POLICLINICO DI **SANT'ORSOLA**

Regione Emilia-Romagna

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA

La Leishmaniosi in ottica One-Health

Sala XX Maggio
Terza Torre
Regione Emilia-Romagna
Bologna

23 MAGGIO
2023

La Leishmaniosi nell'uomo
Leishmaniosi Viscerale: aspetti clinici e terapeutici

Luciano Attard

Percorso del Paziente con Malattie Infettive ad Alta Trasmissibilità e delle Emergenze Infettivologiche

Dipartimento Interaziendale per la Gestione Integrata del Rischio Infettivo

IRCCS Policlinico S. Orsola – AUSL Bologna – IRCCS IOR Bologna – AUSL Imola

Leishmaniosi viscerale

Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap.
Weekly epidemiological record. 3 September 2021

- Diffusa in Sud-America, Africa orientale, Asia meridionale e bacino del Mediterraneo
- 79 paesi considerati endemici per Leishmaniosi Viscerale
- 7 paesi riportano il 90% di tutti i casi: Brasile, Etiopia, India, Kenya, Somalia, Sudan e Sud-Sudan
- **Nel 2015 inserita da WHO tra le NTD**
- Nel 2020 riportati 12.838 nuovi casi. *[Incidenza attuale stimata: 50.000-90.000 casi/anno]*
- E´ una delle malattie parassitarie a maggiore letalità (3.3-2.7% dei casi riportati).
  Ma 7-10% nella casistiche ospedaliere.
- Seconda causa di morte per infezione da Protozoi: media di 538 decessi riportati/anno

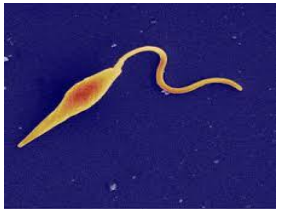
Leishmaniosi viscerale

Due forme distinte epidemiologicamente:

- Leishmaniosi viscerale antroponotica (serbatoio umano)
  L. donovani
  (Africa orientale e Medio oriente)

- Leishmaniosi viscerale zoonotica (serbatoio animale)
  L. donovani e L. infantum
  (Africa orientale, Sud America, bacino del Mediterraneo ed Asia meridionale)

Leishmania: protozoo intracellulare obbligato



Tropismo: cellule SRI

Specie viscerotrope: affinità per cellule di Kupffer, macrofagi splenici e midollari

Specie dermotrope: affinità per cellule dendritiche e macrofagi cutanei

Leishmania Infantum

- Unica specie endemica nella nostra area geografica.
- Responsabile sia di forme viscerali (zimodemi MON 1 e MON 72), che cutanee (zimodemi MON 24, 29, 33). Tale demarcazione per zimodemi è ancora valida?
- Il viscerotropismo è subspecie-specifico (Studio in vivo sui topi ibridi)

Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermotropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model

Annie Sulahian [a,*], Yves Jean François Garin [a], Francine Pratlong [b], Jean Pierre Dedet [b], Francis Derouin [a]

[a] *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université Paris VII, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France*
[b] *Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Faculté de Médecine, 163 rue Auguste Broussonet, 34000 Montpellier, France*

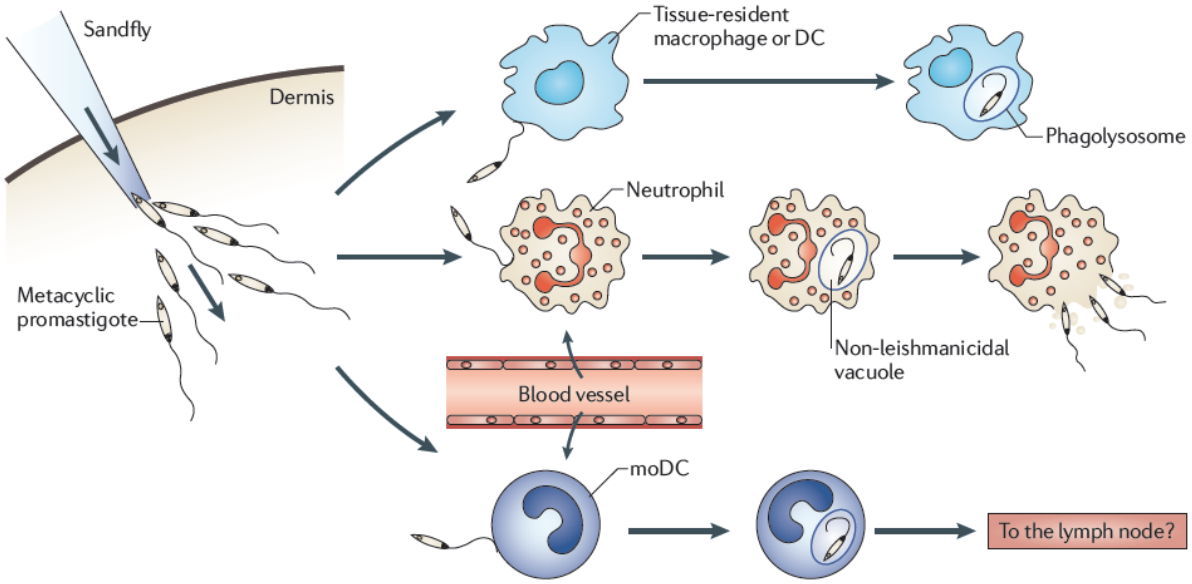
Received 8 October 1996; revised 21 November 1996; accepted 27 November 1996

- 22 isolati di *Leishmania infantum* provenienti da 11 pazienti HIV+ e 11 pazienti HIV- (16 affetti da LV e 6 da LC) appartenenti a 3 Zimodemi (MON 1, 29 e 33)
- Ogni isolato (in ragione di ~10^7 promastigoti) fu iniettato EV in 16-20 topi ibridi (BALB/c) a T_0
- Valutazione burden parassitario, mediante coltura, su fegato e milza di 4-5 topi a T_7, T_{20}, T_{60}, T_{90} e T_{100}

✓ <u>Gli isolati da pazienti con LC, sebbene inoculati EV, non produssero mai visceralizzazione</u>

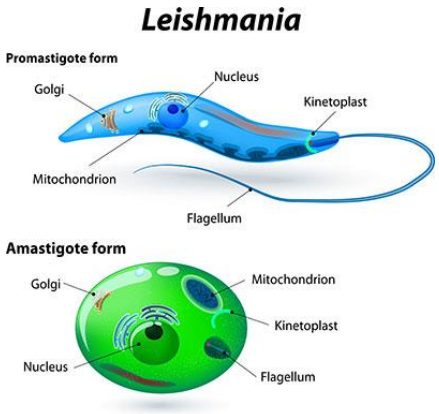
✓ <u>Gli isolati da pazienti HIV+ mostrarono minore virulenza rispetto a quelli da HIV-</u>

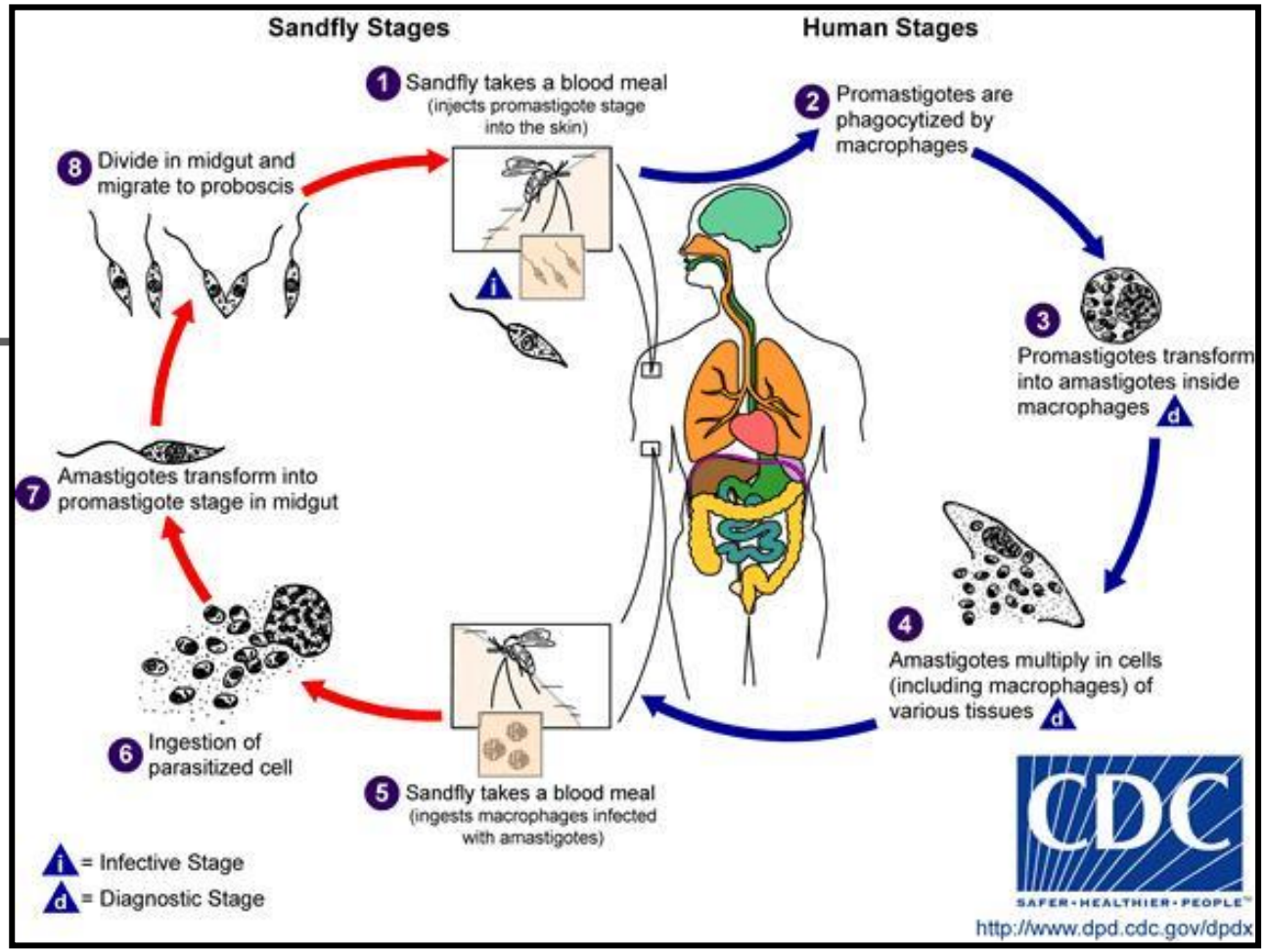
Patogenesi Leishmaniosi



L'apparato pungitore del flebotomo durante il pasto lacera i capillari con stravaso ematico intradermico. La saliva del dittero ha effetto anticoagulante.

I promastigoti penetrati nel derma vengono fagocitati da cellule dendritiche e macrofagi cutanei, nonché da neutrofili (prime cellule parassitate) e da monocito-macrofagi provenienti dal circolo





Nella lesione primaria (inapparente in LV) si attiva la risposta immunitaria -> fagocitosi -> proliferazione protozoaria intracellulare (trasformazione in amastigoti) -> lisi cellule fagocitanti-> ulteriore infiltrazione di altre cellule a loro volta parassitate. Le Leishmanie viscerotrope hanno maggiore resistenza agli ossidanti contenuti nei fagosomi (Ossido nitrico e Perossido d'idrogeno)

Forma viscerale: infezione e malattia

- La risposta efficace è Th1 (con produzione IL-12, γ IFN, TNF alfa ed NO) poiché centrata sulla risposta cellulo-mediata (NK e Macrofagi). La risposta Th2, sebbene fondamentale per elminti, è inadeguata per parassiti intracellulari e caratterizzata da produzione IL-10 che inibisce la risposta infiammatoria

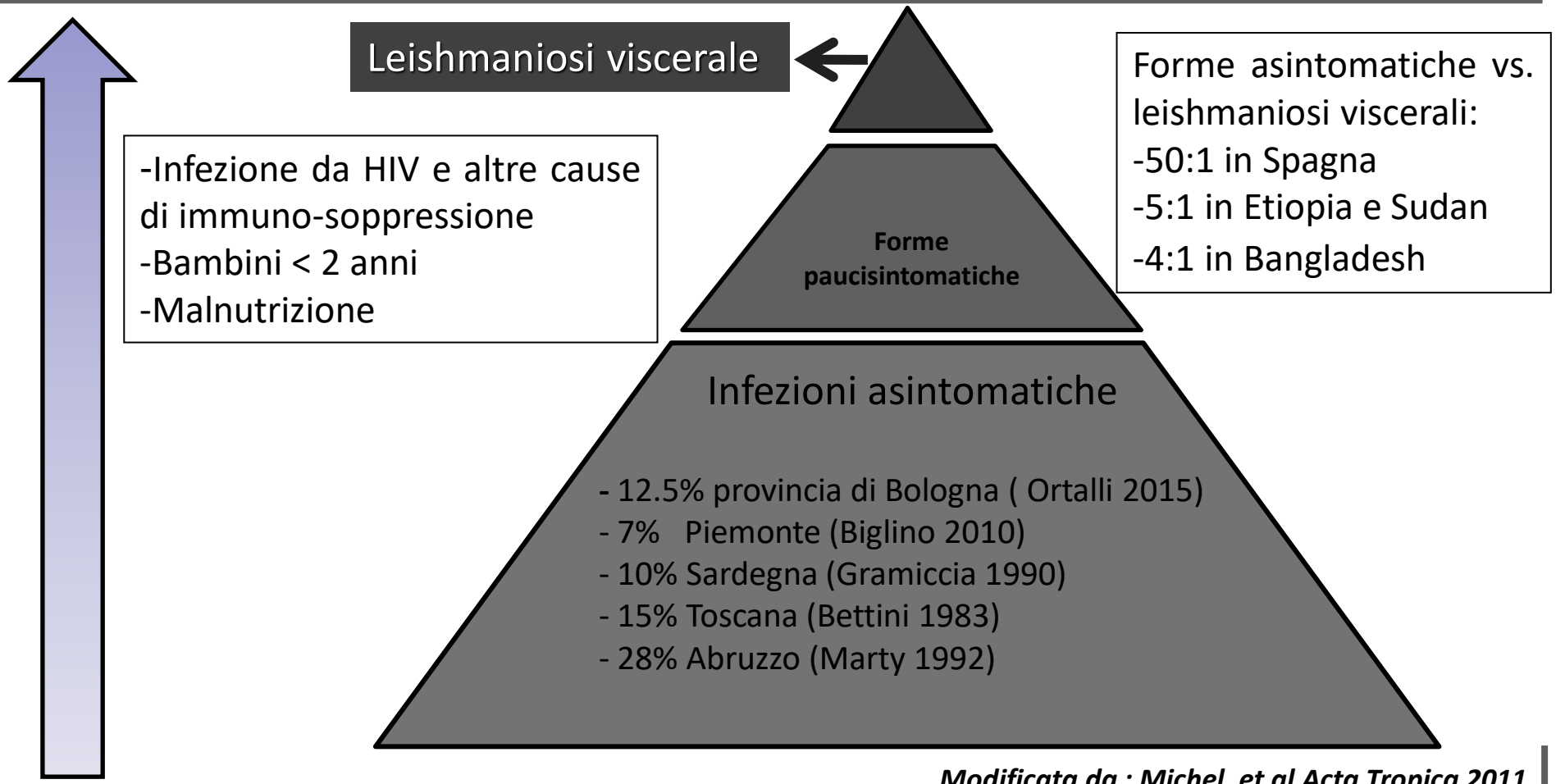
- Si stima che la risposta immunitaria riesca a controllare l'infezione nel 95% dei soggetti immunocompetenti infettati. Quando manca il controllo, la Leishmania si diffonde veicolata dai fagociti e prolifera nel SRI (ove si ha la massima carica parassitaria)

- Si ritiene che tale controllo dipenda da vari fattori: virulenza del protozoo, carica parassitaria, predisposizione genetica, stato nutrizionale, stato immunitario ed età.

  La classica reazione cutanea alla Leishmanina (Intradermoreazione di Montenegro) era espressione di acquisita immunità cellulo-mediata verso l'infezione

- Il rapporto soggetti malati/infettati è pertanto diversificato in base al contesto

Leishmaniosi viscerale: la punta di un iceberg



Modificata da : Michel et al Acta Tropica 2011

Ibarra-Meneses et al. Parasites & Vectors (2022) 15:5
https://doi.org/10.1186/s13071-021-05129-y

Parasites & Vectors

REVIEW Open Access

Identification of asymptomatic *Leishmania* infections: a scoping review

Criteri per diagnosi Leishmaniosi Asintomatica

1) Residenza (o soggiorno prolungato) in area endemica
2) Nessun segno/sintomo di Leishmaniosi
3) Positività di combinazione di test sierologici, molecolari, cellulari e/o parassitologici

Table 3 Strategies employed by researchers to detect asymptomatic *Leishmania* infection

Type	Test(s) used	No. of studies	References
1	Serological and molecular and cellular and parasitological	2	[72, 76]
2	Serological and molecular and cellular	13	[12, 18, 27, 51, 58, 63, 66, 80, 83, 85, 97, 100, 105]
3	Serological and molecular and parasitological	7	[35, 55, 61, 69, 78, 90, 119]
4	Serological and molecular	31	[11, 13, 17, 28, 32, 34, 41–43, 45, 46, 52–54, 59, 62, 64, 68, 73, 82, 86, 87, 91, 93, 95, 98, 99, 101, 108, 116–118]
5	Serological and cellular	14	[20, 21, 23–25, 29, 31, 49, 102, 103, 109–112]
6	Molecular and cellular	2	[14, 67]
7	Positive serological test(s) only	28	[22, 26, 30, 33, 36–39, 44, 47, 48, 50, 57, 70, 71, 74, 75, 77, 79, 81, 88, 92, 94, 96, 104, 106, 107, 114]
8	Positive molecular test(s) only	2	[41, 89]
9	Positive cellular test(s) only	5	[56, 60, 65, 113, 115]
10	Positive parasitological test only	1	[84]

Fisiopatologia della Leishmaniosi viscerale

INVASIONE SRI (milza, fegato, midollo osseo e linfonodi)

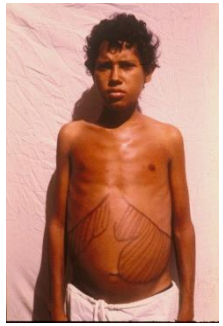
- Milza: **Splenomegalia** -> sequestro splenomegalico, asplenia funzionale
- Fegato: **Epatite, ipoalbuminemia** -> epatomegalia, ittero, ascite, edemi
- Midollo osseo: **Citopenia,** spesso trilineare**:**
  - **Neutropenia** -> infezioni secondarie
  - **Anemia** -> pallore, astenia
  - **Piastrinopenia** -> emorragie
- Linfonodi: possibili **Linfoadenomegalie**
- Frequente **Ipergammaglobulinemia** da iperattivazione B-cellulare policlonale
- Possibili fenomeni **autoimmunità** da cross-reattività tra Ag protozoari ed Ag umani
- Possibile **Sindrome Emofagocitica (HLH)** da iperattivazione immunitaria -> marea citochinica

INTERESSAMENTO ALTRI ORGANI

- Possibile danno mucosa intestinale: **Diarrea,** Malassorbimento, **Calo ponderale**
- Possibile danno renale glomerulare: **Insufficienza renale** -> edemi

Leishmaniosi Viscerale

Definizione di caso WHO 1999



Presenza sintomi clinici

(Febbre irregolare prolungata, splenomegalia, calo ponderale)

e

Esame parassitologico positivo

e/o

Sierologia positiva

Leishmaniosi Viscerale

Anamnesi: fattori di rischio

Per esposizione all'infezione

- **Permanenza in area endemica***
- **Rari: uso stupefacenti EV, *trasfusioni*~, trapianto d'organo**

Per predisposizione alla malattia

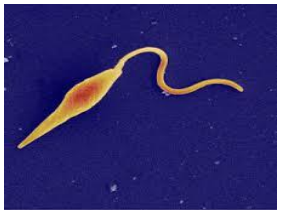
- **Immunodepressione da HIV**
- **Terapie immunodepressive §**

~ *solo sangue in toto*

* E. Romagna ed altre regioni italiane sono endemiche per LCan

§ es. steroidi (alto dosaggio per almeno 30 gg), metotrexate, ciclosporina, farmaci biologici.

Presentazione Clinica



Incubazione

2-8 mesi (range 14 giorni-18 mesi)

Riportata fino a 34 mesi!

Leishmaniosi umana:

Notifiche Regione Emilia Romagna: 2013-2018

Forma	2013	2014	2015	2016	2017	2018	totale
LC	**5**	**16**	**34**	**22**	**13**	**41**	**135**
LV	**30**	**22** (2 HIV+)	**7** (1 HIV+)	**5** (1 HIV+)	**17** (1 HIV+)	**39**	**120**
totale	35	38	41	27	30	80	255
Esposizione extra RER	1 LC	1 LC	5 LC	5 LC 2 LV	3 LC 2 LV	4 LC 1 LV	19 LC 5 LV

Esordio clinico forme viscerali: novembre-aprile 79 casi (66%), maggio-ottobre 41 casi (34%)
Esordio clinico forme cutanee: novembre-aprile 47 casi (35%), maggio-ottobre 88 casi (65%)

Numero medio di flebotomi per cattura

Provincia	2013	2014	2015	2016	2017	2018
BOLOGNA	334	66	66	537	532	147

Leishmaniosi viscerale

Presentazione clinica classica

Esordio cronico o subacuto (più raramente acuto)

- Febbre/FUO (con febbre anche intermittente)
- Astenia
- Anoressia
- Calo ponderale
- Splenomegalia
- Epatomegalia
- +/- Linfoadenopatia (sprt HIV+ e Sudanesi)
- +/- Interessamento gastroenterico (sprt HIV+)

Possibili superinfezioni batteriche e micotiche anche severe!

Leishmaniosi viscerale

Presentazione clinica classica

Dati laboratorio

- Pancitopenia: anemia, leucopenia, poi trombocitopenia
- Ipergammaglobulinemia marcata *
- +/- ipoalbuminemia
- +/- ipertransaminasemia
- +/- aumento creatininina
- +/- Fattore Reumatoide positivo
- +/- immunocomplessi
- +/- autoanticorpi (Citrullina, ANA, dsDNA, Ro, La, Sm, Cardiolipina, PLT)
- +/- score positivo per HLH (Sindrome emofagocitica)

* Può mancare nell'immunodepresso

Criteri diagnostici HLH 2004

Histiocyte Society—Treatment Protocol of The Second International HLH Study 2004

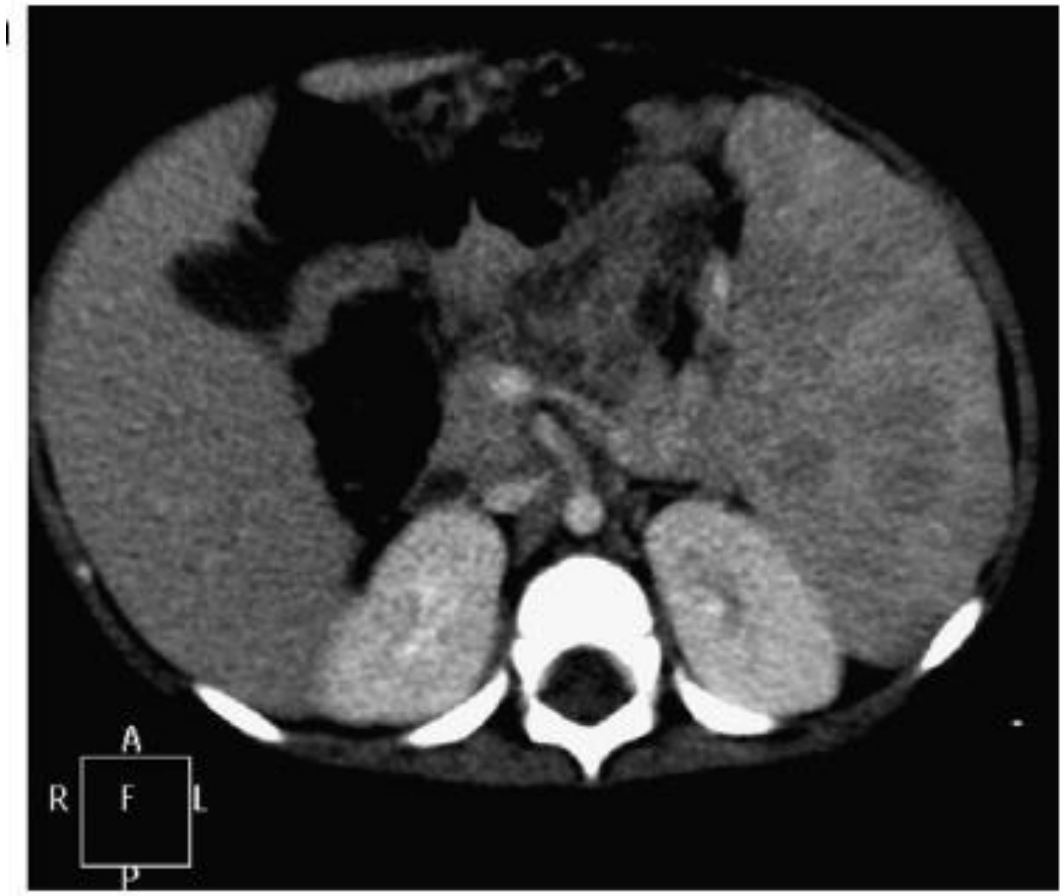
A. Molecular diagnosis compatible with hemophagocytic lymphohistiocytosis or

B. At least five of the following eight criteria:

1. Fever ≥ 38.5 ° C for a period ≥ 7 days.
2. Splenomegaly.
3. Cytopenias (two or more lineages)
   a. Hemoglobin <9 g/dL or <10 g/dL in newborns
   b. Platelets < 100 x 109/L
   c. Neutrophils <1,0 x 109/L
4. Hypertriglyceridemia or hypofibrinogenemia
   a. Triglycerides >265 mg/dL
   b. Fibrinogen < 150 mg/dL
5. Hemophagocytosis in the bone marrow, spleen, lymph nodes, or liver, with no evidence of malignancy
6. Decrease or absence of natural killer cell activity
7. Serum ferritin > 500 µg/L
8. Increased soluble CD25 ≥ 2400 U/mL

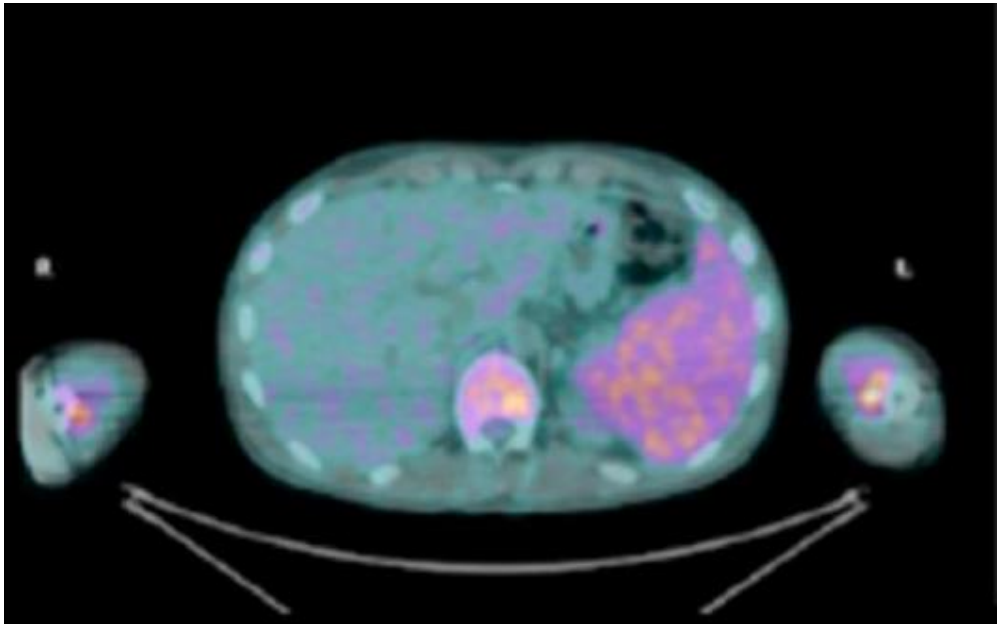
IMAGING e LV

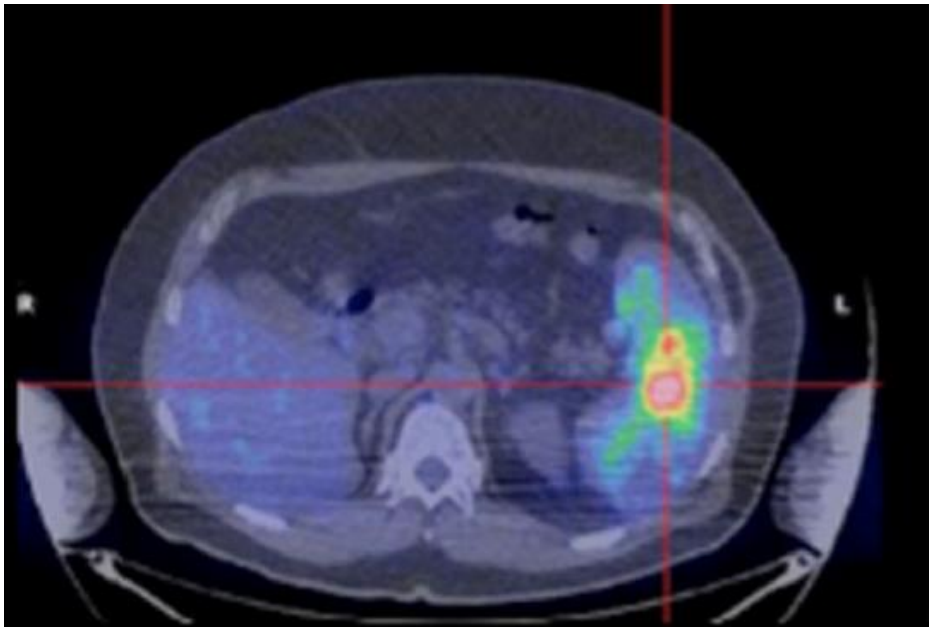
Lesioni focali spleniche rilevate a TC/RM: non solo linfoma od emboli settici, ma anche **Leishmaniosi viscerale**



18 FDG-PET e LV

Pattern diffuso e pattern focale





Leishmaniosi viscerale in Italia

Incidenza: Fino agli anni ‘80: <40 casi/anno notificati
Forte aumento incidenza negli anni ‘90 (AIDS!)
Dal 2000: >200 casi/anno

Negli ultimi 2 decenni:

- Pochi casi AIDS-relati grazie ad HAART (< 5%)
- Prevalenza di casi in soggetti senza patologie predisponenti
- Inizio casi in altre tipologie di immunodepressi (es. trapiantati)

Leishmaniosi viscerale in Emilia Romagna

Una storia misteriosa…..

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. Vol. 68. No. 5. 1974.

STUDIES ON MEDITERRANEAN LEISHMANIASIS
I. AN OUTBREAK OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN NORTHERN ITALY

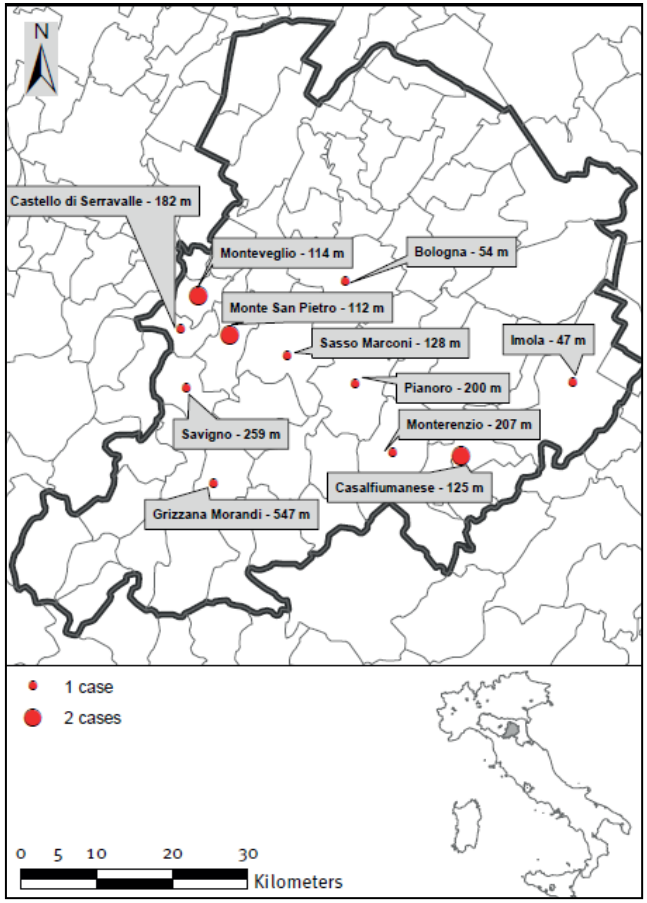
S. PAMPIGLIONE
Professor of Parasitology, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna
M. LA PLACA
Professor of Microbiology, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Bologna
AND
G. SCHLICK
Director, Servizio di Anatomia e Istologia Patologica, Ospedale Maggiore, Bologna

- Epidemia Leishmaniosi viscerale del 1971-72: **60 casi**
- *Nei 50 anni precedenti solo 25 casi riportati in Emilia Romagna*
- 42 adulti (36 M, 6 F) e 18 bambini (9 M, 9 F)
- Molte diagnosi post-mortem (patologia non endemica)
- 13 morti (21.6%): 11 mai trattati, 2 parzialmente trattati
- *In seguito solo casi sporadici fino all'avvento dell'AIDS*

RAPID COMMUNICATIONS

Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013

S Varani (stefania.varani@unibo.it)[1], R Cagarelli[2], F Melchionda[3], L Attard[4], C Salvadori[4], A C Finarelli[2], G A Gentilomi[1], R Tigani[1], R Rangoni[5], R Todeschini[6], A Scalone[7], T Di Muccio[7], M Gramiccia[7], L Gradoni[7], P Viale[4], M P Landini[1]



- **14 casi: 10 adulti e 4 bambini (tutti < 18 mesi)**
- **1 solo paziente HIV+ (adulto)**
- **Nei 5 anni precedenti solo casi sporadici (media 2.6 casi /anno)**

www.eurosurveillance.org

Casistica pazienti adulti, Bologna 2010-maggio 2023 (108 casi)

Andamento annuale alternato tra casi sporadici (media 4 casi/anno) e picchi

Anno focolaio	Numero casi
2013	11
2017	11
2018	19
2022	21
2023	13 (ad oggi)

Casistica pazienti adulti, Bologna 2010-gennaio 2022 (82 casi)

Variabile	percentuale (numero)
Res. Collinare	57,3% (47/82)
Res. Urbana	34,3% (28/82) tutti attività all'aperto/cane
Res. Rurale	7,4% (6/82)
Possesso cane	29,3% (24/82)
Hobbies all'aperto	63,4% (52/82)
Genere	**percentuale (numero)**
Maschi	86,6% (71/82)

Casistica pazienti adulti, Bologna 2010- gennaio 2022 (82 casi)

Presentazione clinica

Febbre	97.6 % (80/82)
Splenomegalia	91.5 % (75/82) ↓ area media 125 cmq
Astenia	80.5 % (66/82)
Epatomegalia	62.2 % (51/82)
Anoressia	57.3 % (47/82)
Sudorazioni notturne	57.3 % (47/82)
Calo ponderale	54.9 % (45/82) ↓
Linfoadenomegalia	31.7 % (26/82)

Casistica pazienti adulti, Bologna 2010- gennaio 2022 (82 casi)

Parametri laboratoristici ed evolutivi

Piastrinopenia	91.5 % (75/82) ↑
Anemia	86.6 % (71/82)
Iperferritinemia	84.1 % (69/82) ↑
Ipertransaminasemia	74.4 % (61/82)
Leucopenia	70.7 % (58/82)
Ipergammaglobulinemia	64.6 % (53/82) ↓
HLH	32.9 % (27/82) ↑
Decesso	**11 %** **(6/9 >70 aa, 2/9 cirrotico, 1/9 sepsi)**

Terapia

Visceral Leishmaniasis (VL)
Treatment Recommendations

Treatment in immunocompetent patients

- Treatment with **L-AmB** is recommended
- The FDA-approved dosage regimen is **3 mg/kg/day** IV on days 1–5, 14, and 21 (total dose, 21 mg/kg)
- In case of VL caused by *L. donovani*, acquired in the Indian subcontinent (South Asia), in patients ≥12 years of age, with BW ≥30 kg, not pregnant or breastfeeding, treatment with the oral agent **miltefosine**, 2.5 mg/kg per day (maximum, 150 mg, in 3 divided doses) for 28 days, is a possible alternative to L-AmB, particularly in persons weighing <75 kg

IDSA Guidelines, 2016

Visceral Leishmaniasis (VL)
Treatment Recommendations

L-AmB 10 mg/kg once is now the treatment of choice for Indian subcontinent VL

[96% efficacy]

Sundar S, et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med., 2010*

Sundar S, et al. Single-dose indigenous liposomal amphotericin B in the treatment of Indian visceral leishmaniasis: a phase 2 study. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;

Mondal D, et al. Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study. *Lancet Glob Health.* 2014;

Visceral Leishmaniasis (VL)
Treatment Recommendations

Treatment in immunocompromised patients

- The FDA-approved dosage regimen of **L- AmB** in immunocompromised patients , including HIV+, is **4 mg/kg/day IV**, on days 1–5, 10, 17, 24, 31, and 38 (10 doses over a 38-day period), for a total dose of 40 mg/kg.

- *Leishmania* infection that becomes clinically manifest or worsens after initiation of ART should be treated with anti-leishmanial (and, if indicated, corticosteroid) therapy; leishmaniasis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome (**IRIS**) reactions after initiation of ART have been reported occasionally.

IDSA Guidelines, 2016

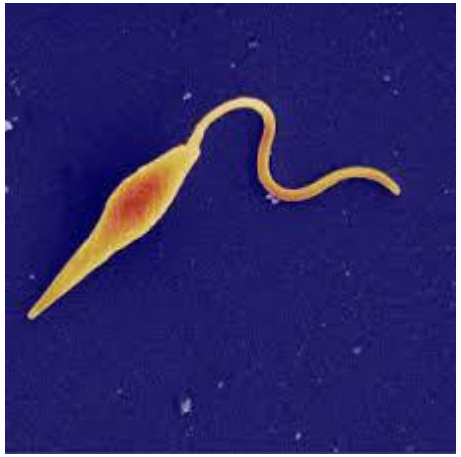
LA NOSTRA ESPERIENZA A BOLOGNA

Etiologia: tutti casi da *L. infantum*

	L-Amb 10 mg/Kg	L-Amb 3 mg/Kg	p value	L-Amb total 40 mg/kg
N° pazienti	52/82 (63,4%)	22/82 (26,8%)		8/82 (9,8%)
Età mediana [IQR]	**59,5 [47-69]**	**67,5 [48-70]**	**p= 0.035**	59 [46-74]
Creatinina basale Mediana [IQR]	**1,0 [0,7-1,1]**	**1,5 [0,8-2,8]**	**p=0.005**	1,0 [0,8-1,1]
HIV+	2/52	0		3/8 (AIDS)
Cirrosi	3/52	5/22		0
Malattia ematologica	0	1/22		4/8
Tumore solido	1/52	2/22		1/8 (Chemioterapia)

In corso studio prospettico e retrospettivo, multicentrico, per valutare efficacia e tollerabilità (**nefrotossicità)** tra schema terapeutico di L-Amb 10 mg/Kg e schema terapeutico di L-Amb 3 mg/Kg

Ringraziamenti



- **Mattia Calzolari: IZSLER ER-Lombardia**
- **Stefania Varani, Margherita Ortalli: CRREM Bologna**
- **Bianca Granozzi: Clinica Malattie Infettive, Bologna**
- **Roberto Cagarelli: Servizio Prevenzione collettiva e Sanità pubblica, Assessorato Politiche per la Salute RER**

Grazie per l’attenzione!

Asymptomatic *Leishmania* Infection: A New Challenge for *Leishmania* Control

Om Prakash Singh,[1] Epco Hasker,[2] David Sacks,[3] Marleen Boelaert,[2] and Shyam Sundar[1]

VIEWPOINTS • CID 2014:58 (15 May) • 1425

Pattern infezione sintomatica (vs. asintomatica)

Riscontri microbiologici

- Elevato titolo anticorpale
- WB +
- PCR +

Risposta cellulo-mediata

- LST negativa
- IL-10 plasmatica elevata
- Risposta Th1 soppressa, profilo Th2 accentuato
- Elevati CD8, bassi CD4
- Bassa proliferazione linfocitaria

Casistica LV nel Nord Italia (1990-2005)

Tropical Medicine and International Health doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x

VOLUME 13 NO 2 PP 256–264 FEBRUARY 2008

The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors

Michele Maroli[1], Luca Rossi[2], Raffaella Baldelli[3], Gioia Capelli[4], Ezio Ferroglio[2], Claudio Genchi[5], Marina Gramiccia[1], Michele Mortarino[5], Mario Pietrobelli[6] and Luigi Gradoni[1]

1 *Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*
2 *Department of Animal Production, Epidemiology and Ecology, University of Turin, Turin, Italy*
3 *Department of Veterinary Public Health and Animal Pathology, University of Bologna, Bologna, Italy*
4 *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padua, Italy*
5 *Department of Animal Pathology, Hygiene and Veterinary Public Health, University of Milan, Milan, Italy*
6 *Department of Experimental Veterinary Sciences, University of Padua, Padua, Italy*

Nord Italia (1990-2005): 230 casi (10.9% dei casi italiani)
Lombardia 109, Piemonte 42. E.Romagna 25
Incidenza stabile, ma popolazione molto diversa:

1990 HIV+ 100%
2005 HIV+ 5%

Sakib Burza, Simon L Croft, Marleen Boelaert

www.thelancet.com Vol 392 September 15, 2018

L'infezione asintomatica è comune nelle aree endemiche:

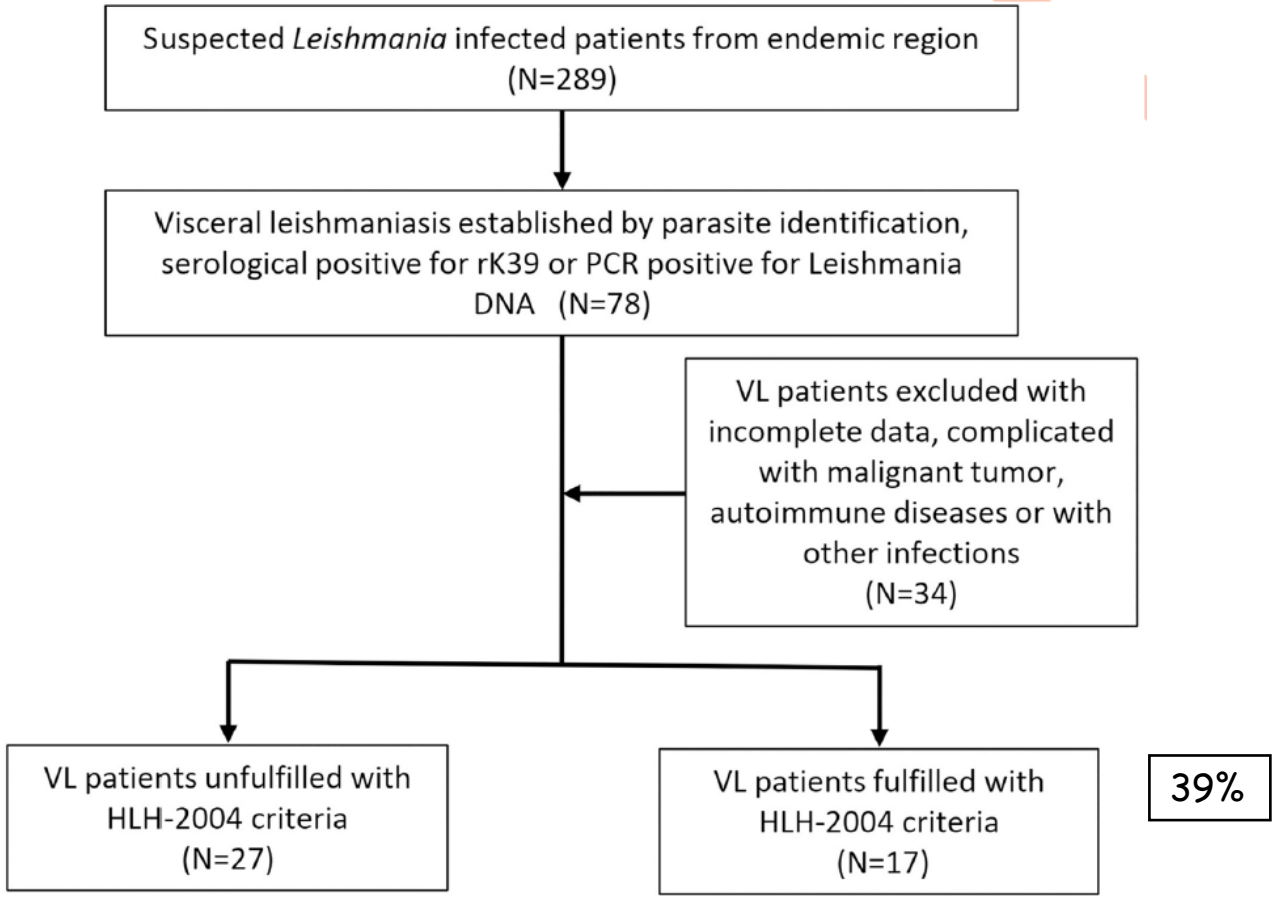
La sieroprevalenza per *L donovani* varia dal il 7% al 63% nel subcontinente indiano
La sieroprevalenza per *L infantum varia* dal 29% al 34% nei bambini brasiliani

Uno studio condotto in Etiopia su una coorte di oltre 4000 individui ha rilevato una prevalenza di soggetti con PCR positiva del 17%

Le infezioni asintomatiche superano quelle sintomatiche di:
4-17 volte nel subcontinente Indiano
5.6 volte in Etiopia
4 volte in Kenya
Tra il 2% e il 23% delle infezioni asintomatiche rilevate in India sviluppano sintomi entro 12 mesi. Un alto titolo anticorpale appare essere marcatore di progressione della malattia

Leishmaniosi viscerale e HLH secondaria

Clinical and laboratory characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis induced by *Leishmania infantum* infection. Shi Q. et Al. PLOS Neglected Tropical Diseases | https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009944 November 4, 2021



Anatomia patologica LV

- Midollo Osseo: Ipercellularità, iperplasia eritroide, diseritropoiesi

  Amastigoti nei macrofagi (raramente in neutrofili ed eosinofili)

- Fegato: Steatosi macrovescicolare, epatite granulomatosa, necrosi ischemica, piecemeal necrosis, infiltrazione portale

  Amastigoti in Kupffer cells

  Nostri dati: in 2/4 LV con biopsia epatica: Epatite Granulomatosa

- Milza: Atrofia polpa bianca, forte infiltrazione plasmacellulare

  Amastigoti nei macrofagi