

Attività formativa

Test di suscettibilità a farmaci antiprotozoari di ceppi di *Leishmania infantum* isolati da casi di Leishmaniosi tegumentaria umana

Le leishmaniosi sono un gruppo di malattie trasmesse da vettori flebotomi, causate da parassiti protozoari del genere *Leishmania* (Gradoni *et al.*, 2013). Lo spettro clinico della malattia varia dalla leishmaniosi viscerale alla leishmaniosi tegumentaria, che comprende la leishmaniosi cutanea, mucosa e mucocutanea. Le leishmaniosi sono distribuite in Asia, Africa, America Latina e Sud Europa, con una stima di 0,5-2,0 milioni di nuovi casi all'anno (Savoia *et al.*, 2015). Tuttavia, l'aumento delle temperature associato al cambiamento climatico sta facilitando la diffusione della leishmaniosi e dei suoi vettori anche in altre aree, come già osservato nell'Italia settentrionale. Infatti, un'impennata di casi è stata recentemente osservata nella regione Emilia-Romagna, con cluster nelle aree comprese tra le province di Modena e Bologna e nelle province di Forlì-Cesena e Rimini (Maroli *et al.*, 2008; Mattivi *et al.*, 2022; Gaspari *et al.*, 2017). Nonostante la prevalenza sia in aumento, le leishmaniosi sono classificate come malattie neglette, a causa della loro forte associazione con la povertà e della limitata quantità di investimenti nella loro diagnosi, trattamento e controllo (Jha *et al.*, 2013).

Ad oggi, la crescente incidenza di fallimenti terapeutici dovuta all'incremento della farmacoresistenza dei parassiti, nonché la mancanza di standardizzazione delle metodiche di test di suscettibilità e resistenza ai farmaci, rappresentano un ostacolo per il controllo efficiente a lungo termine della malattia.

In questo contesto, il presente progetto si propone di testare la suscettibilità ai farmaci attualmente in uso per il trattamento della leishmaniosi (antimoniali pentavalenti, paromomicina, amfotericina B liposomiale e miltefosina) nei confronti di ceppi di *Leishmania infantum* isolati da pazienti con diagnosi di leishmaniosi tegumentaria, la cui storia clinica di trattamento farmacologico è nota. Saranno confrontati tra loro ceppi di *L. infantum* derivanti da pazienti clinicamente sensibili o resistenti ai farmaci indagati, nonché ceppi di riferimento. Lo scopo è quello di incrementare le informazioni riguardo alla distribuzione della resistenza ai farmaci di *L. infantum* nella regione Emilia-Romagna. Verrà inoltre valutata la correlazione tra la risposta clinica del paziente al trattamento e la corrispondente sensibilità/resistenza *in vitro* del ceppo isolato ai farmaci anti-*Leishmania*. Infine, il progetto ambisce alla standardizzazione del saggio di suscettibilità, tramite l'esecuzione dei test in triplicato e l'utilizzo di un numero elevato di ceppi.

Per i precedenti scopi, promastigoti di *L. infantum* isolati da pazienti o ceppi di riferimento verranno coltivati *in vitro*. Diluizioni seriali dei diversi farmaci saranno testate nei confronti dei promastigoti al quarto giorno di crescita. La vitalità dei promastigoti dopo 72 ore di incubazione con le diverse concentrazioni di farmaci verrà rivelata mediante test dell'Alamar Blue, che prevede l'utilizzo di un indicatore di ossido-riduzione che cambia colore in risposta all'attività metabolica delle cellule. L'assorbanza dei campioni verrà misurata a 550 nm e 630 nm con un lettore di piastra spettrofotometro. I valori numerici ottenuti saranno utilizzati per calcolare il valore di IC50, che rappresenta la concentrazione del composto in grado di inibire la crescita del 50% dei promastigoti, mediante analisi di regressione non lineare.

1. Gradoni, L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: Operational and research challenges.

Euro Surveill 2013, 18, 20539

2. D. Savoia, Recent updates and perspectives on leishmaniasis, *J. Infect. Dev. Ctries.* 9 (2015) 588e596

3. Maroli, M.; Rossi, L.; Baldelli, R.; Capelli, G.; Ferroglio, E.; Genchi, C.; Gramiccia, M.; Mortarino, M.; Pietrobelli, M.; Gradoni, L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: Evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 2008, 13, 256–264.

4. Mattivi, A.; Massimiliani, E.; Cagarelli, R.; Albieri, A. LEISHMANIOSI IN EMILIA-ROMAGNA, Aggiornamento Epidemiologico 1999–2015. Available online: <https://salute.regione.emilia-romagna.it/normativa-e-documentazione/rapporti/malattieinfettive/leishmaniosi-er-epidemiologia-1999-2015> (accessed on 31 October 2022).

5. Gaspari, V.; Ortalli, M.; Foschini, M.P.; Baldovini, C.; Lanzoni, A.; Cagarelli, R.; Gaibani, P.; Rossini, G.; Vocale, C.; Tigani, R.; et al.

New evidence of cutaneous leishmaniasis in north-eastern Italy. *J. Eur. Acad Dermatol. Venereol.* 2017, 31, 1534–1540.

6. Jha, R. K., Sah, A. K., Shah, D. K., & Sah, P. (2013). The treatment of visceral leishmaniasis: safety and efficacy. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*, 52(192), 645–651.