

Toxoplasma gondii

Giovanni Di Bonaventura, BSc, PhD

CI “Microbiologia e Microbiologia Clinica”

CL Medicina e Chirurgia

Università “G. d’Annunzio”, Chieti-Pescara

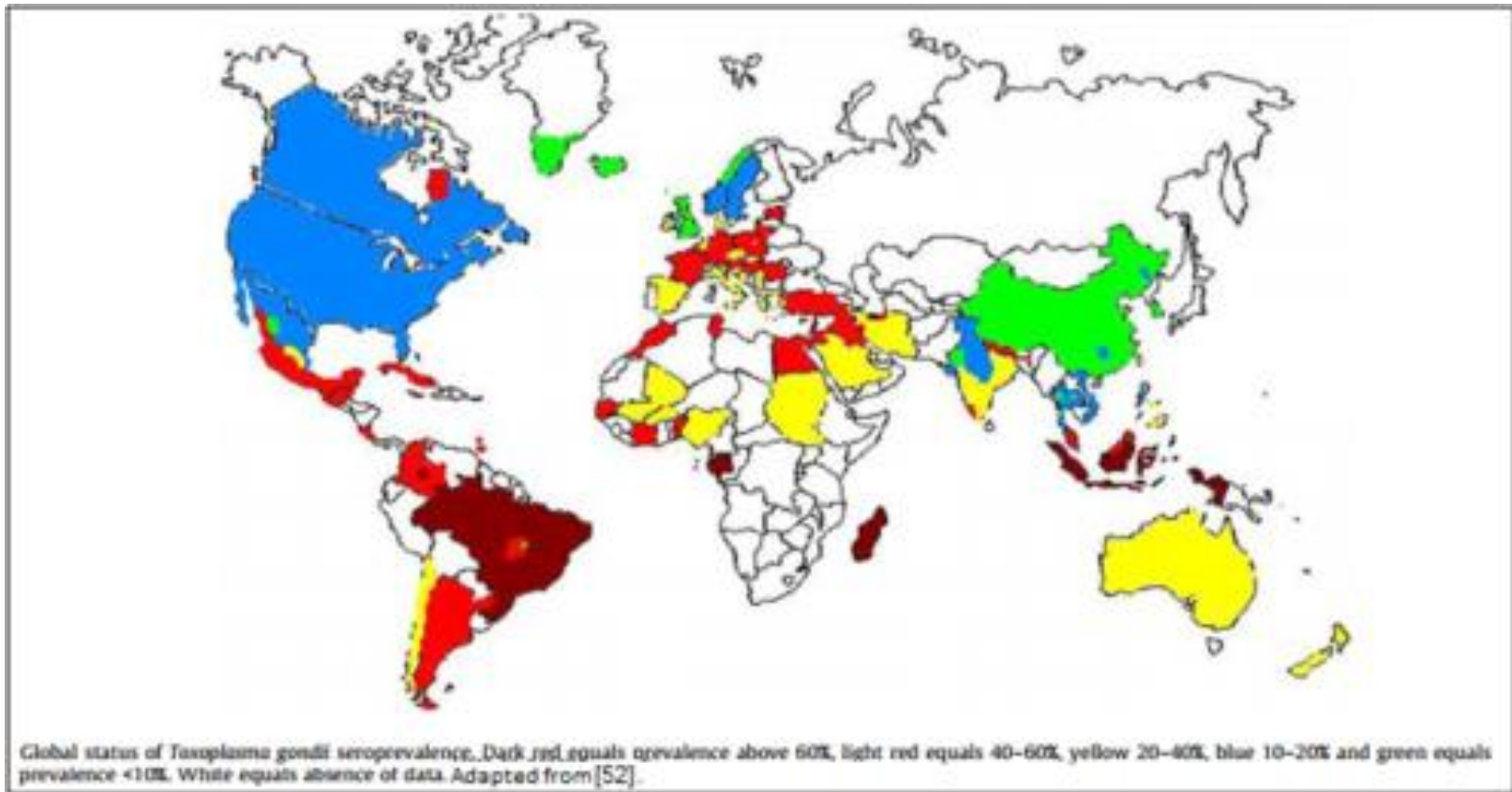
AA 2015-2016

T. gondii: tassonomia & epidemiologia



- *Toxoplasma gondii* (Phylum: Apicomplexa, Classe: Sporozoea)
- Parassita **intracelulare obbligato**
- **Unica specie del genere in grado di parassitare** gran parte delle specie a sangue caldo, incluso l'uomo, **causando la toxoplasmosi**.
- Per la prima volta descritto nel 1908 (Nicolle & Manceaux) nel **gondi**, roditore tipico del Nord Africa
- La toxoplasmosi è **una delle infezioni umane più comuni nel mondo** (sieroprevalenza mondiale: 25-30%):
 - in Italia, la sieroprevalenza (40-80%) aumenta con l'età indicando la continuità del rischio di contagio
- **Prevalenza dipendente da condizioni socio-sanitarie, clima, dieta, controllo del randagismo, qualità acqua potabile:**
 - elevata in aree tropicali (clima caldo-umido), in Paesi ad alto consumo di carne cruda o poco cotta (Francia) od in quelli a scarso controllo del randagismo (America Centrale)
- Il gatto (*Felidae*) è l'unico ospite definitivo per gli stadi sessuali del parassita e rappresenta quindi il principale serbatoio di infezione.
- L'uomo, sede della riproduzione asessuata, è uno dei possibili ospiti intermedi (roditori, uccelli, suini).
- L'infezione viene acquisita principalmente per via orale; possibile, ma rara, la trasmissione transplacentare (da madre a figlio), trasfusionale e post-trapianto.

T. gondii: epidemiologia



Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence: **dark red: >60%**; **light red: 40-60%**; **yellow: 20-40%**; **blue: 10-20%**; **green: <10%**

T. gondii: modalità di trasmissione

Robert-Gangneux and Dardé

***T. gondii* viene trasmesso all'uomo ed agli animali generalmente tramite ingestione:**

- ingestione di carne infetta (soprattutto di maiale o montone) cruda o non adeguatamente cotta o carne venuta a contatto con carne infetta
- ingestione accidentale di oocisti derivanti da feci di gatto o dalla lettiera o dal terreno (autoinoculazione da attività di giardinaggio, frutta o verdura non lavate, acqua non filtrata)

Seppur infrequentemente, nell'uomo è inoltre possibile la via parenterale:

- via transplacentare (materno-fetale)
- via trasfusionale
- post-trapianto: organo (virtualmente presente in tutti gli organi, *T. gondii* è più frequente nel cuore vs rene e fegato), midollo
- via transcutanea (ago; tagli durante allestimento vetrino per diagnosi)

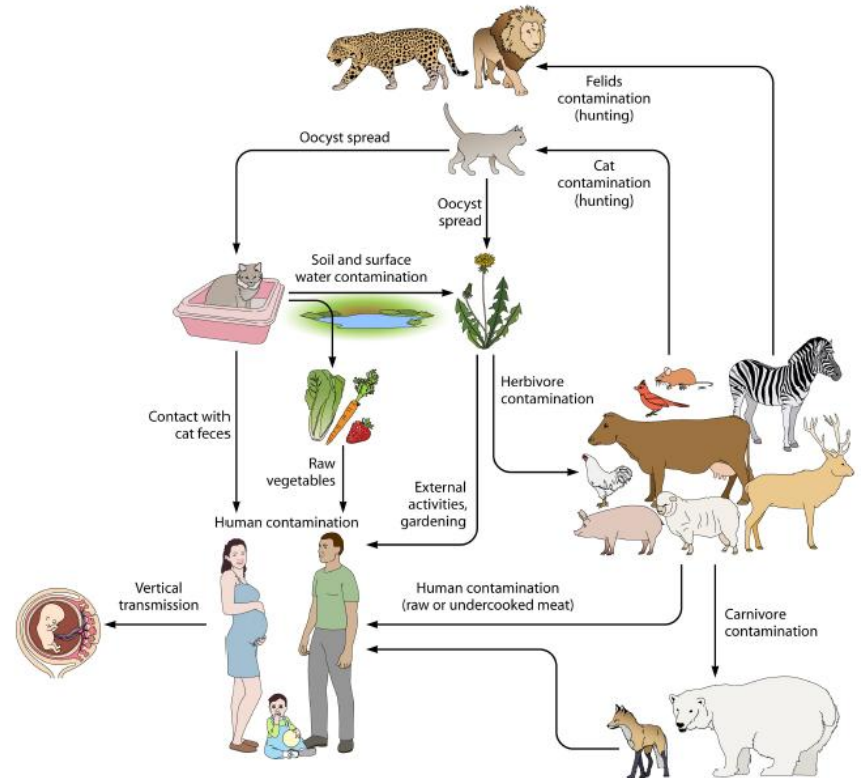
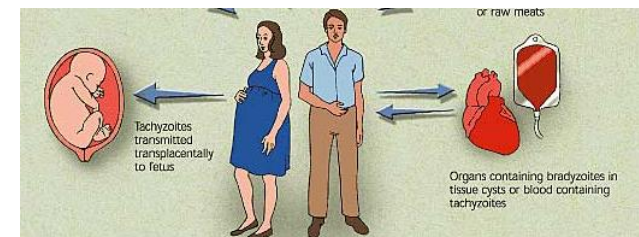
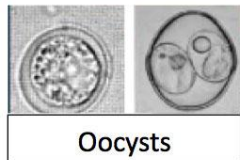


FIG 3 Sources of *T. gondii* infection in humans. The various sources of food-borne and environmental contamination of humans are represented.

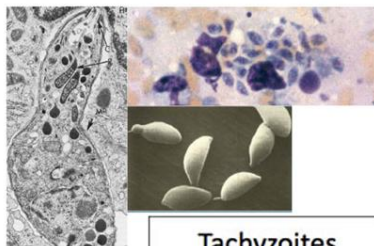


T. gondii: ciclo biologico

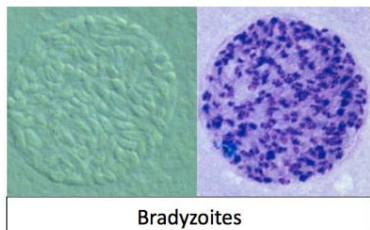
T. gondii riconosce nel **gatto l'ospite finale** (riproduzione sessuata) e negli **omeotermi (uomo compreso) l'ospite intermedio** (riproduzione asessuata). **Entrambi gli ospiti si infettano per via orale**, mangiando prodotti della terra contaminati e/o consumando carni di animali infetti.



Oocysts

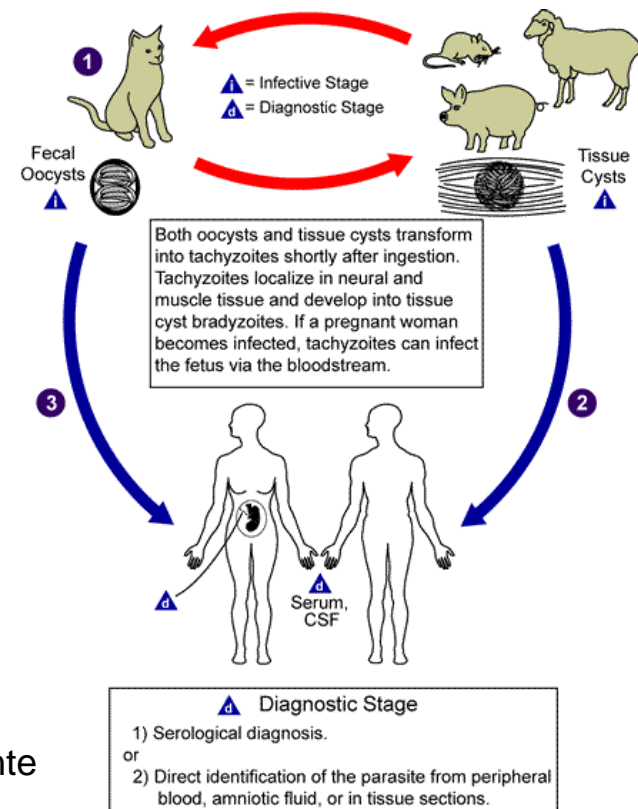


Tachyzoites

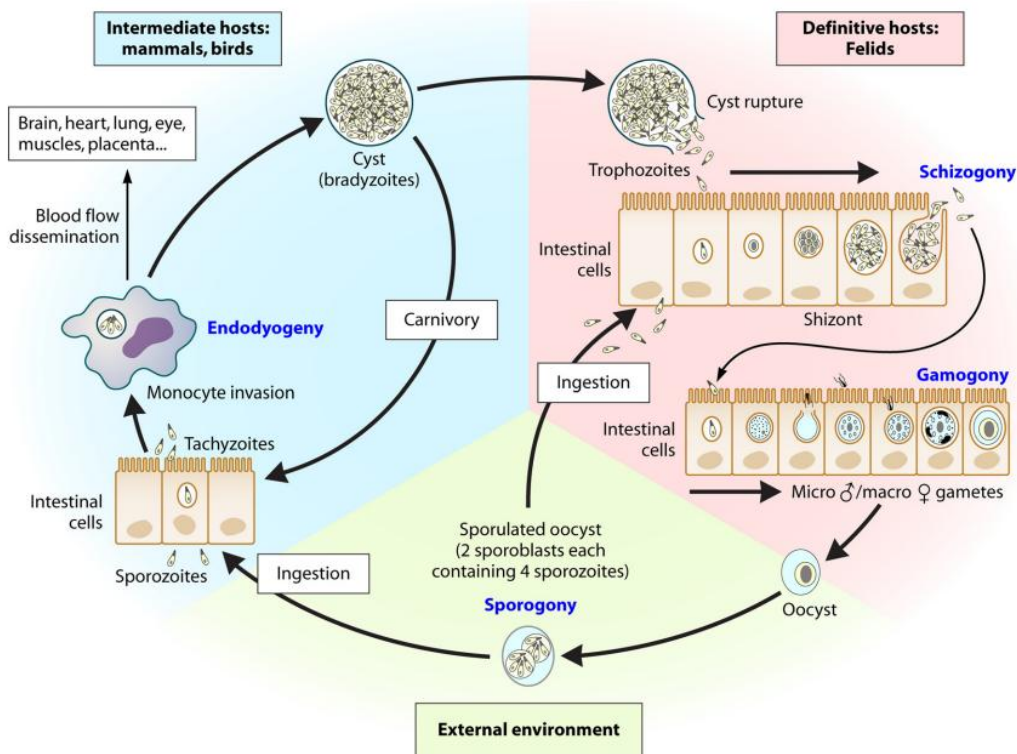


Bradyzoites

- Tachizoiti propri della fase acuta (parassitemica).
- La produzione di anticorpi specifici induce il differenziamento verso forme quiescenti (bradizoiti), proprie della fase cronica.
- Non è esclusa la co-presenza nell'ospite di entrambi i morfotipi.
- I parassiti formano cisti tissutali - generalmente localizzate nel muscolo scheletrico, nel miocardio e nel cervello - sopravvivendo anche per l'intera vita dell'ospite.



T. gondii: ciclo biologico



La riproduzione sessuale ha luogo solo nei felidi (gatti domestici e selvatici).

1. Il gatto si infetta a seguito di ingestione di carne (ospite intermedio) contaminata da oocisti o di cisti tissutali. La parete cistica si lisa per azione degli enzimi gastrici. I bradizoiti raggiungono gli enterociti, all'interno dei quali vanno incontro ad un numero limitato di divisioni asessuate, con formazione di merozoiti organizzati in uno schizonte (**schizogonia**).
2. Ha dunque luogo la riproduzione sessuata, con la formazione di gameti femminili e maschili (**gametogonia**). A seguito di fecondazione, le oocisti formatesi negli enterociti vengono liberate per lisi cellulare ed escrete dal gatto con le feci.
3. Dopo alcuni giorni (1-10 giorni, in dipendenza di umidità, temperatura, pH ambientali) ciascuna oocisti sporula, dando vita a 2 sporocisti, ciascuna contenente 4 sporozoiti (**sporogonia**).

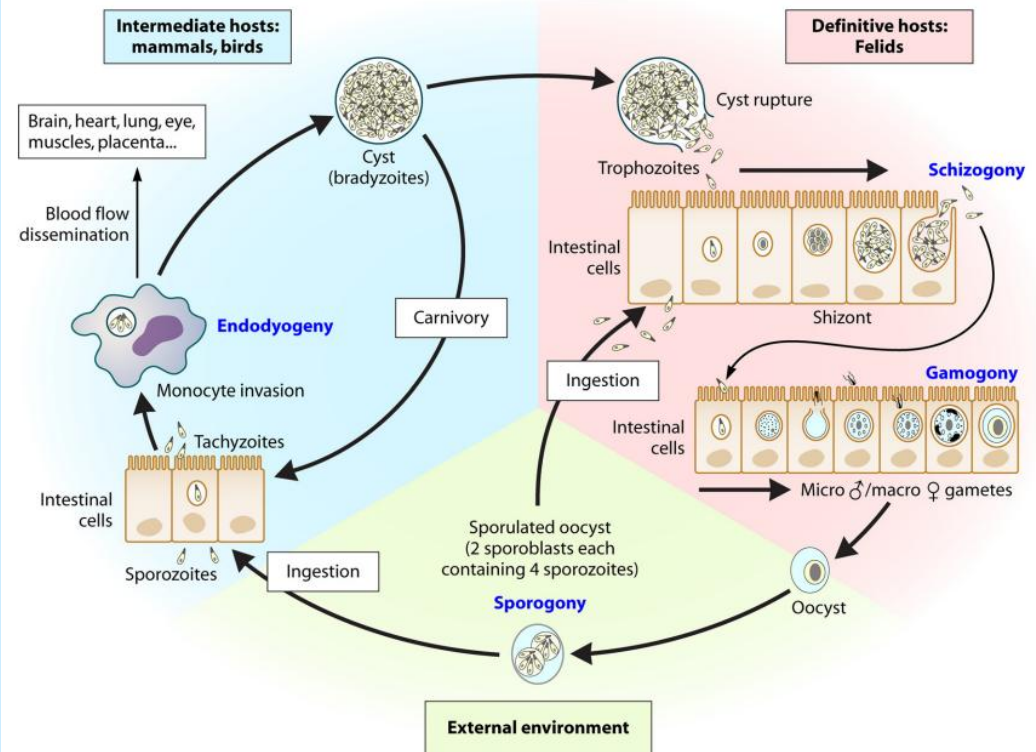
- Le oocisti vengono rilasciate 3-7 gg dopo l'ingestione delle cisti tissutali e può continuare fino a 20 gg. Il gatto infetto può liberare fino a 100.000.000 di oocisti nelle proprie feci.
- Esse possono infettare un ampio range di ospiti intermedi (a sangue caldo), dai mammiferi agli uccelli, a seguito di ingestione di acqua o cibo contaminati. Le oocisti sono inoltre infettanti anche per il gatto, sebbene con minore efficacia.
- Le oocisti possono sopravvivere nell'ambiente per diversi mesi (resistenza a disinfettanti, congelamento, essiccamento), ma vengono inattivate per esposizione a 70°C per 10 min.

T. gondii: ciclo biologico

Nell'ospite intermedio, il parassita va incontro al solo sviluppo asessuato.

1. A seguito dell'ingestione delle oocisti, vengono liberati gli sporozoit.
2. Questi penetrano nell'epitelio intestinale, dove differenziano in tachizoiti, forme attivamente replicanti (**endoduogenia**) che disseminano nell'ospite.
3. A distanza di 7-10 gg dall'infezione, i tachizoiti differenziano in bradizoiti formando cisti tessutali, principalmente nel cervello o nei muscoli.
4. A seguito di ingestione delle cisti tessutali da parte di un ospite intermedio (carne cruda o poco cotta), le cisti lisano al passaggio nello stomaco, rilasciando i bradizoiti.
5. I bradizoiti infettano l'epitelio intestinale del nuovo ospite e differenziano in tachizoiti, che disseminano nell'ospite.

Se la fase acuta ha luogo durante la gravidanza, il parassita può attraversare la placenta ed infettare il feto (forma congenita).



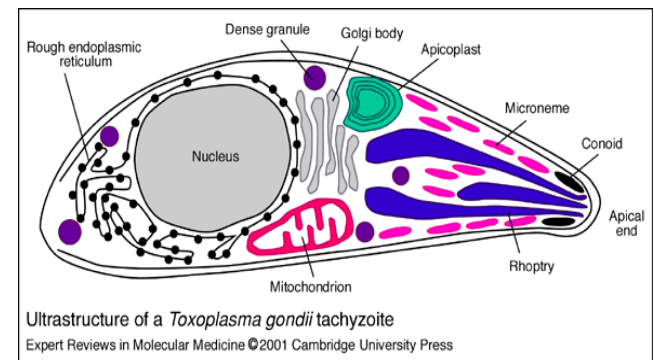
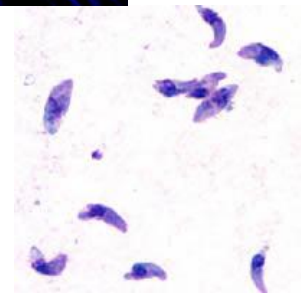
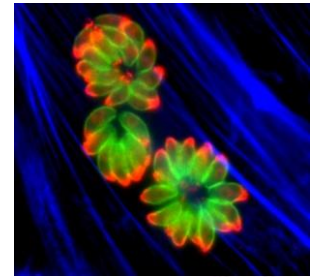
T. gondii: tachizoite (trofozoite)

- Forma infettante (alto potenziale replicativo) e intracellulare (vacuolo parassitoforo nei leucociti)
- Caratteristica della fase acuta (parassitemica)
- Responsabile della trasmissione materno-fetale e trasfusionale

Ultrastruttura e fisiologia:

- forma a luna crescente (da cui il nome *toxoplasma*), 6-8 μm
- polo anteriore fusiforme, polo posteriore arrotondato
- membrana (pellicola), associata ad un citoscheletro microtubulare (micronemi) interrotto a livello dell'anello polare
- dotato di complesso apicale (*Apicomplexa*)
- sensibile ad essiccamento, congelamento/scongelamento, enzimi gastrici
- si divide attivamente e rapidamente (tachi-) mediante un meccanismo peculiare (endoduogenia), disponendosi «a rosetta»

divisione endoduogenetica: all'interno della cellula, il protozoo si divide longitudinalmente formando lo schizonte che, in seguito, lisa liberando trofozoiti giovani (merozoiti).

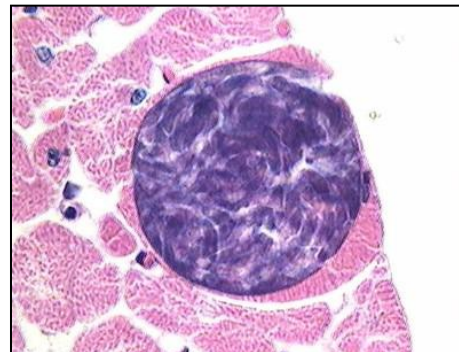
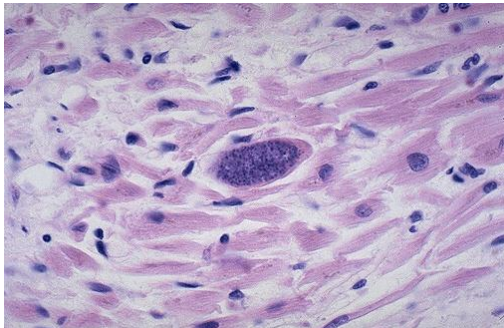


T. gondii: bradizoite (cistozoite)

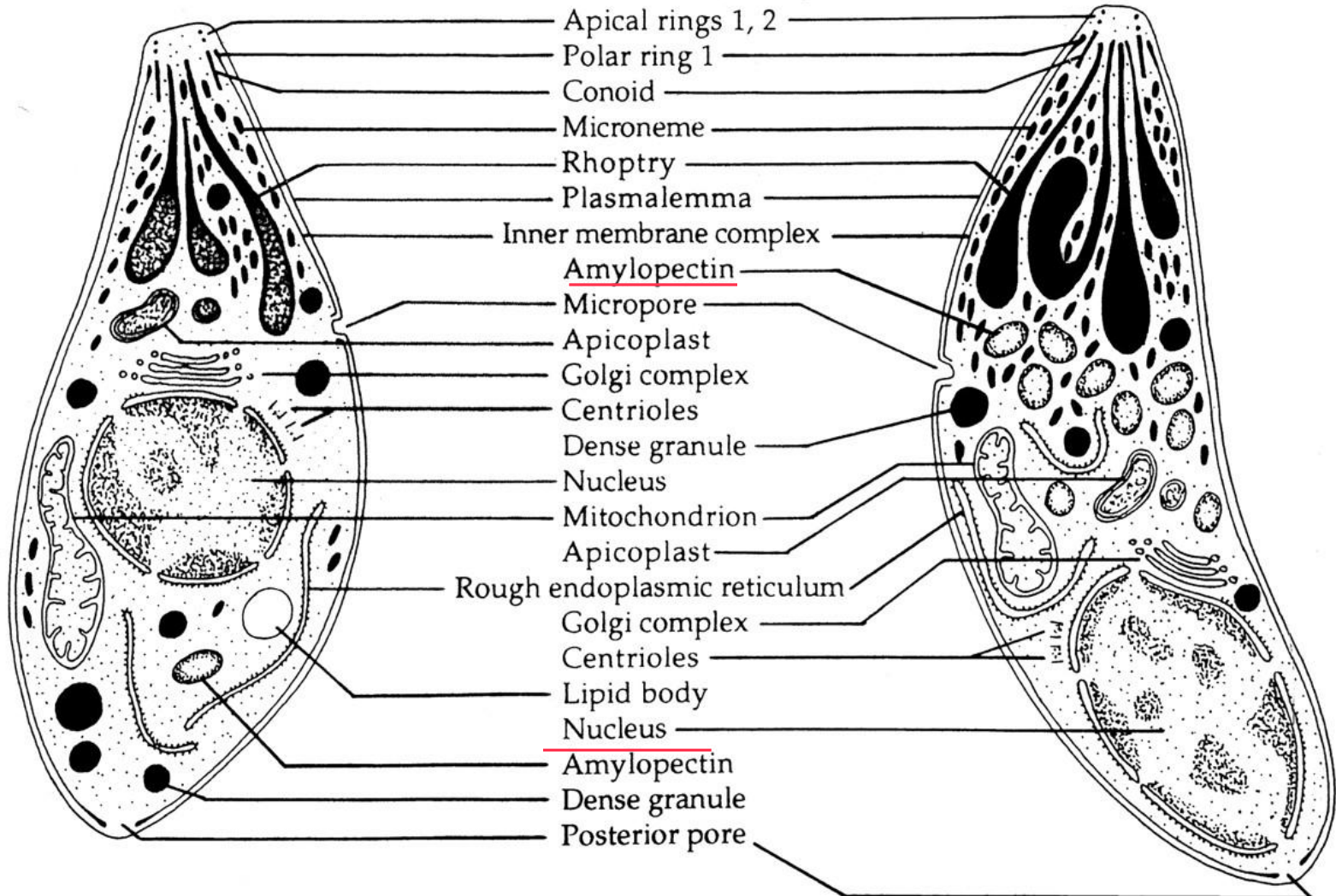
- Caratteristica della fase cronica (basso potenziale replicativo)
- A localizzazione cardiaca, cerebrale, oculare (retinica), muscolare, scheletrica
- Contenuto - in numero variabile (10-1000) e disposti caratteristicamente (rosette) - in un vacuolo parassitoforo (d:10-100 um; circolare, nel cervello/allungato, nel muscolo) dotato di doppia membrana:
 - m. interna (frastagliata, dal parassita)
 - m. esterna (regolare, dalla cellula ospite)

Ultrastruttura e fisiologia:

- morfologicamente simile al tachizoite (differenze: nucleo più periferico e presenza di glicogeno nel citoplasma)
- metabolismo rallentato; a lentissima replicazione (endoduogenia)
- resistenza a succhi gastrici (può infettare animali carnivori), calore, freddo, immunità



T. gondii: tachizoite vs bradizoite



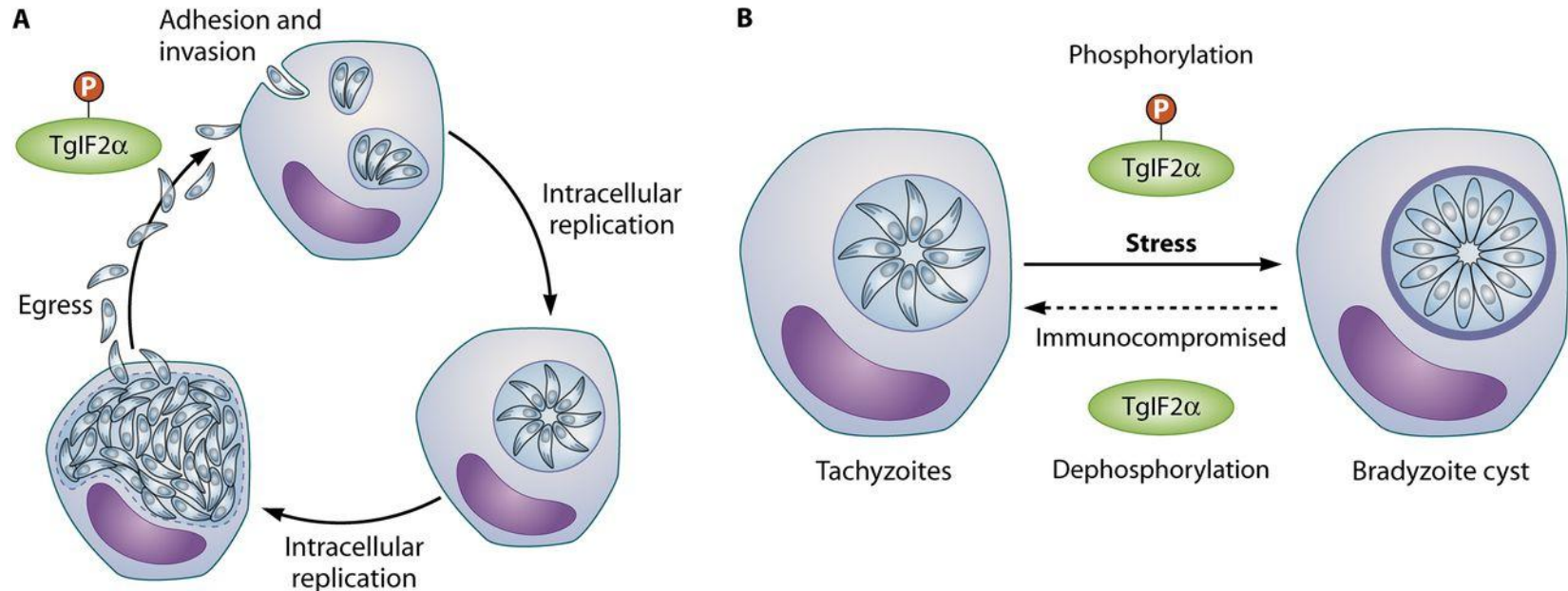
tachizoite

bradizoite

Toxoplasmosi: patogenesi

- **Invasività cellulare = principale fattore di virulenza**
- **Invasione regolata da motilità del parassita e secrezione di proteine necessarie per adesione e internalizzazione** (complesso apicale: rophtries, micronemi):
 - adesina MIC2
 - motilità “gliding”, mediata da riarrangiamento del citoscheletro, consente la rapida internalizzazione del parassita (15-30 sec)
 - “moving junction” mediata da proteine AMA1 (apical membran antigen) e RONS (rhoptry neck proteins) inserite nella membrana della cellula da parassitare
 - formazione di un vacuolo parassitoforo, all’interno del quale è contenuto il protozoo.
 - proteine ROPs influenzano crescita e virulenza del parassita. ROP16, in particolare, modula l’espressione genica della cellula ospite, interferendo sulla sintesi di ILs
 - creazione di un sistema di membrane a struttura microtubulare che regola gli scambi tra vacuolo e citosol ospite
- **Differenziazione tachizoite/bradizoite:**
 - modulata da risposta immune dell’ospite e da proteine enzimatiche (GRA, SAG)
 - ruolo centrale nella progressione dalla fase acuta a quella cronica
 - ruolo centrale nella riattivazione della malattia in soggetti immunocompromessi

Toxoplasma: proliferazione e sviluppo



A) The *Toxoplasma* tachyzoite lytic cycle consists of the following three basic steps: attachment and invasion of a host cell, intracellular replication, and egress into the extracellular environment. Following egress, the parasites will repeat the process by invading a neighboring host cell and continuing to proliferate in the infected tissues

B) During a primary infection, *Toxoplasma* tachyzoites quickly develop into latent bradyzoites, which are encased in a thick cyst wall inside host cells. The development and maintenance of bradyzoites during the primary infection may occur in response to various cellular stresses encountered in the new host, such as heat shock (fever), oxidative stress (reactive oxygen species produced from immune effector cells), and nutrient deprivation caused by gamma interferon (IFN- γ) stimulation of host macrophage

Toxoplasmosi: clinica

La toxoplasmosi può presentarsi con 4 differenti quadri clinici:

- linfoadenopatia
- corioretinite
- malattia potenzialmente letale (immunocompromessi)
- infezione acquisita (in gravidanza e trasmessa alla fetto)

Linfoadenite (fase acuta):

- generalmente asintomatica
- talvolta (10-20%) si presenta come sindrome mononucleosica-simile (durata: 4-6 settimane):
 - linfoadenopatia, a grappolo od isolata, occipitale o cervicale; a volte anche profonda (l. mesenterici, l. mediastinici, l. retroperitoneali)
 - febbre, malessere
 - raramente compaiono sintomi gravi (miocardite, polmonite, encefalite)



Corioretinite (fase acuta o cronica):

- disturbi della visione («luci nella nebbia»), spesso accompagnati da dolore, febbre, malessere
- possibili complicazioni: distacco retina, vitreite, uveite, papillite
- generalmente auto-limitante, il ricorso alla terapia dipende dalla estensione delle lesioni e dalla localizzazione



Toxoplasmosi: clinica

Ospite immunocompromesso (fase acuta o cronica):

- encefalite grave
 - esordio acuto: cefalea, confusione, convulsioni, deficit motorio;
 - esordio sub-acuto: anomalie dei nervi cranici, manifestazioni psichiatriche (confusione, letargia, psicosi)
- infrequente localizzazione midollare (mielite trasversa) o panencefalite (rapidamente fatale)
- forma sistemica (multi-organo) nel trapiantato midollare/organo (shock settico, insufficienza cardio-respiratoria, miocardite, polmonite)

Toxoplasmosi: clinica

Infezione connatale (transplacentare):

- acquisita dal feto da madre in prima infezione (anche asintomatica)
- 3.3 casi /10.000 nascite (Francia)
- rischio di infezione cresce al progredire della gestazione (10-30-60% nel I, II, III trimestre, rispettivamente)
- gravità diminuisce nel corso della gestazione:
 - nel I trimestre: più grave (abortiva, oppure gravi danni a carico di occhio e cervello)
 - nel II trimestre: variabile (epilessia, anemia, rash, polmonite, corioretinite)
 - nel III trimestre: subclinica (ma frequente, 90%)
- nei casi più gravi, alla nascita, “tetrade di Sabin”:
 - corioretinite (anche recidivanti tardive, conseguente cecità) (14%)
 - calcificazioni endocraniche (8%)
 - idrocefalo (8%)
 - convulsioni (8%)
- prognosi: motoria (buona), cognitivo-verbale (discreta)



A fetus may contract toxoplasmosis through the placental connection with its infected mother

The mother may be infected by:

Improper handling of cat litter



Handling or ingesting contaminated meat

ADAM.



Toxoplasmosi: diagnosi

DIRETTA

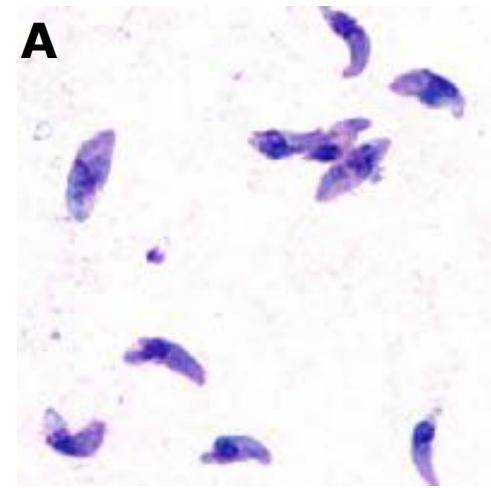
- Osservazione microscopica diretta del parassita nel campione (lavaggio broncoalveolare, biopsia linfonodale, muscolo). Scarsa sensibilità.
- Isolamento del parassita (da organi e tessuti) mediante coltura *in vitro* (cellule umane) ed *in vivo* (topo). Centri di riferimento; diagnosi *post-mortem*; infezione in atto
 - Prova biologica in cavia (topo): inoculazione intraperitoneale di sangue od altri liquidi corporei. Il topo viene valutato per la presenza di *T. gondii* nel liquido peritoneale dopo 6-10 giorni dall'inoculazione; in caso di negatività, esame sierologico (sangue da coda o cuore) dopo 4-6 settimane dall'inoculazione.
- Test di amplificazione molecolare (PCR) (liquido amniotico, tessuto fetale, sangue, liquor). Ottima sensibilità/specificità. Diagnosi *in utero*; immunocompromessi; corioretinite.

INDIRETTA

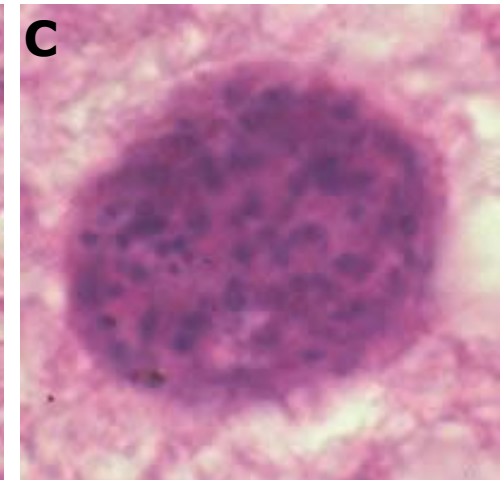
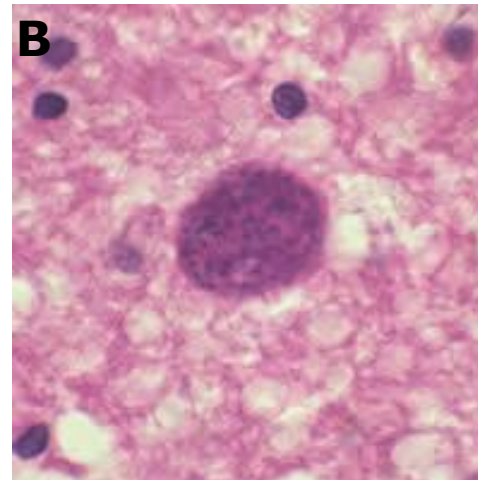
- Sierologica (ricerca di Ab specifici: IgG, IgM, IgA, IgE). Screening preconcezionale/prenatale (IgM, IgA); test di conferma.
 - Diretta ("dye-test" di Sabin-Feldman, agglutinazione diretta) od indiretta (ELISA, agglutinazione al lattice, agglutinazione indiretta, IFA, fissazione del Complemento)
 - IgM, IgA in diagnosi fetale (da funicolocentesi)

Toxoplasmosi: diagnosi – microscopia

A: Giemsa di liquido peritoneale da cavia. Tachizoiti di *T. gondii*, a forma semilunare e dotati di un prominente nucleo in sede centrale.

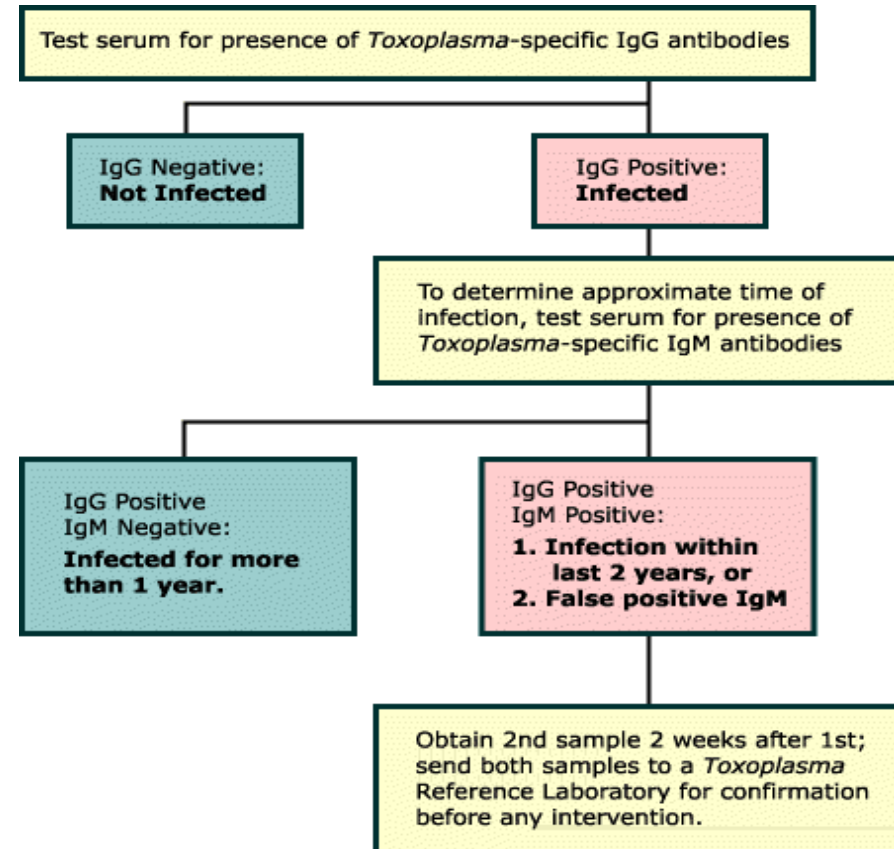


B-C: biopsia cerebrale colorata con ematossilina-eosina. Cisti di *T. gondii* contenente numerosi bradizoiti.



Toxoplasmosi: diagnosi sierologica

- Inattendibile in pts immunodeficienti (AIDS) (diagnosi presuntiva)
 - possibile infezione disseminata in assenza di titolo anticorpale
- Generalmente, IgM e IgG aumentano simultaneamente
 - IgG, persiste per anni
 - IgM, non evidenziabile dopo il trattamento
- Titoli elevati di IgM sono indicativi per una recente infezione in un soggetto immunocompetente
- Negatività per IgG o IgM esclude la diagnosi:
 - entrambe debbono essere + in fase acuta



Toxoplasmosi: terapia

- **Soggetti immunocompetenti (non in gestazione):**
 - non necessaria (forme self-limited entro alcune settimane)
 - a scopo profilattico, per corioretinite in ragazzi.
- **Donne in gestazione o soggetti immunocompromessi:**
 - pirimetamina + sulfamidico
 - spiramicina, in caso di sieroconversione durante la gravidanza
- **Neonati:**
 - trattare immediatamente con pirimetamina per prevenire o ridurre l'insorgenza del quadro clinico

Toxoplasmosi: controllo

L'unica forma di prevenzione primaria è quella **igienico-dietetica**. L'unico vaccino è preparato per gli ovini.

- **Prevenire l'infezione da oocisti eliminate dal gatto:**
 - lavaggio di mani prima del consumo dei pasti
 - lavare la frutta e gli ortaggi prima del consumo
 - prevenire il contatto di mosche e scarafaggi con il cibo
 - disinfettare adeguatamente la lettiera del gatto
 - utilizzare guanti durante il giardinaggio
- **Prevenire l'infezione da carni, uova e latte:**
 - cottura adeguata; non bere latte non pastorizzato
 - non toccare le mucose (bocca, occhi) mentre si maneggia la carne cruda
- **Prevenire l'infezione al feto:**
 - screening per identificare le donne a rischio
 - screening neonatale (ecografia, funicolo- ed amniocentesi)
- **Prevenire l'infezione da trasfusione di sangue o da trapianto d'organo:**
 - non prelevare prodotti ematici da donatori sieropositivi per riceventi sieronegativi