Aspetti biologici e clinici della malaria: progressi verso l'eradicazione della malattia

Andrea Mosca[1], Nicoletta Basilico[2], Romualdo Grande[3], Donatella Taramelli[2]
[1]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche e [2]Dipartimento di Sanità Pubblica - Microbiologia - Virologia, Università degli Studi di Milano
[3]Laboratorio Centrale, Settore Microbiologia, Fondazione Ca' Granda IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ABSTRACT

Biological and clinical aspects of malaria: toward global eradication. This overview covers several aspects of malaria, from basic information on the biology of the genus *Plasmodium* to the pathogenesis and diagnosis of the species infecting humans. Current treatment regimens and drug-resistance problems are also discussed. Particular attention is given to the various aspects of malaria epidemiology and to the cellular and immune mechanisms that may sustain the protection against malaria in subjects heterozygotes for various hemoglobin disorders. A short critical review of actual tools for the diagnosis and monitoring of malaria is also provided. Finally, a presentation of the Italian Malaria Network is outlined.

INTRODUZIONE

Insieme a tubercolosi e HIV/AIDS, la malaria rappresenta la terza causa di mortalità nel mondo, responsabile ogni anno di oltre 800.000 morti e di un contagio che interessa da 250 a 300 milioni di persone (1). La maggior parte dei decessi riguarda i bambini sotto i sei anni e le donne in gravidanza; l'area di diffusione è soprattutto nell'Africa subsahariana (2). E' impressionante rilevare che la malaria uccide mediamente un bambino ogni trenta secondi e che negli ultimi 4 anni più di 1 miliardo di persone hanno contratto questa malattia (3).

L'endemismo della malaria riguarda le aree tropicali e subtropicali a un'altitudine inferiore ai 1800 metri, in una superficie globale dove risiede circa il 40% della popolazione mondiale (1) (Figura 1) e si stima che un numero compreso tra 10.000 e 30.000 viaggiatori europei e americani si ammalino di malaria dopo aver visitato le zone endemiche. Nonostante gli sforzi fatti negli ultimi anni per ridurre la trasmissione utilizzando zanzariere impregnate di insetticida, aumentando l'uso della disinfestazione delle case e migliorando il trattamento diagnostico e farmacologico, l'incidenza e la mortalità per malaria sono ancora troppo elevate (4). Questo perchè la frequenza della malattia dipende da un'ampia serie di fattori difficilmente controllabili nel loro complesso.

Scopo di questa rassegna è quello di mettere a fuoco le attuali conoscenze sulla patogenesi della malattia, discutere gli attuali aspetti di diagnostica di laboratorio e presentare le terapie tradizionali e innovative che si spera aiutino a debellare la malattia nei prossimi decenni. Questo alla luce del piano globale di azione, "Global Malaria Action Plan" (GMAP), presentato nel 2008 dal "Global Fund", che si propone tra le altre cose di annullare la mortalità per malaria nel mondo nel 2015 e di arrivare alla sua eradicazione nel 2050. La WHO, con una mozione nell'aprile 2011, ha nuovamente sollecitato i governi e le organizzazioni internazionali ad accelerare gli sforzi e stanziare i fondi necessari per il raggiungimento degli obiettivi del GMAP (5, 6).

CICLO DEI PLASMODI DELLA MALARIA UMANA

I plasmodi malarici in grado di parassitare l'uomo sono Protozoi della classe degli Sporozoi e appartengono a 4 specie: *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum), P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*, che si differenziano tra loro per aspetti morfologici, velocità di moltiplicazione nell'uomo e nella zanzara, numero di parassiti prodotti in ogni fase di replicazione e patogenicità per l'uomo. Recentemente si è aggiunta una quinta specie, *P. knowles*i, diffusa nelle foreste di Borneo e Malesia: si tratta di una zoonosi, il cui ospite principale è la scimmia *Macaca fascicularis* che causa infezioni nell'uomo di difficile diagnosi (7). La specie più pericolosa, che causa tutta la mortalità riportata sopra, è *P. falciparum.* Sono invece circa una cinquantina le specie di zanzara *Anopheles* capaci di fungere da vettori, con *A. gambiae* e *A. funestus* diffuse soprattutto

Corrispondenza a: Andrea Mosca, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Via Fratelli Cervi 93, 20090 Segrate, Milano. Tel/Fax 0299983892, E-mail: andrea.mosca@unimi.it

Ricevuto: 14.07.2011 Revisionato: 22.07.2011 Accettato: 22.08.2011

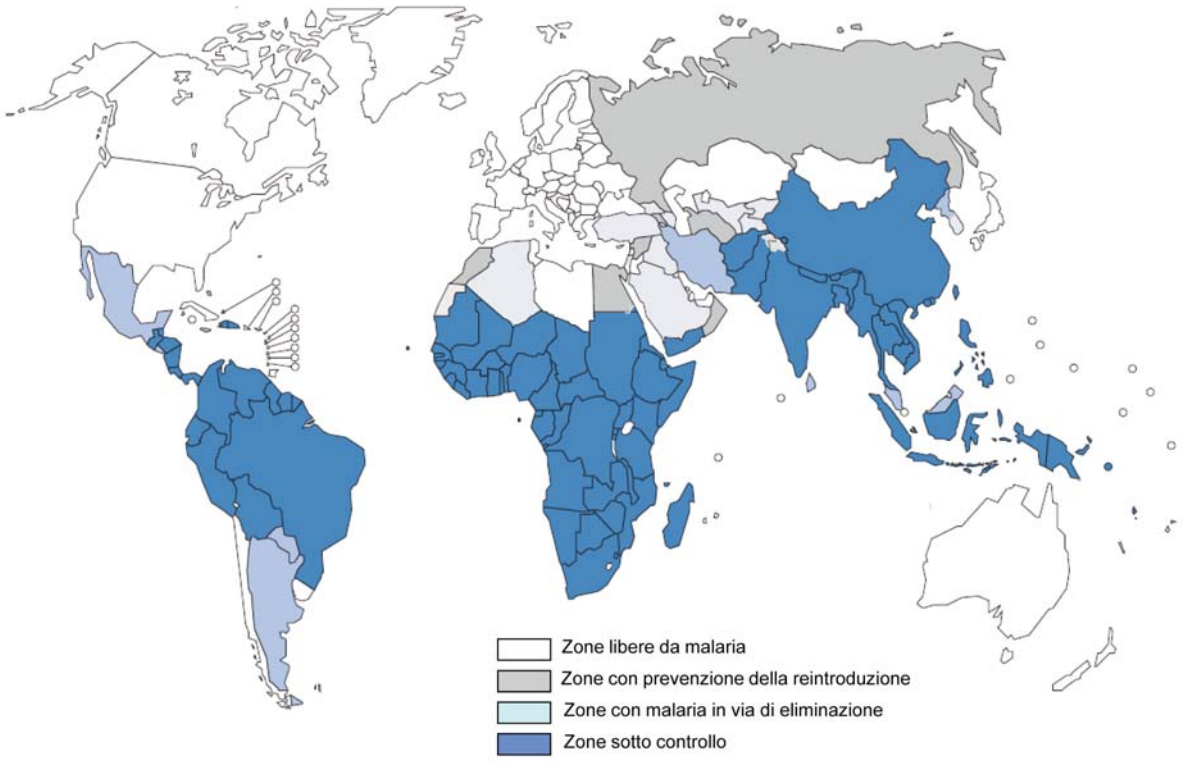


Figura 1
Distribuzione dei paesi dove la malaria è endemica, raggruppati in base alle diverse fasi previste dal progetto WHO di eliminazione della malaria (da rif. 1, modificato).

nell'Africa equatoriale e altre 5 specie presenti tra Asia e Sud America. Questa varietà di parassiti e di vettori sta alla base della grande variabilità della diffusione che la malaria ha avuto nelle diverse parti del mondo (8). Questa situazione, unita ad altre fonti di variabilità (temperatura, piovosità, caratteristiche genetiche e socio-economiche delle popolazioni), rende il controllo della malaria e le strategie di lotta antimalariche molto difficili nei paesi tropicali e subtropicali.

La Figura 2 mostra il ciclo del plasmodio nell'uomo e nella zanzara, che ha una fase sessuale e una asessuale (schizogonica). Quando una zanzara femmina punge l'uomo, inocula parassiti allo stadio di sporozoiti, lo stadio terminale di evoluzione del ciclo nella zanzara. Gli sporozoiti infettano in meno di un'ora gli epatociti per i quali hanno un elevato tropismo e si moltiplicano nel fegato instaurando un ciclo detto eso-eritrocitario, trasformandosi in trofozoiti e quindi in schizonti con numerosi nuclei. Il ciclo epatico prevede una sola fase di replicazione e dura tra 6 e 16 giorni a seconda delle specie. Dagli schizonti attraverso la segmentazione dei nuclei si originano i merozoiti: si generano da 10.000 a 30.000 merozoiti per schizonte, che poi passano a infettare i globuli rossi (GR), dove sono evidenziabili al microscopio ottico dopo poche ore dall'invasione per la loro caratteristica forma ad anello ("ring stage"). Verso la fine dello stadio anulare comincia a evidenziarsi il vacuolo digestivo del parassita all'interno del quale compaiono finissimi granuli di emozoina, il pigmento terminale derivato dal catabolismo dell'emoglobina. Il vacuolo digestivo e la quantità di pigmento aumentano col crescere del parassita, che in questa fase prende il nome di trofozoita. Dopo le successive divisioni nucleari, il vacuolo digestivo con l'emozoina si ritrova al centro dello schizonte con intorno i merozoiti, a forma di rosetta. La conseguente rottura dei GR libera i merozoiti nel sangue, con concomitante attacco febbrile, causato dal rilascio nel sangue di sostanze pirogene da parte dei globuli rossi infettati. Alcuni merozoiti infettano altri GR e il processo si ripete ciclicamente, mentre altri si trasformano in elementi sessuali (gametociti maschili e femminili), la cui evoluzione finale a gameti avviene nello stomaco della zanzara. A questo punto, se un'anofele pungendo un malarico succhia i gametociti, gli elementi maschili si dividono mitoticamente diverse volte e si trasformano rapidamente emettendo filamenti muniti di un lungo e sottile flagello che permette loro un'elevata mobilità (microgametocita flagellato). I gametociti femminili invece non hanno mobilità, sono più grandi (macrogametociti) e vengono penetrati dai microgametociti flagellati, con la conseguente produzione di uno zigote che presto cambia forma, diventando allungato e mobile (oocinete). L'oocinete

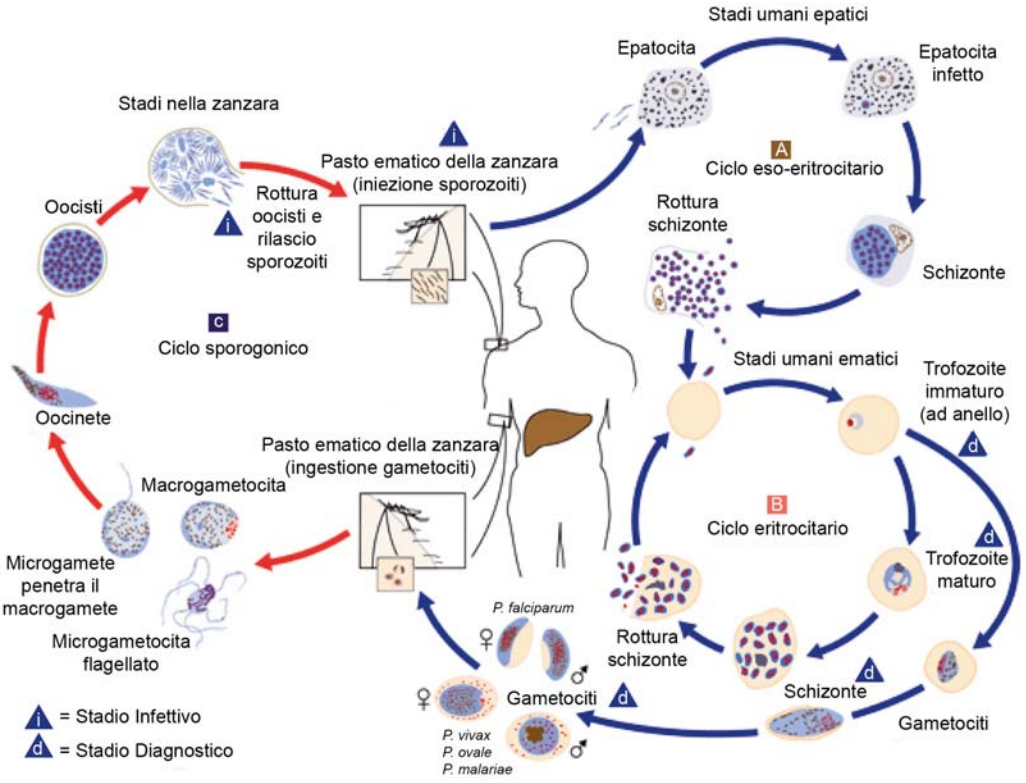


Figura 2
Ciclo del Plasmodium falciparum (da DPDx – CDC Parasithology Diagnostic Web Site, modificato. http://dpd.cdc.gov).

penetra nella parete dello stomaco della zanzara, si fissa sulla tunica esterna formando una oocisti, che si sviluppa e cresce di dimensioni, contenendo all'interno migliaia di sporozoiti. La rottura della oocisti libera nella cavità addominale della zanzara gli sporozoiti che migrano verso le ghiandole salivari all'interno delle quali penetrano e permangono in attesa che la zanzara punga un altro individuo, ripetendo quindi nuovamente il ciclo prima descritto. In totale, la fase di sviluppo all'interno della zanzara dura da una settimana a circa un mese, a seconda delle specie e dei fattori climatici.

Nel caso della malaria da *P. falciparum*, il ciclo eritrocitario inizia dopo circa una settimana dall'inizio del ciclo epatico e si compie ogni 48 ore, provocando accessi febbrili ricorrenti tipicamente ogni terzo giorno (malaria terzana maligna), similmente alla malaria provocata da *P. vivax* e *P. ovale*, dove però l'infezione è meno grave (malaria terzana benigna). Invece, nel caso della parassitosi da *P. malariae*, il ciclo eritrocitario inizia dopo circa 2 settimane di incubazione, ha un periodo di 72 ore e gli attacchi malarici sono ogni quarto giorno (malaria quartana). *P. knowlesi* ha un ciclo più breve, di appena 24 ore.

La malaria è facilmente recidivante, con recidive che si possono presentare a ritmo settimanale per due-tre settimane dopo il primo periodo di malattia e che possono ripetersi a brevi intervalli per diversi mesi. Si può anche ripresentare nell'anno successivo, generalmente dopo la stagione fredda, e non sono infrequenti i casi di superinfezioni (nuova infezione quando ancora sopravvive il parassita dell'infezione precedente) e reinfezioni (nuova infezione dopo che l'organismo si era liberato dal parassita). Tipicamente la malaria da *P. falciparum* tende a diventare recrudescente se non ben curata o perché il soggetto si infetta di nuovo; invece, la malaria da *P. vivax* recidiva perché rimangono delle forme dormienti nel fegato, dette ipnozoiti, che non si riscontrano in *P. falciparum*.

ASPETTI CLINICI

La sintomatologia clinica della malaria compare dopo la fase epatica, quando i parassiti completano il primo ciclo di riproduzione asessuata nei GR. Infatti, la fase epatica, che per *P. falciparum* può durare da 5 a 8 giorni, è di solito asintomatica. L'attacco malarico si presenta inizialmente con cicli di brividi, febbre e sudorazione profusa, ogni due o tre giorni a seconda della specie. In stadi avanzati la febbre può essere irregolare o continua. Nausea, vomito, diarrea e dolori addominali possono accompagnare gli stati febbrili. Una sintesi delle principali manifestazioni cliniche e di laboratorio associate ai diversi tipi di malaria è fornita nella Tabella 1.

Tabella 1
Aspetti clinici e di laboratorio tipici della malaria da Plasmodium falciparum

Tipologia di malaria	Sintomi	Altre manifestazioni/complicanze
Lieve/senza complicanze	Mal di testa, mialgia, tosse	Splenomegalia, ittero lieve
Severa	Prostrazione, incapacità di succhiare (lattanti)	Parassitemia >5% Schizonti nel circolo periferico e pigmento malarico intracitoplasmatico Lieve riduzione dei neutrofili, linfocitosi, monocitosi Trombocitopenia, antitrombina III e fibrinogeno leggermente diminuiti Alanina amminotransferasi aumentata
Cerebrale	Perdita di coscienza, coma	Crisi epilettiche Acidosi metabolica, ipoglicemia
Con anemia	Spossatezza	Anemia normocitica normocromica, iporeticolocitosi Presenza di emoglobina nel plasma ed emoglobinuria associate a elevata parassitemia o a volte scatenate dal trattamento con chinino per profilassi *("blakwater fever")*
Con dispnea acuta	Disidratazione	Acidosi metabolica Anemia Insufficienza renale (necrosi tubulare acuta) Edema polmonare
Con ipoglicemia	Sudorazione, ansia, tachicardia, pallore	
In gravidanza	(a volte senza febbre)	Ipoglicemia Edema polmonare Anemia Disfunzioni placentari Rallentamenti nella crescita fetale

Negli individui adulti che vivono in zone endemiche, con adeguata immunità innata o acquisita, l'infezione può anche essere asintomatica oppure, se si manifesta la sintomatologia, gli attacchi sono facilmente curabili e non causano complicanze gravi. Si parla in questo caso di malaria non complicata. Al contrario, negli individui non immuni (turisti, viaggiatori) e nei bambini in zone endemiche, o nelle donne in gravidanza, la malaria da *P. falciparum,* e talvolta anche da *P. vivax,* può presentarsi come malaria severa, spesso fatale. Si tratta in questi casi di anemia grave o di malaria cerebrale. L'anemia, non necessariamente proporzionale al numero di parassiti circolanti, è di tipo emolitico, normocromico e normocitico. La crisi anemica può essere molto grave, con abbassamento della concentrazione di emoglobina nel sangue fino a 50 g/L (9). La perdita di GR è dovuta sia alla loro lisi quando infettati, ma anche a una ridotta eritropoiesi midollare e un'accelerata senescenza dei GR non infettati che vengono eliminati nella milza. I GR eventualmente trasfusi sarebbero distrutti più rapidamente. La milza spesso si presenta tumefatta e iperemica e, essendo ospite di molti parassiti, può diventare tanto fragile da subire rotture.

Caratteristico della infezione da *P. falciparum* è il fenomeno della citoaderenza, per cui i GR infettati aderiscono alla vascolatura profonda di diversi organi (cervello, polmoni, reni, placenta, ecc.) mediante specifiche adesine. Questo provoca rallentamento del flusso sanguigno e anche occlusioni vasali, con ipossia tissutale e ischemia in diversi distretti. Le conseguenze del sequestramento dei GR infettati sono particolarmente gravi a livello cerebrale (malaria cerebrale) con perdita di coscienza, edema cerebrale, coma e spesso morte. Si può anche manifestare insufficienza renale, insufficienza respiratoria acuta (ARDS), con ipoglicemia e acidosi metabolica. La mortalità per malaria cerebrale può raggiungere il 20% nei bambini nell'Africa subsahariana sotto i 5 anni di età, anche se trattati farmacologicamente. E' fatale nella maggior parte dei casi non trattati (10).

Si noti che anche nelle forme di malaria severa la parassitemia non rappresenta un indice affidabile di gravità, perché si possono manifestare forme gravi anche in presenza di livelli bassissimi di parassiti nel sangue periferico, qualora essi siano sequestrati in altri organi e il loro ciclo replicativo sia altamente sincronizzato.

Infine, le forme di malaria da *P. falciparum* sono più gravi perché il plasmodio infetta i GR di tutte le età, raggiunge parassitemie più alte e, specialmente, presenta il fenomeno della citoaderenza a livello di diversi organi. *P. vivax* e *P. ovale* infettano prevalentemente i reticolociti, mentre *P. malariae* infetta i GR senescenti. In queste forme di malaria meno grave i parassiti non sembrano causare lesioni organo-specifiche e la mortalità è spesso dovuta a cedimento della milza o a sindrome nefrosica. Le diagnosi più accurate di specie, tuttavia, hanno rivelato un numero di casi di malaria grave da *P. vivax* più elevato di quanto si pensasse.

EPIDEMIOLOGIA E SELEZIONE NATURALE

La presenza di persone infette, il clima umido e caldo e la vicinanza di paludi o acque stagnanti sono le condizioni tipiche perché si sviluppino le zanzare *Anopheles* vettori dei plasmodi della malaria. Sono stati probabilmente i veneziani nel XVI secolo a coniare il termine, per indicare la aria cattiva ("mal aere") formata dalle paludi alla foce dei fiumi che si immettevano nella laguna veneta e che era accompagnata spesso da febbri (11). Importanti per la trasmissione della malaria sono senz'altro la temperatura e l'umidità. Infatti sotto i 16 °C le oocisti non si sviluppano e riprendono a crescere quando la temperatura risale, tipicamente nella stagione successiva. L'umidità è invece importante per l'attività delle zanzare, che non riescono a riprodursi nei climi secchi (umidità relativa <50%). La presenza di individui malarici è anche importante per la diffusione della malattia, perchè la trasmissione avviene se la zanzara succhia il sangue con un numero sufficiente di gametociti per infettarsi, e non tutti i malarici hanno in circolo un numero di gametociti sufficiente per infettare le zanzare. Il limite utile sarebbe pari a un gametocita per ogni 200 leucociti per il *P. falciparum* e di un gametocita per 1.000 leucociti per il *P. vivax*.

Gli altri fattori che possono essere determinanti nella diffusione della malaria sono la razza, le abitudini di vita, il tipo di coltura agricola, le condizioni economiche e i fattori immunitari. Questi ultimi sono sicuramente i determinanti maggiori, dato che le popolazioni delle zone malariche acquistano un certo grado di immunità che diventa più forte con il passare degli anni per via di continue reinfezioni, come del resto provato dal fatto che la malaria colpisce maggiormente i bambini rispetto agli adulti. Si tratta però di un'immunità "clinica", che persiste fintanto che gli individui rimangono in aree endemiche sempre esposti a nuovi contagi col parassita. L'immunità clinica non impedisce l'infezione, ma protegge dall'attacco febbrile e dalle complicanze fatali. Bastano sei mesi in zone non endemiche perché l'immunità a *P. falciparum* cessi, mentre nel caso del *P. vivax* sembrerebbe durare un pò di più. I flussi migratori di soggetti sani in zone malariche o di soggetti malarici in zone salubri sono altre fonti di epidemie. Tipicamente le guerre, con spostamenti in massa di soldati e lavoratori, sono sempre state cause importanti di esacerbazione e diffusione della malaria (12). In Italia la malaria è stata eradicata nel 1962 e i poco più di 700 casi riportati all'anno sono di persone che per vari motivi hanno visitato aree endemiche, specialmente immigrati (13). Singoli casi autoctoni sono stati descritti, ma sporadici e dovuti al contagio di zanzare autoctone con persone infette provenienti da paesi endemici. Non ci solo al momento le condizioni perché la trasmissione riprenda in modo stabile.

A parte queste classiche modalità di diffusione, sono stati segnalati casi di infezione a causa di trasfusioni e anche per lo scambio di siringhe infette tra tossicodipendenti (14), nonché casi di infezioni negli aeroporti, dove zanzare infette che provengono da paesi epidemici all'interno dei velivoli o dei bagagli possono infettare persone che transitano o lavorano negli aereoporti. Il primo caso si è avuto nel 1977 (15) e da allora sono stati registrati quasi un centinaio di casi nella sola Europa (16).

Il fatto che la malaria potesse influenzare l'estensione e la prevalenza delle emoglobinopatie in alcune aree del bacino Mediterraneo è un'ipotesi formulata a partire dagli anni '40 (17-19). Successivamente fu proposto che altri disordini genetici eritrocitari, quali le sindromi talassemiche, l'anemia a cellule falciformi e il difetto di glucosio 6-fosfato deidrogenasi potessero conferire parimenti una resistenza alle infezioni da parte del plasmodio (20-22), mentre la presenza di emoglobina C (HbC) avrebbe potuto prevenire le complicanze delle forme gravi (23). Di fatto, si è riscontrata una corrispondenza tra la distribuzione della malaria e della talassemia in diverse zone del bacino mediterraneo (20) e una simile sovrapposizione nei confronti dell'emoglobina S (HbS) in Africa (24, 25), recentemente suffragata da dati quantitativi (26). Questo ha portato a ipotizzare che allo stato eterozigote i difetti da emoglobinopatie e da talassemie potessero conferire un vantaggio selettivo nei portatori eterozigoti, per via di un polimorfismo bilanciato, che rispecchiava lo svantaggio dovuto alla letalità della mutazione e il vantaggio rispetto alla malaria (27). Si è poi riscontrato che è particolarmente difficile per il *P. falciparum* portare a termine il ciclo vitale nei GR che contengono HbS ed è anche parimenti raro riscontrare un portatore di HbS con malaria cerebrale (28). Un ruolo protettivo dell'HbS nei confronti della malaria è stato recentemente supportato da studi sia *in vivo* che *in vitro* (29), ma tale effetto è completamente abolito se oltre alla presenza di HbS vi è quella del tratto α-talassemico. Di fatto, la prevalenza dell'HbS nel bacino mediterraneo è relativamente bassa rispetto alle zone dell'Africa subsahariana, anche se si è ormai certi, dagli studi sugli aplotipi, che il gene β^S abbia raggiunto il Mediterraneo proveniendo dall'Africa (30, 31). Resta quindi difficile comprendere perché non si sia diffuso come nelle regioni africane. La spiegazione più accreditata è basata sul fatto che esistono interazioni epistatiche positive tra i geni globinici mutati nelle α- e β-talassemie, in modo tale che nei genotipi composti viene mantenuto un buon livello di protezione dalla malaria e tali popolazioni sono resistenti all'ingresso dell'allele β^S. Esisterebbero parimenti interazioni epistatiche negative tra i geni α+ talassemici ed i geni β^S, in basi alle quali verrebbe meno l'effetto di protezione da parte dell'invasione del plasmodio, contribuendo quindi a far sì che comunque l'allele β^S tenda a essere escluso dall'ambiente mediterraneo (32). Parimenti, popolazioni che abbiano sperimentato una diffusione antica dell'allele β^S sarebbero resistenti alla penetrazione da parte dell'allele β+ talassemico, come di fatto è stato dimostrato.

Altri studi epidemiologici, prima in Africa e quindi in Nuova Guinea, hanno dimostrato un'alta prevalenza del fenotipo "Duffy" negativo nelle popolazioni dove è

frequente la malaria da *P. vivax*. (33, 34). Si è scoperto infatti che l'antigene "Duffy" rappresenta il recettore attraverso il quale i merozoiti di *P. vivax* penetrano nei GR e quindi gli eritrociti che non posseggono questo antigene ("Duffy" negativi) sono protetti dall'infezione con *P vivax*. In Africa centrale e occidentale, una mutazione nel promotore del gene che elimina l'antigene "Duffy" dalla superficie dei GR, senza altre conseguenze cliniche, ha raggiunto (probabilmente in varie migliaia di anni) un'altissima frequenza e questo aiuta a spiegare come mai *P. vivax* non sia diffuso in queste zone.

Per quanto riguarda la protezione dalla malaria da parte di fattori immunitari, sembrerebbe che un ruolo importante lo posseggano alcune citochine proinfiammatorie, quali "tumor necrosis factor" (TNF)-α e interferone (IFN)-γ, oltre che all'ossido nitrico (NO), eventualmente stimolate da una tossina malarica (35). Senza dubbio esistono meccanisimi di stimolazione della risposta immunitaria innata e specifica, come provato dal fatto che i Fulani, un gruppo etnico del Burkina Faso, posseggono titoli elevati di anticorpi diretti contro diversi antigeni malarici e sviluppano meno casi di malaria rispetto ad altri due gruppi etnici dello stesso villaggio, i cui abitanti sono punti dallo stesso numero di zanzare infette da *P. falciparum* (36).

PATOGENESI

La crescita del plasmodio provoca grandi cambiamenti nel GR ospite, che sono stati studiati da molti anni e sono causa delle manifestazioni patogenetiche più evidenti, quali il sequestramento dei GR infettati nella vascolatura profonda. Sulla membrana eritrocitaria compaiono delle protuberanze dette "knobs", costituite da proteine specifiche del parassita (HRP-"histidin rich protein") e del GR che mediano l'adesione dei GR parassitati all'endotelio vasale e anche tra di loro con formazione delle cosiddette "rosette" (37). Il fenomeno dell'adesione e occlusione dei capillari insieme all'elevata produzione di fattori infiammatori, quali NO e TNF, è responsabile dei danni tissutali, ipossia e acidosi metabolica che caratterizzano la malaria cerebrale e causano convulsioni, coma e morte (38).

Si assiste anche ad una aggregazione dei dimeri di banda 3, la principale proteina di membrana dei GR che permette lo scambio degli anioni cloruro/bicarbonato, seguita da una opsonizzazione da parte di una classe di IgG di origine endogena (39, 40). Tale riconoscimento da parte di queste immunoglobuline endogene porta al successivo legame con la frazione C3c del complemento (41, 42), seguita da fagocitosi da parte dei macrofagi (42, 43). Successivamente, si è compreso che la serie di fenomeni appena descritti poteva essere fortemente inibita *in vitro* mediante trattamento con β-mercaptoetanolo, un composto dotato di potente azione riducente, indicando così che il processo di rimozione dei GR infettati sia molto simile al processo fisiologico di rimozione dal circolo dei GR senescenti (44).

Per quanto riguarda invece i fenomeni correlati al riconoscimento dei GR da parte del plasmodio, si è visto che il parassita malarico sfrutta una serie di interazioni ligando-recettore, chiamate nel loro insieme col nome di via metabolica di invasione ("invasion pathway") per arrivare a invadere l'eritrocita ospite (45). In particolare, sembra che alcuni ceppi di *P. falciparum* usino preferenzialmente ligandi che riconoscono i GR in base al loro grado di sialilazione, come dimostrato dal fatto che il trattamento dei GR con neuraminidasi compromette l'invasione (46, 47). Altri ceppi invece usano ligandi che riconoscono il recettore indipendentemente dalla presenza di acido sialico oppure i parassiti hanno la capacità di cambiare il loro modo di riconoscimento da acido sialico dipendente a non dipendente (48, 49). Sembrerebbe, in particolare che lo "switch" nel meccanismo di invasione dipenda dall'attivazione differenziale sulla superficie del plasmodio di una proteina omologa a una proteina dei reticolociti denominata *P. falciparum* "reticulocyte-binding like homolog 4" (PfRh4) (50).

Una sorprendente prova dell'infezione dei GR è stata ottenuta con tecniche avanzate di microscopia a fluorescenza ("near-field"), con la quale gli Autori sono riusciti a visualizzare la co-localizzazione delle proteine della membrana del parassita con quelle della banda 4.1 del GR ospite (51). Le rugosità che ne derivano sulla membrana sono verosimilmente correlate a un aumento di citoaderenza che, unita ad alterazioni della permeabilità dei vasi cerebrali a causa di un'alterata produzione di sostanze vasoattive (NO, TNF), può essere causa di congestione cerebrale e, in fasi avanzate, di emorragie intraparenchimali. Inoltre, nella malaria cerebrale, i GR parassitati possono essere sequestrati nel microcircolo cerebrale, diventare più rigidi, aderire ai GR sani formando ammassi a forma di rosette e agli endoteli dei capillari e delle venule cerebrali, ostruendone il lume.

Per quanto riguarda l'anemia che si può instaurare nei casi gravi di malaria, i meccanismi patogenetici comprendono sia l'aumentata rimozione dei GR parassitati e non, unita a un'inibizione dell'eritropoiesi. Quest'ultima è caratterizzata da una diminuzione dei reticolociti circolanti (52), da una produzione normale o anche aumentata di eritropoietina (53) e da un'alterata morfologia dei precursori eritroidi (54). Lo sviluppo eritroide avviene nel midollo osseo in quelle che sono chiamate "isole eritroblastiche", al centro delle quali si trova un macrofago circondato da una ventina di eritroblasti, ai quali fornirebbe ferro, citochine, chemochine e fattori di crescita (55). Lo studio del midollo osseo di soggetti deceduti per malaria con grave anemia ha mostrato che i macrofagi delle isole sono carichi di emozoina, il pigmento malarico che deriva dalla cristallizzazione delle molecole di eme emoglobinico (β-ematina) insieme a una notevole quantità di acidi grassi polinsaturi (56). Questi, una volta ossidati e trasformati in prodotti terminali di degradazione, quali il 4-idrossinonenale (HNE), possono svolgere un ruolo inibitorio (57). Recentemente è stato dimostrato che i monociti carichi di emozoina

inibiscono la crescita delle cellule eritroidi circostanti e producono HNE che, diffondendo nelle cellule adiacenti, genera addotti proteici in grado di interagire col ciclo cellulare senza causare l'apoptosi, in particolare modificando le proteine p53 e p21 (58). Inoltre, emozoina e HNE sono in grado di inibire l'espressione di alcune altre proteine chiave della normale eritropoiesi, quali i recettori della transferrina, dell'interleuchina-3 e dell'eritropoietina.

DIAGNOSI

In Italia la diagnosi di malaria è regolamentata dalla circolare del Ministero della Sanità n.14, 11 novembre 1997, che qualifica l'emoscopia come l'unico mezzo idoneo a diagnosticare la malattia (59). Accanto ad essa, però, esistono ulteriori presidi in grado di rafforzare la diagnosi.

Emoscopia

La microscopia ottica (MO) è attualmente considerata il "gold standard" per la diagnosi di malaria (60). Sensibilità e specificità sono eccellenti: da 10 parassiti/µL con la preparazione a goccia spessa (che equivarrebbe a una parassitemia dello 0,0001%) a ~500 parassiti/µL (equivalenti a una parassitemia di circa 0,02%) nello striscio sottile. Lo striscio sottile permette anche una corretta identificazione della specie coinvolta (specificità), tranne nel caso di un'infezione sostenuta da *P. knowlesi*, una malaria di origine zoonotica prevalente nel Sud Est Asiatico, della quale si è accennato all'inizio.

Con prelievi seriati si può monitorare la terapia e la metodica è veloce e di facile esecuzione. L'emoscopia è utile nel monitoraggio della terapia, controllando la parassitemia ogni 6-12 ore fino alla "clearance" completa della stessa. In caso di forte sospetto clinico è consigliabile ripetere il prelievo a distanza di alcune ore, meglio se in puntata febbrile (61). Come estrema *ratio* può essere utile l'esame del midollo, ma il perfezionamento della diagnostica molecolare potrebbe a breve rendere non necessario utilizzare tale tipo di esame invasivo.

E' importante effettuare sia lo striscio sottile che la goccia spessa ed entrambi devono essere preparati a partire da puntura capillare. Tale sede di prelievo è più sensibile rispetto al prelievo venoso periferico a causa del problema del sequestro delle emazie parassitate dal *P. falciparum*. La maggior parte degli Autori preferisce la puntura da capillare periferico e la nostra personale esperienza concorda con essi.

I due tipi di preparati devono essere approntati ed esaminati contemporaneamente per fornire una risposta corretta. La goccia spessa è almeno 10 volte più sensibile dello striscio sottile; quest'ultimo è però più specifico e permette la diagnosi di specie grazie alla morfologia meglio conservata del plasmodio. Questo concetto è valido solo per i primi quattro tipi di plasmodi, quelli spiccatamente interumani; il quinto tipo, *P. knowlesi*, non possiede invece una morfologia caratteristica tale da poter essere identificato con certezza mediante esame dello striscio sottile (62).

Il prelievo deve essere eseguito durante la fase febbrile, anche se la febbre non è elevata. Il prelievo capillare è la prima scelta; come seconda scelta è accettabile l'utilizzo di sangue intero proveniente da prelievo venoso raccolto in provetta contenente EDTA, purchè venga strisciato entro 4 ore, per evitare alterazioni morfologiche dei plasmodi eventualmente presenti.

Per gli strisci devono essere utilizzati vetrini molati e ben sgrassati. Strisciare sul vetrino non più di 5 µL di sangue intero in modo da ottenere un monostrato uniforme (per la goccia spessa utilizzare la stessa quantità di materiale). Lo striscio sottile va fissato con metanolo assoluto per 1 min (un tempo di fissazione superiore altera la visione di eventuali granulazioni eritrocitarie presenti). La goccia spessa non deve essere fissata ma colorata direttamente per permettere la lisi dei GR e meglio evidenziare i parassiti. Utilizzare una colorazione di Romanowsky o le colorazioni di Giemsa e May Grunwald Giemsa. I migliori risultati si ottengono utlilizzando la soluzione di Giemsa diluita 1:10 per la colorazione dello striscio sottile e 1:30 per la goccia spessa. Per ogni paziente devono essere preparati, colorati ed esaminati più vetrini (almeno quattro), valutando almeno 500 campi microscpici per ogni preparato.

Interpretazione dello striscio sottile e della goccia spessa

La morfologia delle forme vegetative ai vari stadi di sviluppo permette di utilizzare lo striscio sottile per la diagnosi di specie (tranne nella parassitemia sostenuta da *P. knowlesi*) e per la quantificazione della parassitemia, da fornire sempre in caso di infezione sostenuta da *P. falciparum*. La diagnosi di specie per *P. knowlesi* è al momento attuale possibile solo mediante biologia molecolare.

La quantificazione della parassitemia si ricava dallo striscio sottile contando il numero di GR parassitati (si intende esattamente il numero di GR e non il numero di plasmodi presenti nel GR; per esempio, un GR poliparassitato con tre trofozoiti vale ai fini della conta 1 e non 3). Con la goccia spessa la diagnosi di specie è molto difficile perché il trattamento altera la morfologia dei parassiti presenti; essendo lisati tutti i GR, sono osservabili nel campo microscopico solo i nuclei dei globuli bianchi e i plasmodi (se presenti). E' quindi possibile evincere la parassitemia, dopo aver contato i parassiti riscontrati su un numero di campi pari ad un conteggio totale di almeno 200 globuli bianchi, applicando la seguente formula:

$$\text{N. di parassiti/µL} = (WBC_{tot} \times \text{parassiti contati})/WBC_{conta}$$

nella quale WBC_{tot} è il valore dei globuli bianchi ricavato dall'esame emocromocitometrico del paziente, e WBC_{conta} è il numero di globuli bianchi conteggiati. A titolo di esempio, supponendo di aver contato 30

parassiti su un totale di 200 globuli bianchi, con un numero di globuli bianchi pari a 5,6x10^3/µL, la parassitemia risulterà essere pari a 840 parassiti/µL (5600x30/200).

Tipicamente si conteggiano i parassiti presenti in un numero di campi corrispondenti appunto a 200 globuli bianchi, ma maggiore è il numero di leucociti contati e più accurata risulterà la conta della parassitemia. Se la parassitemia è molto bassa (<200 parassiti/µL), si rende necessario contare i parassiti presenti in un totale di almeno 500 globuli bianchi.

La parassitemia individuata attraverso l'osservazione della goccia spessa è espressa come N. di parassiti/µL di sangue, mentre la parassitemia ricavata da striscio sottile è espressa in percentuale (% dei GR parassitati), contando almeno 1.000 GR. Nella Tabella 2 si riporta l'equivalenza tra i due modi di quantificazione.

Limiti e problematiche dell'esame emoscopico

Uno studio di Kain et al. ha riportato, a riprova della delicatezza di questo esame, un 59% di falsi negativi al momento della diagnosi di ammissione e un errore nella classificazione delle specie di plasmodio coinvolte nel 67% dei casi (63). Perché la valutazione emoscopica continui a essere considerata il "gold standard" è necessario quindi che venga sempre effettuata da un operatore esperto, che si considerino le variabili preanalitiche e si attui esaminando due diversi tipi di preparati, la goccia spessa e lo striscio sottile.

I principali punti delicati possono essere così raggruppati:

- disponibilità di un tempo significativo per la valutazione da parte di un operatore altamente qualificato (un operatore esperto in MO necessita di un lungo addestramento e un'altrettanto lunga esperienza nel settore),
- variabilità preanalitica dovuta alle modalità di raccolta del campione esaminato e della colorazione utilizzata,
- la prestazione di un laboratorio biomedico non specializzato nella diagnostica di malattie tropicali difficilmente raggiunge le sensibilità riportate in letteratura (64); un operatore medio può sensibilmente sbagliare la quantificazione dei parassiti anche in corso di parassitemie di media entità (dai 5.000 ai 10.000 parassiti per µL, equivalenti a una parassitemia di ~0,1%-0,2%) (65),
- sequestro nel circolo capillare profondo: una parassitemia sostenuta da *P. falciparum* può non essere visibile a livello periferico perché le emazie parassitate possono essere tutte sequestrate a livello del circolo capillare profondo (66).

La sensibilità riportata in letteratura per la goccia spessa varia da 10 a 50 plasmodi/µL, mentre per lo striscio sottile è di circa 500/µL. In realtà queste prestazioni sono attribuibili soltanto a operatori molto esperti (64). Lavori di diversi Autori hanno riportato sensibilità molto superiori a questi valori in laboratori non specialistici. E' fortemente raccomandata la partecipazione regolare a programmi di VEQ, valutando a scopo diagnostico numerose emoscopie (ad es., UK-NEQAS).

Tabella 2
Equivalenza tra conta del numero di parassiti con la goccia spessa e percentuale di parassitemia (espressa come percentuale di globuli rossi infettati sul totale dei globuli rossi)

N. parassiti/µL	% parassitemia
5-10	0,0002
100	0,002
10.000	0,2
2.500-30.000	0,05-0,7
100.000-250.000	2,5
500.000	10

Tecniche diagnostiche non emoscopiche

La consapevolezza che la sensibilità e la specificità dell'emoscopia sia osservatore dipendente ha incoraggiato a studiare metodi alternativi e/o integrativi. Questi metodi includono microscopia a fluorescenza, citometria, algoritmi su contaglobuli, colorazione con arancio di acridina, sierologia specifica, approcci di biologia molecolare e metodi diagnostici rapidI.

Esami diagnostici rapidi (RDT)

La novità più importante in questo campo è stata l'introduzione degli RDT, basati su principi immunocromatografici in grado di rilevare la presenza di antigeni specifici circolanti (67). Tali esami si eseguono su sangue intero (capillare o da vena periferica raccolto in provetta con EDTA) e impiegano la tecnologia immunocromatografica a flusso laterale, ampiamente usata per moltissime altre tipologie di esame, come ad esempio i test di gravidanza (68). La WHO pubblica una lista "online" di produttori di RDT (69). Per far parte di questa lista i produttori devono certificare una buona pratica di produzione secondo le norme ISO:13485:2003 o 21CFR 820 della "Food and Drug Administration" (FDA) statunitense e i loro prodotti devono rispondere alle prestazioni richieste dalla WHO. In Italia sono disponibili i test Core Lab Malaria Rapid Test (distribuito da FGM), Binax Malaria Now (distribuito da Alere Italia) e Dyamed Optimal (distribuito da Bio-Rad Laboratories). Utilizzano anticorpi monoclonali per evidenziare antigeni specifici per *P. falciparum* ["histidin rich protein 2" (HRP-2)], *P. vivax* [lattato deidrogenasi (LDH) specifica] o comuni a *P. falciparum, P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* (LDH panmalarico e aldolasi panmalarica). Dei tre citati, solo il test prodotto da Binax è stato certificato dalla FDA. La sua sensibilità nei confronti di *P. falciparum* è 99% con una parassitemia di ~1000 parassiti/µL (0,02%), ma scende a 89% con parassitemia tra i 100 e i 500 parassiti/µL (0,002%-0,01%). Utilizzando sangue intero da puntura capillare la sensibilità aumenta (70). La specificità è ~85% per *P. vivax*, ma per le altre specie non esistono dati. I test che utilizzano l'antigene LDH di

P. falciparum sono meno sensibili rispetto a quelli che utilizzano l'antigene HRP-2. Questa differenza non si evidenzia nella sensibilità a *P. vivax* (71).

Riteniamo opportuno ricordare che gli RDT sono standardizzati: ogni test venduto ha la medesima prestazione di un altro proveniente dallo stesso lotto; sono di facile esecuzione (pochi minuti di addestramento sono sufficienti per eseguire correttamente il test); sono rapidi (entro 30 min è possibile fornire una risposta affidabile); sono facilmente interpretabili ed infine l'effetto sequestro non affligge la quantita' di antigene circolante, come nel caso di gravida affetta da malaria (66). Inoltre, le migliori prestazioni degli RDT sono nei confronti della parassitemia da *P. falciparum*, l'agente della malaria maligna, proprio quello verso cui sarebbe importante una risposta rapida. Uno studio inglese ha evidenziato che l'introduzione di RDT nella pratica clinica ha migliorato le prestazioni diagnostiche dei laboratori periferici, proprio quelli più esposti a problemi (72). Gli RDT non sono tuttavia da considerarsi come un sostituto dell'emoscopia, ma un validissimo supporto ad essa.

Il contributo maggiore degli RDT riguarda la diagnosi e non il monitoraggio della terapia, almeno per quanto riguarda i test che utilizzano l'antigene HRP-2 per la diagnosi della parassitemia da *P. falciparum*. L'antigene HRP-2 infatti persiste nel sangue per molto tempo dopo la “clearance” della parassitemia, soprattutto nei casi di malaria grave, dove è maggiormente utile un accurato monitoraggio. L'utilizzo del LDH specifico per *P. falciparum*, invece, sembra offrire maggiori opportunità: è stata evidenziata una relazione tra la negatività del RDT con LDH specifico e “clearance” della parassitemia da *P. falciparum*. Fino ad ora, però, l'unico metodo attendibile per il monitoraggio durante l'infezione rimane l'emoscopia.

Criticità degli RDT

Se la persistenza dell'antigene HRP-2 concomitante a una emoscopia negativa alla fine della terapia non indica una parassitemia persistente, ben diverso è il caso di una discordanza tra un RDT positivo per HRP-2 a fronte di un’emoscopia negativa al momento della diagnosi. Il dato deve essere valutato con estrema attenzione. Innanzitutto, rimarchiamo che la sensibilità degli RDT è costante, ma non quella dell'operatore. Un esempio tipico è rappresentato dal caso di una donna gravida positiva al RDT (magari con una banda per HRP-2 molto evidente) e un’emoscopia negativa o indicante una bassissima parassitemia. Un risultato simile può indicare una placenta pesantemente parassitata, nei cui vasi è sequestrata la quasi totalità della carica parassitemica circolante. In letteratura è anche stato descritto un caso di una malaria grave in una talassemica in cui RDT è risultato positivo immediatamente al primo accertamento diagnostico e l'emoscopia si è positivizzata solo successivamente (73).

Con l'uso degli RDT esiste sia il problema dei falsi positivi che quello dei falsi negativi. Il capostipite di questi esami, il Para Sight Fdi Becton Dickinson, era molto sensibile all'interferenza da fattore reumatoide (74). I prodotti successivi, con l'utilizzo di anticorpi monoclonali per epitopi più specifici, hanno ridotto il problema. Per quanto riguarda gli RDT che utilizzano anticorpi monoclonali contro HRP-2 è stata documentata la differente antigenicità tra i diversi ceppi di *P. falciparum* (75). L'enzima aldolasi presenta invece una migliore uniformità genetica, che però si ripercuote nell’impossibilità di utilizzare questo enzima per la diagnosi diretta di specie (76). La persistenza di antigenemia in assenza di trofozoiti può essere dovuta, in un paziente asintomatico, a una parassitemia submicroscopica o a persistenza di gametociti nel torrente periferico (77). In alcuni casi è stato possibile eseguire una diagnosi retrograda di malaria nell'accertamento delle cause di morte con un RDT (78).

Esame emocromocitometrico per la rilevazione dell'emozoina

Negli anni ‘90 il pigmento malarico ha risvegliato l'interesse scientifico di alcuni gruppi di ricercatori. In campo terapeutico è stato indagato come possibile “target” farmacologico, in immunologia come adiuvante vaccinale (79) e anche nel campo diagnostico si sono rivelate notevoli potenzialità. Le sue proprietà possono essere evidenziate dai contaglobuli di ultima generazione, permettendo così la progettazione di algoritmi diagnostici per la creazione di un'allarme malaria. I primi dati pubblicati in letteratura sono stati ottenuti utilizzando contaglobuli Cell Dyn Abbott, seguiti da quelli di analizzatori Coulter e infine dagli analizzatori Sysmex XE 2100. Tutti questi sistemi sfruttano le capacità di polarizzazione della luce da parte del pigmento malarico e le proprietà del GR parassitato (80). Per gli analizzatori Abbott Cell Dyn, un algoritmo diagnostico che utilizza la variabilità del rapporto lobularità/granularità e altre anomalie evidenziate sul canale reticolociti ha mostrato sensibilità del 49% e specificità del 97%. Gli analizzatori Coulter Gen S e LH750 hanno creato un “malaria factor” che utilizza la DS dell'impedenza nel canale dei monociti e dei linfociti. Il “malaria factor” ha mostrato nei due sistemi, rispettivamente, una sensibilità del 82% e del 72%, e una specificità del 98% e del 94%. Gli analizzatori Sysmex XE 2100 utilizzano un algoritmo su analisi statistica multivariata che ha mostrato una sensibilità del 86% e una specificità del 97%. Tutti questi dati sono stati ottenuti su popolazioni viventi in area endemica e con personale addestrato all'uso e all’interpretazione di questi algoritmi. La nostra personale esperienza presso la Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico di Milano su 3 casi di malaria acuta, di cui uno grave, utilizzando contaglobuli Sysmex XE 2100, è stata negativa.

Esami di biologia molecolare

Il genoma dei plasmodi patogeni per l'uomo è stato completamente sequenziato e disponibile su banca dati in rete (81). Questo ha permesso l'evoluzione esponenziale della diagnostica molecolare e lo sviluppo di prodotti commerciali rapidi e sensibili. E’ riportato che

la “polymerase chain reaction real time” ha una sensibilità attorno a 0,002 parassiti/µL (82). La biologia molecolare rappresenta inoltre l'unico strumento diagnostico per parassitemia da *P. knowlesi*.

La facilità di esecuzione di questi metodi diagnostici e la rapidità di risposta ha permesso di inserire queste metodiche nei protocolli diagnostici ospedalieri. In Italia alcune strutture hanno già adottato dei protocolli diagnostici in urgenza che comprendono la conferma dell'emoscopia in biologia molecolare (83).

Attualmente, la diagnostica molecolare è principalmente utile come esame di conferma o come mezzo diagnostico addizionale in casi mirati. Il suo impiego su larga scala migliorerà certamente la specificità della diagnosi di specie e il riconoscimento delle parassitemie miste. Potrebbero tuttavia emergere nuove problematiche su come comportarsi con un referto di biologia molecolare positivo e un’emoscopia negativa, oppure se si deve trattare il paziente anche se è stato evidenziato solo il DNA del parassita. È dimostrata l'esistenza di soggetti asintomatici con parassitemia per *P. falciparum* rilevabile solo con metodi molecolari (84). Questa subparassitemia, non rilevabile con i mezzi diagnostici tradizionali, è responsabile della subimmunità di questi soggetti, poiché l'immunità alla malaria non è permanente, ma deve continuamente essere stimolata. Se uno di loro, in Italia per svariati motivi, si presentasse in un Pronto Soccorso con febbre, come dovremmo interpretare un referto di biologia molecolare positivo e un’emoscopia negativa? Non si sarebbe certi che la malaria sia la causa della febbre e se sia utile trattarlo farmacologicamente per eliminare il parassita, visto che potrebbe tornare presto in area endemica.

Malaria a trasmissione trasfusionale e trapianti

Sono state valutate diverse tecniche diagnostiche per lo screening dei donatori a rischio di malaria per le unità di sangue a rischio. Per le unità di sangue, emoscopia e RDT non sono sufficientemente sensibili per scongiurare il pericolo di malaria trasmessa da trasfusione (MTT) (85). A questo scopo la tecnologia più promettente è l'uso di metodi immunoenzimatici (EIA) specifici per la ricerca di anticorpi anti-*Plasmodium*. A fronte di questo problema i servizi di medicina trasfusionale di Regno Unito e Francia hanno adottato due kit EIA (per il Regno Unito il kit diagnostico prodotto da NewMarket Laboratories e distribuito in Italia da Bio-Rad Laboratories, mentre per la Francia il kit prodotto da Diamed è distribuito in Italia sempre da Bio-Rad), che utilizzano antigeni ricombinanti in fase solida specifici per *P. falciparum* e *P. vivax* e che cross-reagiscono con *P. ovale* e *P. malariae* (86-88). In Italia l'idoneità del donatore e la sicurezza degli emoderivati è regolata da un apposito decreto che non contempla l'uso della sierologia specifica nel donatore a rischio (89). Dai dati disponibili in letteratura soltanto un centro trasfusionale italiano si è adeguato alle linee guida europee (90). Le tecniche di biologia molecolare non sono ancora suficientemente sensibili per scongiurare il pericolo di MTT. Infatti, le metodiche più sensibili hanno una sensibilità di 0,002 parassiti/µL, mentre per garantire la sicurezza dell'unità di sangue dovrebbero essere 50 volte più sensibili (0,00004 parassiti/µL) (91). Sebbene per l'idoneità del donatore d'organo non esistano attualmente raccomandazioni codificate, l'esperienza italiana fa propendere per la ricerca anticorpale specifica.

TERAPIE TRADIZIONALI E INNOVATIVE

Cenni storici

Il primo medicamento efficace per il trattamento della malaria fu ricavato dalla corteccia di una pianta chiamata da Linneo, *Chincona officinalis*, usata in Perù nella medicina tradizionale e importata in Europa dai gesuiti intorno al 1632. Solo nel 1817 due chimici francesi, Pellitier e Caventou, riuscirono ad estrarre dalla corteccia il principio attivo antimalarico, un alcaloide chiamato chinino, dal nome quechua della pianta in dialetto Inca. Questo composto, sintetizzato soltanto nel 1929, è stato utilizzato per secoli come unico farmaco antimalarico ed è tuttora in uso per la malaria cerebrale, nonostante i suoi pesanti effetti collaterali. Il chinino ha contribuito in maniera importante all’eradicazione della malaria in Italia, soprattutto dopo che fu distribuito gratuitamente dallo Stato Italiano con una legge del 1895. Con la prima guerra mondiale, nel 1915 si manifestò l’esigenza di sintetizzare nuovi farmaci antimalarici poiché il blocco dei porti e gli attacchi sottomarini ostacolarono l’approvvigionamento di chinino. Vennero ripresi gli studi di Paul Erlich del 1891 sull’attività antimalarica del blu di metilene e sulla base di quella struttura chimica vennero sintetizzatele 8 nuove aminochinoline, tra cui pamachina e poi primachina e mepacrina. Durante la seconda guerra mondiale a protezione delle truppe americane impegnate nel Pacifico vennero sintetizzate clorochina, amodiachina, proguanil e pirimetamina. La clorochina in particolare, per l’efficacia e il basso costo, ha avuto un impiego generalizzato per moltissimi anni, finchè intorno al 1970 sono cominciati ad emergere nel Sud-Est Asiatico ceppi di parassiti chemioresistenti, che si sono poi diffusi ovunque. Per ovviare a questo problema, si cominciarono a usare associazioni di diversi principi attivi, quali sulfadossina-pirimetamina (S/P) o chinino-tetraciclina, ma nemmeno queste diedero i risultati sperati se non per un breve periodo di tempo.

Con la guerra del Vietnam, l’esigenza di proteggere le truppe statunitensi dalle febbri malariche portò i ricercatori del “Walter Reed Institute for Medical Research” a sviluppare nuovi composti modificando la struttura del chinino: tra questi la meflochina mostrò l’attività migliore anche contro i ceppi clorochino-resistenti e fu impiegata per la prima volta in Tailandia nel 1973-75. Contemporaneamente, il Vietnam del Nord alla ricerca di nuovi antimalarici chiese aiuto alla Cina che organizzò un progetto multicentrico (Progetto 523) per studiare i prodotti della medicina tradizionale cinese usati come antimalarici. Dallo studio sul “qinghaosu”, un estratto della pianta *Artemisia annua*, usato in infuso per il trattamento delle febbri, nel 1976 venne identificato il principio attivo, l’artemisinina, composto chimicamente

diverso da tutti gli antimalarici in uso, molto efficace e sicuro. Sulla base di questa nuova struttura chimica vennero elaborate nuove molecole, quali artesunato, artemetere e arteetere, che sono attualmente la base della terapia combinata antimalarica.

Trattamento della malaria

Pochi sono i farmaci antimalarici a disposizione, sia per il trattamento per via orale della malaria non complicata, sia per quello parenterale delle forme gravi. I composti messi in commercio più recentemente sono i derivati di artemisinina, mentre gli antimalarici classici comprendono gli aril-amino alcoli (chinino, meflochina, lumefantrina), la famiglia delle aminochinoline (clorochina, amodiachina) e i sulfamidici (S/P). A questi si aggiunge l'atovaquone, usato in combinazione con proguanil sotto il nome di Malarone®, e alcuni antibiotici (doxiciclina) (92).

L'artemisinina è il principio attivo estratto dalla pianta *Artemisia annua* o "qinghaosu" (assenzio dolce). E' uno schizonticida ematico molto potente e rapido, la cui struttura chimica è diversa da qualsiasi altro farmaco antimalarico noto. Si tratta di un lattone sesquiterpenico, con un anello 1,2,4-triossano tetraciclico, che ingloba un legame perossidico, cruciale per l'attività antimalarica. E' un composto poco solubile sia in solventi idrofili che lipofili; perciò sono stati preparati molti derivati chimicamente modificati in posizione C10 con migliore stabilità e solubilità; tra i derivati di prima generazione i più noti sono diidroartemisinina, artemetere, arteetere, artesunato e artemisone (93). L'attività farmacologica dei derivati di artemisinina è diretta specialmente contro le forme asessuate intraeritrocitarie di tutte le specie di Plasmodio che infettano l'uomo. In particolare, sono gli unici schizonticidi che uccidono le forme giovani, i cosidetti "anelli" e anche i primi stadi di sviluppo dei gametociti. I derivati di artemisinina agiscono molto rapidamente contro il plasmodio rispetto a qualsiasi altro antimalarico conosciuto e questo spiega il grande successo terapeutico del trattamento con artesunato endovena nel risolvere i casi di malaria severa. Hanno tuttavia una emivita molto rapida ed è per questo che la monoterapia con questi farmaci è sconsigliata in quanto presenta rischi di recrudescenza, cioè che l'infezione non sia ben curata e si abbia una ricaduta dopo 3-4 settimane. Altri problemi associati alle artemisinine sono la costosa estrazione/purificazione, la bassa solubilità e stabilità, la neurotossicità, in particolare ototossicità, e l'effetto embriotossico, riscontrati *in vitro* e nei modelli animali, ma non nell'uomo (94, 95).

I derivati di artemisinina, come diidroartemisinina, artemetere e artesunato sono ampiamente utilizzati nei vari trattamenti combinati descritti nei paragrafi successivi. Il meccanismo di azione di questa classe di farmaci è ancora controverso, ma sembra coinvolgere la generazione di radicali e di un eccesso di stress ossidativo nel parassita (96, 97).

E' dal 2006 che la WHO pubblica linee guida per il trattamento della malaria destinate ai governi e alle autorità sanitarie dei diversi paesi, in modo che vengano adottate a livello locale le misure preventive e terapeutiche più adatte alle specie di parassiti presenti localmente e al tipo e grado di resistenza ai farmaci dimostrata. La seconda edizione di queste linee guida è stata pubblicata nel 2010 e contiene indicazioni per la terapia e profilassi della malaria grave e della malaria non complicata da *P. falciparum* e per casi di malaria da *P. vivax* (92).

Trattamento della malaria non complicata

Lo scopo del trattamento della malaria non complicata da *P. falciparum* è quello di eliminare il parassita più velocemente possibile per evitare che la malattia si evolva nella forma severa. Per questo è importante che i pazienti seguano adeguatamente il regime terapeutico rispettando i tempi e le dosi del trattamento consigliato. Da un punto di vista di salute pubblica, il trattamento adeguato porta alla riduzione della trasmissione della malattia perché impedisce lo sviluppo delle forme sessuate nell'uomo, riduce il "reservoir" globale dei parassiti, che è rappresentato dagli individui infetti, e previene l'emergenza e la diffusione della farmacoresistenza.

Dal 2006 il trattamento consigliato da WHO per la malaria non complicata da *P. falciparum* è rappresentato dalle terapie combinate a base di artemisinina (ACT), in cui un derivato di artemisinina (attivo rapidamente, ma anche rapidamente eliminato), che porta a una riduzione drastica del numero di parassiti, viene associato a un altro antimalarico con diverso meccanismo di azione e farmacocinetica più lenta per eliminare i parassiti residui, aumentare l'efficacia e ridurre il rischio di insorgenza di resistenza. Al momento, la terapia combinata più distribuita è rappresentata da artemetere più lumefantrina, commercializzata con i nomi di Coartem®/Riamet® dal 2001 da Novartis con il supporto di diverse organizzazioni internazionali. E' stato il primo esempio di farmaco venduto con la politica dei due nomi/due prezzi. Il Coartem® è distribuito nei paesi in via di sviluppo a un prezzo significativamente ridotto per poter essere acquistato anche da chi presenta bassa disponibilità economica, mentre il Riamet® è lo stesso preparato, ma destinato ai mercati occidentali (98,99). In Italia il preparato non è in vendita.

Nel gennaio 2009, Novartis, insieme all'agenzia internazionale "Medicines for Malaria Venture" (MMV), ha lanciato il Coartem® Dispersibile, il primo ACT specifico per i bambini colpiti da malaria. Si tratta di un farmaco di gusto dolce, granulare, di facile somministrazione; è ben tollerato e garantisce un'efficacia terapeutica comparabile a quella di Coartem per i bambini colpiti da malaria non complicata; è stato reso disponibile a prezzo di costo per le strutture sanitarie pubbliche nelle aree a endemismo malarico.

Altre combinazioni usate in ACT sono artesunato più amodiachina, artesunato più meflochina e artesunato più S/P. E' in corso di registrazione una nuova combinazione ACT fissa costituita da diidroartemisinina-piperachina, sostenuta dall'italiana Sigma Tau insieme a MMV e altri

partner: si chiamerà Eurartesin ed è destinata al trattamento orale della malaria non complicata.

Quello che primariamente la WHO raccomanda è, se possibile, di iniziare la terapia solo dopo confermata diagnosi di malaria, di non usare i derivati di artemisinina come monoterapia per evitare il rischio di insorgenza di ceppi resistenti e di completare i tre giorni di terapia con ACT. Inoltre, come parte dei programmi di pre-eliminazione della malaria nelle aree endemiche, specialmente quelle a bassa trasmissione, la WHO consiglia anche di aggiungere una singola dose di primachina al trattamento con ACT come farmaco anti-gametocita in grado quindi di bloccare la trasmissione all'insetto vettore.

Nel caso di infezioni con *P. vivax*, si può ancora usare clorochina, se il parassita è suscettibile a questo farmaco; va invece usata ACT se ci si trova in aree dove sono diffusi parassiti clorochina-resistenti. La WHO suggerisce di usare le combinazioni in cui un derivato di artemisinina viene associato a farmaci con lunga semivita, quali meflochina. Una cura radicale di *P. vivax* richiede tuttavia trattamento anche per 14 giorni con primachina per debellare le forme dormienti nel fegato, gli "ipnozoiti" responsabili delle recrudescenze anche a lungo termine di questa specie di plasmodio (100).

Trattamento della malaria severa

L'obiettivo principale del trattamento della malaria severa da *P. falciparum* è quello di riuscire a prevenire la morte del paziente e, nel caso si tratti di malaria cerebrale, anche di prevenire i danni neurologici spesso associati. Nel caso della malaria grave in gravidanza lo scopo della terapia è quello di evitare prima di tutto la morte della madre.

La malaria severa è una situazione di emergenza che va trattata velocemente appena confermata la diagnosi con qualsiasi farmaco efficace si abbia a disposizione. L'artesunato IV si è dimostrato superiore al chinino per il trattamento della malaria severa sia in Asia che in Africa (101, 102). Tuttavia, l'artesunato non è registrato in Europa e per l'approvvigionamento e per l'uso negli ospedali Italiani occorre uno speciale permesso dalle autorità ministeriali; in alternativa, si usa il chinino.

Profilassi antimalarica

Il trattamento profilattico antimalarico è suggerito a tutti coloro che, provenendo da aeree non endemiche, devono soggiornare per brevi periodi in aree endemiche (turisti, operatori commerciali, volontari) e, non essendo coperti da immunità clinica, sono a rischio di contrarre la malaria nella forma severa. I farmaci suggeriti sono meflochina, doxiciclina e malarone.

La meflochina (Lariam®) è un farmaco ad azione schizonticida rapida, con effetto anche sui gametociti di *P. vivax* e *P. malariae*, ma non su quelli di *P. falciparum*. L'uso di meflochina può causare effetti collaterali, quali disturbi digestivi (vomito e diarrea) e disturbi a carico del sistema nervoso centrale. I primi casi di resistenza furono descritti nel Sud Est Asiatico. Attualmente, nelle forme non complicate di malaria, non si usa in monoterapia, ma solo in terapia combinata con un derivato di artemisinina.

Altro farmaco in uso come profilassi è il malarone, che consiste in un'associazione fissa di atovaquone e proguanil. Atovaquone è un analogo dell'ubichinone. Agisce sul complesso Bc1 dei mitocondri inibendo il trasporto degli elettroni e causando il collasso del potenziale di membrana dei mitocondri (103). Ha una potente azione schizonticida ed è attivo anche contro le forme epatiche di *P. falciparum,* ma non contro gli ipnozoiti di *P. vivax*. Purtroppo, atovaquone in monoterapia ha causato una rapida selezione di ceppi farmaco-resistenti, invece in associazione con proguanil (Malarone®) si è osservata una diminuzione di insorgenza di ceppi resistenti e una migliore efficacia. Questo farmaco è prevalentemente usato nella profilassi dei viaggiatori e, vista l'attività dei due composti contro lo stadio epatico, la profilassi con malarone può essere terminata una settimana dopo il ritorno da zone con malaria (104).

Farmaco-resistenza

Il controllo e l'eliminazione della malaria dipendono in modo cruciale dalla disponibilità di trattamenti efficaci contro tutte le specie del Plasmodio nei diversi stadi di crescita. Purtroppo, non solo il numero di farmaci disponibili è esiguo, ma per molti di essi è diffusa la presenza di ceppi resistenti.

In una popolazione microbica si generano sempre e spontaneamente ceppi mutanti, che poi vengono selezionati dall'ambiente in cui si riproducono. Il tipo di farmaco e l'adeguatezza del trattamento, la dose e la farmacocinetica/farmacodinamica di un prodotto partecipano a questa selezione. Mentre ci sono voluti più di 20 anni di uso clinico perché si sviluppasse resistenza a clorochina, sono bastati 6 mesi per l'atovaquone (105). Fino a tre anni fa si pensava che i derivati di artemisinina fossero sicuri. Questa convinzione era basata sull'osservazione che l'uso millenario in Cina degli infusi di *Artemisia annua* non aveva contribuito all'emergenza di ceppi resistenti. Tuttavia, ci sono ormai evidenze che in zone del Sud Est Asiatico, specialmente al confine tra Cambogia e Tailandia, il trattamento ACT non è più così efficace: occorrono tempi più lunghi e dosi più elevate per eliminare i parassiti (106-108). Si parla di "tolleranza clinica", anche se non di dichiarata resistenza. Mancano infatti a tutt'oggi le basi molecolari di questo fenomeno e un fenotipo *in vitro* che permetta di distinguere i ceppi artemisinina-resistenti da quelli sensibili.

I meccanismi di resistenza agli antimalarici sono simili a quelli per gli altri antibiotici o chemioterapici. Si tratta di mutazioni a livello degli enzimi "target" nel caso di S/P, che inibiscono la sintesi dei folati, oppure di attivazione di pompe di efflusso o mutazioni del trasportatore come nel caso di meflochina o clorochina (105). La ACT ha permesso di aumentare l'efficacia del trattamento antimalarico utilizzando, in dosi diverse, farmaci non più utili in monoterapia (S/P o meflochina), purchè associati a un derivato di artemisinina. E'

estremamente preoccupante che si stia perdendo l'efficacia delle artemisinine perché non esistono terapie alternative, specialmente per la malaria severa, non esistono farmaci nuovi in fase avanzata di sviluppo preclinico e non ci sono terapie combinate senza artemisinine che siano parimenti efficaci. Per proteggere l'efficacia della ACT è stato recentemente elaborato da "Roll Back Malaria" e WHO un piano internazionale chiamato "global plan for artemisinin resistance containment" (GPARC) allo scopo di mobilitare risorse e interventi politici per frenare la diffusione dei ceppi resistenti ad artemisinina, eliminarli dove sono presenti e stimolare lo sviluppo di nuovi farmaci antimalarici (109).

CONCLUSIONI

Da quando nel 1880 Alphonse Laveran (premio Nobel nel 1907) osservò per primo il parassita nelle cellule del sangue periferico umano delle persone con la malaria, nel 1885 Camillo Golgi (premio Nobel nel 1906) dimostrò l'associazione tra periodicità delle febbri malariche e il ciclo del plasmodio e, successivamente, Battista Grassi, Amico Bignami e Giuseppe Bastianelli fornirono la prova definitiva che solo la puntura della zanzara *Anopheles* poteva trasmettere il parassita malarico all'uomo, sono stati fatti grandi passi in avanti. Oggi i genomi di *P. falciparum*, *P. vivax* e di *Anopheles gambiae* sono stati completamente definiti, così come sono stati chiariti i meccanismi d'azione e di resistenza di alcuni farmaci antimalarici e gli aspetti di biologia molecolare e immunologici della patogenesi della malaria. Inoltre, diverse preparazioni vaccinali sono attualmente in via di sviluppo per arrivare a una profilassi completamente efficace nei prossimi decenni. Tuttavia, altri aspetti di notevole rilievo devono essere ancora chiariti, che riguardano in particolare:

a) la patogenesi delle forme più gravi di malaria (anemia severa, malaria cerebrale e sindrome da "distress" respiratorio),
b) i meccanismi dell'immunità e dell'immunodepressione legati alla malaria,
c) i meccanismi di resistenza ai farmaci e agli insetticidi,
d) la biologia del vettore e del parassita.

In Italia, a partire dal 2007, si è costituita una rete per lo studio della malaria ("Italian Malaria Network"), che riunisce diversi gruppi di malariologi che da anni lavorano

Tabella 3
La rete italiana sulla malaria

Sede	Referente	Principale attività
Università degli Studi di Torino	Prof. Paolo Arese	Patogenesi della malaria da *P. falciparum*
Università degli Studi del Piemonte Orientale, Novara	Prof. Menico Rizzi	Analisi di proteine di *Plasmodium* e *Anopheles*
Università degli Studi di Milano	Prof.ssa Donatella Taramelli	Analisi di nuovi farmaci Patogenesi
Università degli Studi di Brescia	Prof. Francesco Castelli	Studi clinici Aspetti clinici ed epidemiologici Interazioni HIV/malaria
Università degli Studi di Siena	Prof. Giuseppe Campiani	Sintesi e analisi di nuovi farmaci
Università degli Studi di Camerino	Prof.ssa Annette Habluetzel	Analisi di nuovi farmaci Patogenesi Genomica e proteomica funzionale di vettori *Anopheles*
Università degli Studi di Perugia	Prof. Andrea Crisanti	Genomica e proteomica funzionale di *Plasmodium*
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"	Prof. David Modiano	Immunogenetica delle resistenze Genetica e biologia molecolare di vettori *Anopheles* Genomica e proteomica funzionale di *Plasmodium* Resistenze ai farmaci antimalarici
Università degli Studi di Napoli	Prof. Bruno Arcà	Genetica e biologia molecolare di vettori *Anopheles* Sintesi e analisi nuovi farmaci
Istituto Superiore di Sanità, Roma	Dott. Pietro Alano	Genomica e proteomica funzionale di *Plasmodium* Patogenesi Epidemiologia molecolare Resistenze ai farmaci antimalarici

nel settore. Lo scopo è quello di creare un laboratorio multidisciplinare "virtuale" che permetta ai gruppi di rafforzare le sinergie, sfruttare piattaforme metodologiche comuni e attirare fondi. La rete nel 2010 è confluita in un centro interuniversitario (Centro Interuniversitario di Ricerca sulla Malaria, CIRM), che ha quindi stabilito un accordo bilaterale con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) dando vita al consorzio CIRM-ISS (110). Una scheda sintetica del consorzio è mostrata nella Tabella 3 e rivela come il CIRM-ISS comprenda più settori di competenza con esperti in diversi campi dagli insetti vettori, alla biologia molecolare, alla genetica umana, immunologia e farmacologia fino a gruppi clinici.

Nota aggiunta in corso di stampa: Sul *New England Journal of Medicine* è stata appena pubblicata la notizia (10.1056/NEJMe1111777, 18 ottobre 2011) che GlaxoSmithKline, in partnership con la "Program for Appropriate Technology in Health (PATH) Malaria Vaccine Initiative", grazie anche al significativo contributo della Fondazione Bill e Melinda Gates, ha sviluppato un nuovo vaccino da utilizzare in bambini e adolescenti dell'Africa Sub-Sahariana. Tale vaccino, basato su un costrutto ibrido dell'antigene di superficie dell'epatite B fuso con un antigene ricombinante derivato da una parte di una proteina di superficie dello sporozoita, codificato come RTS,S/AS01, dovrebbe essere disponibile nei prossimi tre anni. La sperimentazione di fase III in uno studio multicentrico su oltre 15.000 soggetti avrebbe provato una protezione del 55% contro tutti gli episodi malarici, una percentuale significativamente superiore rispetto a quanto dimostrato in studi precedenti. L'impiego di questo vaccino sarà probabilmente incluso nella prossima linea guida della WHO attesa per il 2015.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la Dott.ssa Renata Paleari ed il Prof. Sandro Eridani (Dipartimento Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano) per il loro contributo critico alla parte clinica ed epidemiologica.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. World malaria report. Geneva: WHO, 2010.
2. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, et al. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. Nature 2005;434:214-7.
3. http://myweb.tiscali.co.uk/tropring/malclock.htm
4. Hay S, Guerra C, Tatem A, et al. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis 2004;4:327-36.
5. www.rbm.who.int/gmap
6. www.rbm.who.int/worldmalariaday
7. Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, et al. Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. Clin Infect Dis 2009;49:852-60.
8. Bruce-Chwatt LJ. Essential malariology. London: William Heinemann Medical Books, 1985.
9. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, et al. Malaria and the red cell. Hematology 2002:35-57.
10. White NJ, Turner GD, Medana IM, et al. The murine cerebral malaria phenomenon. Trends Parasitol 2010;26:11-5.
11. Corbellini G. Il gigante dai piedi d'argilla. Breve storia della malaria d'Italia dall'antichità all'eradicazione. In: Tagarelli A, ed. La malaria in Calabria a cinquant'anni dalla campagna antimalarica che portò all'eradicazione della malattia: mostra documentaria. Mangone (CS): Comitato per gli Studi Storici e Scientifici della Malaria in Calabria, 1997:33-61.
12. Coluzzi M. Malaria vector analysis and control. Parasitology Today 1992;8:113-8.
13. Majori G, Sabatinelli G, Casaglia O, et al. Imported malaria in Italy from 1986 to 1988. J R Soc Health 1990;110:88-9.
14. Abu-Raddad L, Patnaik P, Kublin J. Dual infection with HIV and malaria fuels the spread of both diseases in sub-Saharan Africa. Science 2006;314:1603-6.
15. Guillet P, Germain MC, Giacomini T, et al. Dual origin and prevention of airport malaria in France. Trop Med Int Health 1998;3:700-5.
16. Giacomini T. Paludisme des aéroports et de leurs alentours. Revue du Praticien 1998;48:264-7.
17. Valentine WN, Neel JV. Hematologic and genetic study of transmission of thalassemia (Cooley's anemia: Mediterranean anemia). Arch Intern Med 1944;74:185-96.
18. Haldane JBS. The rate of mutation of human genes. Proceedings of the VIII International Congress of Genetics. Hereditas 1949;35(suppl 1):267-73.
19. Dronamraju KR, Arese P, eds. Malaria: genetic and evolutionary aspects. New York: Springer, 2006.
20. Siniscalco M, Bernini L, Filippi G, et al. Population genetics of haemoglobin variants, thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. Bull World Health Organ 1966;34:379-93.
21. Luzzatto L, Nwachiku-Jarrett ES, Reddy S. Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. Lancet 1970;14:319-21.
22. Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. J Mol Med 1998;76:581-8.
23. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, et al. Haemoglobin C protects against clinical Plasmodium falciparum malaria. Nature 2001;414:305-8.
24. Beet EA. Sickle cell disease in northern Rhodesia. East Afr Med J 1947;24:212-22.
25. Allison AC. The distribution of the sickle-cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1954;48:312-8.
26. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. Nat Commun 2010;1:104.
27. Allison AC. Polymorphism and natural selection in human populations. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1964;29:137-49.
28. May J, Evans JA, Timmann C, et al. Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. JAMA 2007;297:2220-6.
29. Williams TN. Human red blood cell polymorphisms and malaria. Curr Opin Microbiol 2006;9:388-94.
30. Ragusa A, Lombardo M, Sortino G, et al. β(s) gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: Implications for gene flow. Am J Hematol 1988;27:139-41.
31. Boussiou M, Loukopoulos D, Christakis J, et al. The origin of the sickle mutation in Greece; evidence from β(S) globin gene cluster polymorphisms. Hemoglobin 1991;15:459-67.

32. Penman BS, Pybus OG, Weatherall DJ, et al. Epistatic interactions between genetic disorders of hemoglobin can explain why the sickle-cell gene is uncommon in the Mediterranean. P Natl Acad Sci USA 2009;106:21242-6.
33. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in Blacks. New Engl J Med 1976;295:302-4.
34. Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, et al. Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. P Natl Acad Sci USA 1999;96:13973-7.
35. Tachado SD, Gerold SD, McConville P, et al. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. J Immunol 1996;156:1897-907.
36. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, et al. Different response to Plasmodium falciparum malaria in West African sympatric ethnic groups. P Natl Acad Sci USA 1996;93:13206-11.
37. Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, et al. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. Blood 2006;108:370-8.
38. Haldar K, Murphy SC, Milner DA, et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. Annu Rev Pathol 2007;2:217-49.
39. Facer CA. Direct Coombs antiglobulin reaction in Gambia children with Plasmodium falciparum malaria. II: Specificity of erythrocyte-bound IgG. Clin Exp Immunol 1980;39:279-88.
40. Mendis KN, David PH, Hommel M, et al. Immunity to malarial antigens on the surface of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Am J Trop Med Hyg 1983;32:926-30.
41. Stanley HS, Mayes JT, Cooper NR, et al. Complement activation by the surface of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Mol Immun 1984;21:145-50.
42. Turrini F, Ginsburg H, Bussolino F, et al. Phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells by human monocytes: involvement of immune and nonimmune determinants and dependence on parasite developmental stage. Blood 1992;80:801-8.
43. Celada A, Cruchaud A, Perrin LH. Opsonic activity of human immune serum on in vitro phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by monocytes. Clin Exp Immunol 1982;47:634-44.
44. Giribaldi G, Ulliers D, Mannu F, et al. Growth of Plasmodium falciparum induces stage-dependent haemichrome formation, oxidative aggregation of band 3, membrane deposition of complement and antibodies, and phagocytosis of parasitized erythrocytes. Br J Haematol 2001;113:492-9.
45. Barnwell JW, Galinski MR. Invasion of vertebrate cells: hepatocytes. In: Sherman IW ed. Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1998:93-120.
46. Okoye VC, Bennett V. Plasmodium falciparum malaria: band 3 as a possible receptor during invasion of human erythrocytes. Science 1985;227:169-71.
47. Baum J, Pinder M, Conway DJ. Erythrocyte invasion phenotypes of Plasmodium falciparum in the Gambia. Infect Immun 2003;71:1856-63.
48. Dolan SA, Miller LH, Wellems TE. Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum. J Clin Invest 1990;86:618-24.
49. Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T, et al. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependent and independent pathways. P Natl Acad Sci USA 2003;100:4796-801.
50. Stubbs J, Simpson KM, Triglia T, et al. Molecular mechanisms for switching of *P. falciparum* invasion pathways into human erythrocytes. Science 2005;309:1384-7.
51. Enderle T, Ha T, Chemla DS, et al. Near-field fluorescence microscopy of cells. Ultramicroscopy 1998;71:303-9.
52. Chang KH, Tam M, Stevenson MM. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. Blood 2004;103:3727-35.
53. Burgmann H, Looareesuwan S, Kapiotis S, et al. Serum levels of erythropoietin in acute Plasmodium falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 1996;54:280-3.
54. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 2000;13:277-99.
55. Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. Blood 2008;112:470-8.
56. Casals-Pascual C, Kai O, Cheung JO, et al. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. Blood 2006;108:2569-77.
57. Schwarzer E, Ku¨hn H, Valente E, et al. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. Blood 2003;101:722-8.
58. Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, et al. Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. Blood 2010;116:4328-37.
59. www.salute.gov.it/malattieInfettive/archivioNormativaMalattieInfettive.jsp?lingua=italiano&id=1455
60. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002;15:66-78.
61. Hanscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haematol 1999;21:235-45.
62. Bronner U, Divis PCS, Farnert A, et al. Swedish traveller with P. knowlesi malaria after visiting Malaysian Borneo. Malar J 2009;16:8-15.
63. Kain KC, Harrington MA, Tennison S, et al. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. Clin Inf Dis 1998;27:142-9.
64. Milne LM, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. J Clin Pathol 1994;47:740-2.
65. Killian AH, Metzger EJ, Mutchelknauss G, et al. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. Trop Med Int Health 2000;5:3-8.
66. Leke RF, Djakan RR, Mbau RJ, et al. Detection of *P. falciparum* antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosis placental malaria. J Clin Microbiol 1999;37:2992-6.
67. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002;15:66-78.
68. World Health Organization. New perspective in malaria diagnosis. Report of a Joint Who/USAID informal consultation. Geneva: WHO, 1999.
69. www.wpro.who.int/sites/rdt/documents
70. Gasser RA, Magill AJ, Ruebush T, et al. Malaria diagnosis: performances of Now ICT Malaria in a large scale field trial. Am J Trop Med Hyg 2005;73:2338.
71. Murray CK, Gasser RA, Magill AJ, et al. Update on rapid diagnostic tests for malaria. Clin Microbiol Rev 2008;21:97-110.
72. Chilton D, Malik An, Armstrong M. Use of rapid diagnostic test for diagnosis of malaria in the UK. J Clin Pathol

2006;59:826-66.
73. Boschetti C, Cappellini MD, Colombi M, et al. An unusual febrile non haemolytic reaction occurred after transfusion in a thalasemia major patient with asymptomatic P. falciparum infection. Transfusion 2011;53:469-72.
74. Craig MH, Bredenkamp BL, William CH, et al. Field and laboratory comparative evaluation of the rapid diagnostic tests. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;96:258-65.
75. Baker J, Ho MF, Pelecanos A, et al. Global sequence variations in the histidine rich protein 2 and 3 of P. falciparum; implication for the performance of rapid diagnostic tests. Malar J 2010;9:129.
76. Lee N, Baker J, McCarthy PJ, et al. Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of P. falciparum and P. vivax and its potential effect on performances of aldolase detecting rapid diagnostic tests. J Clin Microbio 2006;44:4547-9.
77. Bell DR, Wilson DW, Martin LD. False positive results of a histidine rich protein 2 detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuantly low parasite density. Am J Trop Hyg 2005;73:199-203.
78. Sing A, Rauch E, Raggenkamp A, et al. Evaluation of an ICT malaria Pf test for rapid post mortem diagnosis of Plasmodium falciparum malariain corpse examinated for forensic reasons. Int J Leg Med 2000;113:251-2.
79. Coban C, Yag M, Ohata K, et al. The malarial metabolite haemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. Allergol Int 2010;59:115-24.
80. Campuzano-Zulaga G, Hanscheid T, Grobrusch MP. Automated haematology analysis to diagnose malaria. Malar J 2010;9:346.
81. Joubert Y, Joubert F. A structural annotation resource for the selection of putative target protein in the malaria parasite. Malar J 2008;23:7-90.
82. Dormond L, Saton Ogay S, De Valliere B, et al. Multiplex real time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. Clin Microbiol Infect 2011;17:469-75.
83. Calderaro A, Gorrini C, Peruzzi S, et al. An 8 years survey on the occurrence of imported malaria in a non endemic area by microscopy and molecular assays. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;61:434-9.
84. Doolan DL, Dobano C, Baird JK. Acquired immunity to malaria.Clin Microbiol Rev 2009;21:97-110.
85. Kitchen AD, Barbara JAJ, Hewitt PE, et al. Documented cases of post transfusion malaria in England. A review in relation to current and proposed donor selection guideline. Vox Sang 2005;89:77-80.
86 Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. Vox Sang 2006;90:77-84.
87. Garaud O, Assal A, Pelletier B, et al. Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. Vox Sang 2008;95:226-31.
88. Chiodini PL, Hartley S, Hewitt PE, et al. Evaluation of a malaria antibody Elisa and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion transmited malaria. Vox Sang 1997;73:143-8.
89. Protocolli per l'accertamento dell'idoneità del donatore di sangue ed emocomponenti. Roma: Ministero della Salute, 2005.
90. Grande R, Petrini G, Silvani I, et al. Immunological testing for malaria and blood donor deferral: the experience of the Ca' Granda Polyclinic Hospital in Milan. Blood Transfus 2011;9:162-6.
91. Seed CR, Kitchen AD, Davies TM. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion transmitted malaria. Transf Med Rev 2005;19:229-40.
92. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria 2010. Geneva: WHO, 2010.
93. White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. Science 2008;320:330-4.
94. Clark RL. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. Reprod Toxicol 2009;28:285-96.
95. Efferth T, Kaina B. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. Crit Rev Toxicol 2010;40:405-21.
96. Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, et al. Artemisinins: their growing importance in medicine. Trends Pharmacol Sci 2008;29:520-7.
97. Haynes RK, Cheu KW, Tang MM, et al. Reactions of antimalarial peroxides with each of leucomethylene blue and dihydroflavins: flavin reductase and the cofactor model exemplified. Chem Med Chem 2011;6:279-91.
98. Nosten F, White NJ. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 2007;77:181-92.
99. Eastman RT, Fidock DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. Nat Rev Microbiol 2009;7:864-74.
100. Sinclair D, Gogtay N, Brand F, et al. Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated Plasmodium vivax malaria. Cochrane Database Syst Rev 2011;(7):CD008492.
101. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, et al. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. Lancet 2005;366:717-25.
102. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. Lancet 2010;376:1647-57.
103. Vaidya AB, Mather MW. Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. Annu Rev Microbiol 2009;63:249-67.
104. World Health Organization. WHO global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: WHO, 2010.
105. Müller IB, Hyde JE. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. Future Microbiol 2010;5:1857-73.
106. Dondorp AM, Yeung S, White L, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nat Rev Microbiol 2010;8:272-80.
107. Noedl H, Se Y, Sriwichai S, et al. Artemisinin resistance in Cambodia: a clinical trial designed to address an emerging problem in Southeast Asia. Clin Infect Dis 2010;51:e82-9.
108. Dondorp AM, Nosten F, Yi P et al. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. N Engl J Med 2009;361:455-67.
109. World Health Organization. WHO global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). Geneva: WHO, 2010.
110. http://www.italianmalarianetwork.it