

Studio immunohistochimico ed immunologico in Leishmaniosi cutanee del nuovo mondo

M. GALLI*, C. MARISCOTTI**, E. MISSONI****, R. MORELLI***,
G. ORLANDO*, M. BARBARESCHI**, G. CALELLO*, M. CHEMOTTI*,
M. GASPARRO*, C. INZOLI*

* *Clinica delle Malattie Infettive, Università di Milano*

** *Terza Cattedra di Anatomia Patologica, Università di Milano*

*** *Seconda Divisione di Malattie Infettive, Ospedale L. Sacco, Milano - Centro de Salud
- Rio Blanco - Nicaragua*

**** *Centro de Salud - Waslala - Nicaragua*

Introduzione

La leishmaniosi cutanea è una malattia ad ampia diffusione nelle regioni tropicali e sub-tropicali del vecchio e del nuovo mondo, caratterizzata clinicamente da lesioni cutanee singole o multiple di aspetto ulceroso o, più raramente, nodulare o vegetante (1-2-3).

Endemica in tutta l'America centrale, era ufficialmente considerata inesistente in Nicaragua, nonostante varie segnalazioni di medici locali (*Baltodano*, 1917; *Rosenfeld*, 1943; *Dávila Bolanos*, 1958; *Garcia Esquivel*, 1960) per omessa segnalazione all'OMS fino al 1977. L'adozione, a partire dal 1979, di un capillare programma di assistenza sanitaria e di un adeguato metodo di denuncia delle malattie trasmissibili, ha rivelato la reale dimensione del problema, che presenta una entità tutt'altro che trascurabile (tab. 1). Solo a questi ultimi anni, inoltre, risalgono i primi tentativi di giungere all'isolamento e alla tipizzazione dei ceppi di leishmania presenti nel paese.

La VI regione con i suoi 2.170 casi su 3.098 segnalati nel 1982, rappresenta, per le particolari condizioni climatiche e geografiche che consentono la persistenza del ciclo ospite-serbatoio-vettore, una delle zone con maggior incidenza della malattia. Presentiamo in questa sede i risultati di uno studio istologico, immunohistochimico ed immunologico eseguito in un gruppo di abitanti di questa regione affetti da leishmaniosi cutanea presentatisi per assistenza presso i centri di salute di *Rio Blanco* e *Waslala*.

Casistica, materiali e metodi

I centri di salute di Waslala e Rio Blanco servono un ampio territorio comprendente, oltre ai due villaggi maggiori, diverse comunità e singoli insediamenti rurali, con una popolazione complessiva, nei due municipi contigui, di circa 100.000 abitanti. Tutta la zona è a clima umido, compresa tra le isoiete di 2.250 e 2.500 millimetri di precipitazioni annuali, con abbondante vegetazione.

È oggetto di questo studio una serie consecutiva di 45 pazienti presentatisi ai

due centri di salute con un quadro clinico ed anamnestico compatibile con diagnosi di leishmaniosi cutanea. In tutti i pazienti è stato eseguito il test di Montenegro iniettando sottocute 0.1 ml di leishmanina ottenuta da ceppi venezuelani. È stato considerato positivo un infiltrato di diametro medio pari o superiore ai 10 mm.

Tutti i pazienti sono stati altresì sottoposti a prelievo biotico con asportazione radiale del bordo e di parte del pavimento dell'ulcera (o di una parte della lesione verrucoso-nodulare nei soggetti presentatisi con questa forma clinica).

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina.

Colorazioni istologiche sono state attuate mediante ematossilina eosina, Giemsa, PAS, impregnazione argentea secondo Wilder per il reticolo.

Negli stessi pazienti è stato altresì attuato uno studio immunoistochimico volto alla ricerca delle immunoglobuline intracitoplasmatiche utilizzando il metodo perossidasi-antiperossidasi (PAP) secondo Sternberger e coll. (4) previa blanda proteolisi.

Uno studio di alcuni parametri dell'immunità umorale è stato attuato in 23 pazienti, di cui è stato possibile raccogliere campioni di siero. I campioni ottenuti sono stati mantenuti a -20°C per periodi inferiori a 60 giorni e sono pervenuti presso la Clinica delle Malattie Infettive dell'Università di Milano in stato di congelamento. La valutazione della risposta immunitaria specifica anti-leishmania, nella indisponibilità di ceppi isolati nella regione interessata dallo studio, è stata attuata mediante immunofluorescenza indiretta verso *L. tropica* (5-6) e mediante test di immunoemoagglutinazione per la ricerca di anticorpi anti-*L. donovani* (liofilizzato Behring Institute). Sono stati considerati positivi titoli = 1:16 e = 1:32 rispettivamente.

Immunocomplessi circolanti (ICC) sono stati ricercati con tre differenti metodiche: C1q-binding assay (C1q-BA) secondo Zubler e coll. (7), C1q-competition assay (C1q-CA) (C1q-C1C Carlo Erba-Farmitalia-Milano) secondo Migliorini e coll. (8), Conglutinin binding competition assay (K_gB-CA) (C1C Carlo Erba-Farmitalia-Milano) secondo Gnemmi e coll. (9)

IgG, IgA, IgM, C3 e C4 sono stati dosati mediante immunodiffusione radiale impiegando piastre del commercio (Behringwerke, Scoppito).

I risultati ottenuti sono stati posti a confronto con quanto osservato nei sieri di 10 soggetti sani di controllo prelevati nella stessa area.

Risultati

I risultati dello studio istologico attuato nei nostri pazienti sono riassunti nella tabella 2.

È stata adottata una classificazione istologica in quattro gruppi sovrapponibili ai gruppi I, III, IV, V di Ridley (10). In dodici delle lesioni studiate sono state evidenziate Leishmanie, mentre in altri 18 casi erano presenti, all'interno degli istiociti o negli spazi intercellulari, corpuscoli ematossilinofili, fortemente tingibili con Giemsa, di 2-8 μm di diametro, interpretabili come debris nucleari o come

amastigoti degenerati (10).

In 16 casi sono state rinvenute plasmacellule contenenti un elevato numero di corpuscoli intracitoplasmatici sferici, ialini, PAS-positivi interpretabili come corpi di Russell.

L'indagine immunoistochimica ha dimostrato che tali formazioni, in 15 casi su 16, erano costituite da immunoglobuline di classe M e, in un solo caso, da IgG.

Il riscontro dei corpi di Russell era frequentemente associato alla presenza di Leishmanie e di corpuscoli ematosilinfili (8/16 e 5/16 rispettivamente), ma non era correlato ad un tipo particolare di infiltrato infiammatorio.

La reazione di Montenegro è risultata nettamente positiva in 12 pazienti su 45 (26.6%).

Anticorpi anti-*L. tropica* evidenziabili mediante IFA erano presenti in 17 dei 23 soggetti testati (79.9%).

Il reciproco del titolo nei soggetti positivi è risultato in media (\pm deviazione standard) di 90.35 ± 76.51 .

Anticorpi anti-*L. donovani* evidenziabili in IHA erano presenti in 4 pazienti su 23.

La media del reciproco del titolo nei soggetti positivi è risultata di 56 ± 49 .

Positivi per almeno uno dei due test sono risultati 19 pazienti.

Non sono state rilevate differenze significative tra i livelli serici medi di immunoglobuline e frazioni complementari tra i pazienti e 10 soggetti sani di controllo prelevati nella medesima area.

ICC sono risultati positivi in 20/23 soggetti con Leishmaniosi cutanea e in 6/10 controlli, mentre 16/23 pazienti e 4/10 controlli presentavano ICC evidenziabili mediante C1q-CA.

Solo 1 paziente, e nessuno dei controlli, risultava positivo per ICC in C1q-BA.

Le percentuali di inibizione (fig. 1) risultavano in media nettamente superiori nei pazienti sia in KgB-CA (70.86 ± 18.92 versus 41.75 ± 13.3) sia in C1q-CA (32.69 ± 22.15 versus 13 ± 2.94), ma meno sensibilmente in C1q-BA (2.52 ± 2.64 versus 1.7 ± 1.17).

Il limitato numero di controlli per il momento testati e la marcata differenza tra le deviazioni standard non consentono tuttavia una corretta analisi statistica del dato.

Discussione

Nelle Leishmaniosi cutanee del Nuovo Mondo gli amastigoti sono frequentemente assai scarsi e spesso del tutto assenti dalle lesioni.

La percentuale di pazienti con amastigoti nelle lesioni nell'ambito della nostra casistica rispecchia sostanzialmente il dato della letteratura (10).

In 18 delle lesioni esaminate sono stati riscontrati corpi ematosilinfili: in base ai rapporti con gli istiociti, alle caratteristiche tintoriali ed alle dimensioni, comparabili a quelle degli amastigoti, sembrerebbe di poterne prospettare l'interpretazione come amastigoti degenerati piuttosto che come debris cellulari.

Le caratteristiche istologiche di tutti i preparati esaminati, riconducibili alle ca-

tegorie della classificazione proposta da Ridley (10), permettono di esprimere senza eccezioni un giudizio di compatibilità con la diagnosi di leishmaniosi cutanea. Lo studio immunistoichimico delle lesioni ha evidenziato, in un numero elevato di pazienti, la presenza di plasmacellule contenenti corpi di Russell, costituiti, con una sola eccezione, da immunoglobuline di classe M.

Tale reperto è in accordo con quanto recentemente osservato mediante immunofluorescenza indiretta in soggetti affetti da leishmaniosi cutanea da un gruppo di ricercatori in Brasile (11).

I corpi di Russell vengono correntemente considerati come ammassi intracitoplasmatici di immunoglobuline accumulati in seguito ad uno squilibrio della attività secretoria della cellula (12).

A tutt'oggi non sono state tuttavia fornite interpretazioni soddisfacenti in merito alla natura del danno che induce nelle plasmacellule la formazione di tali ammassi di anticorpi,

Corpi di Russell sono stati descritti nell'ambito di patologie da agenti infettivi (13). In particolare le caratteristiche morfologiche delle plasmacellule osservate nella nostra casistica le rendono assai simili alle cellule morulari di Mott della tripanosomiasi cerebrale (14).

Il significato biologico di tali formazioni nella patogenesi della leishmaniosi cutanea è di complessa interpretazione. Di assoluto rilievo è il fatto che la presenza di corpi di Russell è quasi esclusivamente limitata, sia nella nostra casistica, sia in quella di Morearty e coll. (11), a plasmacellule secernenti IgM, nonostante che la popolazione plasmacellulare più ampiamente rappresentata nelle lesioni sia IgG secernente. Se si tiene conto che plasmacellule con corpi di Russell sono associate con elevata frequenza alla presenza nelle lesioni di amastigoti (50%) o di corpi ematosilinfili (31.2%) si può prospettare una relazione diretta tra presenza del parassita e presenza nell'infiltrato di cellule IgM secernenti: un'eventuale compromissione del meccanismo di secrezione anticorpale, legata ad una iperstimolazione mantenuta dalla mancata eliminazione del parassita, potrebbe giustificare la formazione degli ammassi intracitoplasmatici di IgM.

Non è stato possibile tuttavia allo stato attuale della ricerca prospettare alcuna relazione tra presenza di corpi di Russell nelle lesioni ed evoluzione clinica della malattia, positività della reazione di Montenegro, presenza di elevate concentrazioni sieriche di IgM, presenza ICC, presenza di elevati titoli anticorpali verso antigeni di *L. tropica* e *L. donovani*. Per quanto concerne questo ultimo punto, titoli significativi di anticorpi contro leishmanie del Vecchio Mondo erano presenti in numerosi soggetti esaminati, verosimilmente come espressione di reazioni crociate tra i vari ceppi.

La disponibilità di recente acquisita di leishmanie isolate in Nicaragua ci potrà consentire un più significativo dato di confronto a questo proposito.

Più in particolare per quanto attiene la mancata correlazione tra frequenza di plasmacellule intralesionali e titoli di anticorpi circolanti anti-leishmania, le nostre osservazioni concordano una volta ancora con quelle di Morearty e coll. (11).

La presenza di immunocomplessi circolanti nei nostri pazienti non correla nè con la severità e l'evoluzione clinica della malattia, nè con le caratteristiche isto-

logiche o con alcuno dei parametri sieroimmunologici considerati.

Il limitato numero di sieri di controllo fino ad ora pervenuti al nostro laboratorio non consente altresì una corretta analisi statistica del dato: è tuttavia fin d'ora possibile osservare come sostanziali differenze possono essere apprezzate tra le percentuali di positività, rispetto agli standards europei, delle tre diverse metodiche applicate.

Tali differenze, non inusuali tra metodiche per la determinazione degli immunocomplessi nell'ambito della stessa casistica, sono verosimilmente espressione di diversi spettri di lettura. Una percentuale di positività per immunocomplessi dosabili mediante K_gB-CA del 28% è stata recentemente evidenziata in una casistica italiana di leishmaniosi cutanea (*L. tropica*) (15): tale dato suggerisce una possibile implicazione dell'agente patogeno nell'evocazione di ICC.

L'elevata percentuale di positività della stessa metodica osservata nei nostri pazienti potrebbe tuttavia riflettere una attivazione aspecifica del compartimento linfocitario B, frequentemente osservata anche in popolazioni «normali» in regioni tropicali (vedi Galli e coll.).

La bassa percentuale di positività per ICC evidenziabili mediante C1q-binding nei nostri casi trova conferma ancora una volta nella casistica brasiliana studiata da Morearty e coll. (11), ma non nei dati raccolti in Venezuela da Marianella Castes Boscan (16).

Questa Autrice, a partire da una percentuale di legame in sieri di normali di poco superiore ai valori riscontrati mediamente nei laboratori europei, riscontra un significativo aumento di binding nelle leishmaniosi cutanee localizzate, ancor più evidente nelle mucocutanee e nelle cutanee disseminate.

TAB. 1 - Leishmaniosi tegumentarie in Nicaragua

	TOT	REG VI	INCIDENZA REG VI
1980	493	143	14/100.000
1981	1.047	620	177/100.000
1982	3.098	2.115	593/100.000
1983	1.808	1.244	230/100.000

TAB. 2 - Caratteristiche istopatologiche di 45 casi di Leishmaniosi tegumentaria

Classificazione di Ridley	N. (%)	CE N. (%)	L N. (%)	CR N. (%)
	I	2 (4.4)	— —	1 (2.2)
III	17 (37.7)	10 (22.2)	5 (11.1)	5 (11.1)
IV	9 (20)	2 (4.4)	5 (11.1)	5 (11.1)
V	17 (37.7)	6 (13.3)	1 (2.2)	6 (13.3)
	45 (100)	18 (39.9)	12 (26.6)	26 (35.5)

CE = Corpi ematosilinfili

L = Presenza di Leishmanie

CR = Corpi di Russel

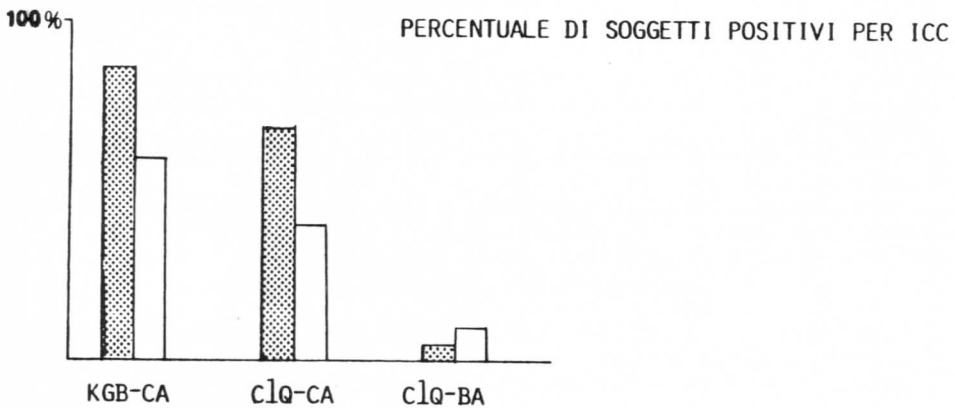
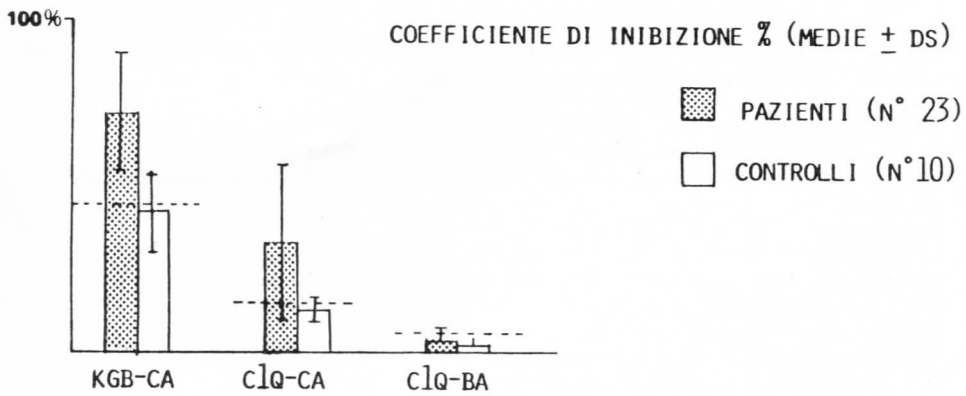


FIGURA 1
Immunocomplessi circolanti nella Leishmaniosi tegumentaria

Bibliografía

- 1) Missoni E., Morelli R.: Survey of 259 cases of American Cutaneous Leishmaniasis in Nicaragua. *J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
- 2) Allen A.C.: Eruptions caused by protozoa, arthropods and helminths. In: *The Skin*, the C.V. Mosby Company, St. Louis, 1954, pag. 496-498.
- 3) Manson-Bahr P.E.C.: Cutaneous Leishmaniasis of the New World. In: *Manson's Tropical Disease* 18th ed., Baillière Tindall, London, 1982, pag. 109-113.
- 4) Sternberger L.A., Hardy P.H., Cuculis J.J., Meyer H.G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18:315-333, 1970.
- 5) Walton B.C., Brooks W.H., Arjona I.: Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21:296-299, 1972.
- 6) Matossian R.M., Kurban A.K., Malak J.A.: Circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis: their detection by immunofluorescence. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 69:450-452, 1975.
- 7) Zubler R.H., Lange G., Lambert P.H., Miescher P.A.: Detection of immune complexes in unheated sera by a modified ¹²⁵I-C1q binding test: Effects of heating on the binding of C1q by immune complexes and application of the test to Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *J. Immunol.*, 116:232-235, 1976.
- 8) Migliorini P., Trovatiello G., Cantarella S., Manca F., Bombardieri S., Celada F.: An enzymatically active antigen-antibody probe to measure circulating immune complexes. *E. coli* β -galactosidase in the probe and C1q as the recognition unit. *J. Immunol. Methods*, 59:245-254, 1983.
- 9) Gnemmi E., Migliorini P., Chierigatti G., Manca F., Cantarella S., Celada F.: A new competitive immunoenzymatic assay to determine circulating immune complexes. *J. Res. Lab. Med.*, 8:509-512, 1981.
- 10) Ridley D.S.: A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 515-521, 1980.
- 11) Morearty P.L., Grimaldi G. Jr., Galvao-Castro B., De Oliveira Neto M.P., Marrochi M.C.A.: Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin. exp. Immunol.*, 47:59-64, 1982.
- 12) Blom J., Mansa B., Wiik A.: A study of Russell bodies in human monoclonal plasma cells by means of immunofluorescence and electron microscopy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 84: 335, 1976.
- 13) Lever W.F.: *Histopathology of the skin*. 4th ed. J.B. Lippincott, Philadelphia-Toronto, 1967.
- 14) Marsden P.D.: African Trypanosomiasis. In: Hoepflich P.D.: *Infectious diseases*, 3rd edition, Harper and Row Publishers, Philadelphia, 1983, pag. 1146-1153.
- 15) Mantegna M., Robberto D., Miceli M.D., Pintagro C., Librizzi R., Tringoli G.: Ricerca di anticorpi e di immunocomplessi circolanti nella Leishmaniosi cutanea. *Ann. It. Derm. Clin. Sper.*, 37: 225-233, 1983.
- 16) Castes Boscan M.: Leishmaniasis cutanea americana-Tripanosomiasis americana: Un estudio comparativo de la respuesta inmunológica mediada por células y de su regulación en estas parasitosis. Universidad Central de Venezuela - junio 1984.