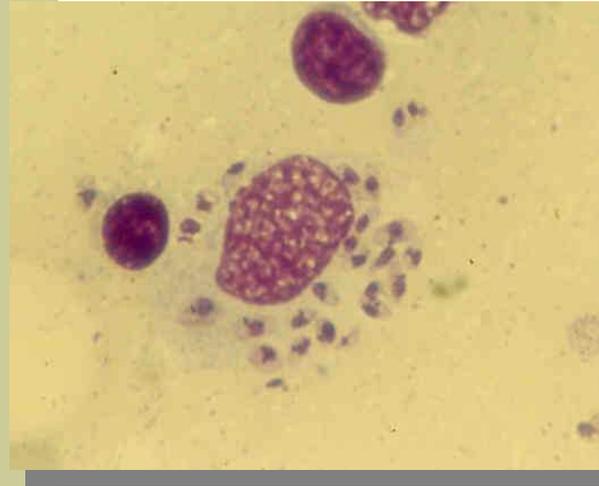
← Nucleo
← Kinetoplasto

amastigote



Frustoli di midollo osseo sono strisciati su vetrino che fissato in metanolo viene successivamente sottoposto alla colorazione Giemsa per l'esame microscopico diretto (600 – 1000 X)

Esame microscopico del midollo osseo (2)



La sensibilità del metodo dipende dall'esperienza dell'osservatore (70-95%)

LV : diagnosi

- La presentazione può essere atipica e la presenza di leishmaniosi deve essere sospettata in tutti i pazienti che vivono o arrivano da aree endemiche.
- La presenza di anticorpi anti *Leishmania* non conferma o esclude la diagnosi.
- Per la diagnosi è necessario evidenziare il parassita sulla biopsia midollare, epatica , linfonodale o della milza.
- Alta sensibilità diagnostica dimostrano le tecniche di biologia molecolare per l'identificazione di *Leishmania* su sangue e tessuti.

LV: conferma diagnostica

Parassitologica

- Aspirato splenico = Sensibilità 94-97% (mortalità = 1%)
- Aspirato midolare = Sensibilità 67-94%
- Aspirato linfonodale = Sensibilità 52.6-59%
- Biopsia epatica = Sensibilità 77-91%

Cultura (agar NNN)

- Sensibilità 64-67%

Sierologia (associare 2 tecniche)

- Enzyme immunoassay (Ag rK 39) = sensibilità 90-100%
- Test di agglutinazione (DAT) = sensibilità 72%, specificità = 94% (cross reattività con malaria, schistosoma; falsi negativi in HIV)

PCR (sangue periferico, midollo, tessuti)

- Sensibilità 72-100%
- Monitoraggio post-trattamento (test quantitativo)