

1 **PERCORSO DIAGNOSTICO DELL' INFEZIONE CONGENITA DA**
2 **TOXOPLASMA GONDII**

3
4 Coordinatore:

5 AMCLI Valeria Meroni Dipartimento di Malattie Infettive

6 Università degli studi di Pavia Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia

7
8 Con la collaborazione di :

9 Paolo Lanzarini Dipartimento di Malattie Infettive Fondazione IRCCS Policlinico San

10 Matteo ; Lina Bollani UO Neonatologia, Patologia neonatale e Terapia intensiva

11 fondazione IRCCS Policlinico San Matteo Pavia ; Brunella Guerra Università degli

12 Studi di Bologna; Alessandra Sensini Università degli Studi di Perugia

13
14
15 **EZIOPATOGENESI ED EPIDEMIOLOGIA**

16
17 La toxoplasmosi è un antroponosi ubiquitaria che interessa circa un terzo della
18 popolazione mondiale. L'agente eziologico è *Toxoplasma gondii* un protozoo parassita
19 intracellulare obbligato .

20 Nel suo ciclo vitale sono presenti tre stadi tutti potenzialmente infettivi per l'uomo.

21 L'ospite definitivo del protozoo, alle nostre latitudini, è il gatto nel cui intestino si

22 compie la riproduzione sessuata che porta alla produzione di oocisti. Le oocisti

23 vengono escrete con le feci durante la fase acuta dell'infezione per circa 21 giorni.

24 Dopo la sporulazione, che avviene dopo 1- 20 giorni, in opportune condizioni di

25 temperatura e di umidità, le oocisti divengono infettanti. Se ingerite dai mammiferi

26 liberano per azione dei succhi gastrici gli sporozoi che si trasformano nell'intestino in

27 tachizoiti. Questi si raggiungono per via ematogena tutti i tessuti dove si replicano

28 molto velocemente causando una forte risposta infiammatoria e le eventuali

29 manifestazioni cliniche della malattia (febbre, astenia, linfadenopatia). Durante la

30 gravidanza i tachizoiti possono essere trasmessi dalla madre al feto. Sotto la pressione

31 del sistema immunitario i tachizoiti si trasformano in bradizoiti e vengono contenuti in

32 cisti tissutali presenti nel sistema nervoso e nella muscolatura scheletrica e cardiaca

33 dell'ospite. I bradizoiti rimangono vitali per tutta la vita dell'ospite, sono

34 morfologicamente identici ai tachizoiti, ma si moltiplicano più lentamente, esprimono

35 molecole diverse e sono diversi funzionalmente. I bradizoiti possono trasformarsi di

36 nuovo in tachizoiti e provocare una riattivazione dell'infezione nei pazienti

37 immunodepressi. Le cisti e le oocisti costituiscono la fonte di infezione alimentare per

38 l'ospite intermedio e definitivo, ma possono essere inattivate dal calore o dal

39 congelamento (-20°C).La toxoplasmosi viene contratta soprattutto attraverso

40 l'ingestione di carne cruda o poco cotta contenente cisti tissutali, oppure attraverso

41 l'ingestione di carne cruda o poco cotta contenente cisti tissutali, oppure attraverso

42 l'ingestione di latte, verdura o terra contaminata da oocisti.

43 Sono stati individuati tre differenti ceppi di toxoplasma : il tipo I, il tipo II , il più

44 diffuso in Europa, ed il tipo III che viene più facilmente isolato dagli animali. In altre

45 aree come il Sud America i ceppi mostrano una maggiore variabilità genetica e sono

46 presenti anche genotipi atipici di solito molto più virulenti. Le manifestazioni cliniche e

47 la gravità della malattia dipendono da diversi fattori alcuni dei quali legati al parassita,

48 come la virulenza del ceppo, la carica infettante, lo stadio vitale, la via di infezione e in

49 altri dipendenti dall'ospite come l'efficienza della risposta immunitaria, l'età, il sesso e
50 fattori genetici.

51 La toxoplasmosi viene contratta soprattutto attraverso l'ingestione di carne cruda o poco
52 cotta contenente cisti tissutali, oppure attraverso l'ingestione di acqua, verdura o terra
53 contaminata da oocisti.

54 Dati di sieroprevalenza indicano che circa il 58 % di donne in età fertile in Europa ,il
55 51-72% in America Latina, il 54-77% in Africa sono positive per anticorpi
56 antitoxoplasma. In Asia, Cina e Corea , così come nei paesi più freddi la
57 sieroprevalenza è nettamente inferiore (4 -39%). In questi ultimi anni si è tuttavia
58 notata una diminuzione della sieroprevalenza legata soprattutto alle mutate abitudini
59 alimentari.

60 Nella maggior parte dei casi l'infezione è asintomatica e risulta quindi molto difficile
61 determinare il momento e la via di contagio. La trasmissione attraverso il latte materno
62 o da uomo a uomo (tranne che nel caso di infezione verticale o da trapianto) non è mai
63 stata documentata.

64

65 INFEZIONE E GRAVIDANZA

66

67 La primoinfezione in gravidanza è di solito asintomatica ed autolimitante e quindi
68 misconosciuta. Il periodo di incubazione dura 4-21 giorni ed in caso di infezione
69 sintomatica in genere i sintomi sono lievi e aspecifici (astenia, febbricola, mialgia e
70 linfadenopatia di solito laterocervicale). Più raramente la toxoplasmosi si accompagna
71 a una sindrome simil-mononucleosica caratterizzata da febbre, mal di gola, cefalea e
72 linfocitosi. L'accurata verifica della presenza di sintomi può essere utile per la datazione
73 dell'infezione.

74 Nel mondo l'incidenza dell'infezione congenita è di 2-3 casi ogni 1000 nati.

75 Di regola il passaggio dell'infezione dalla madre al feto avviene durante una prima
76 infezione in gravidanza. Solo in rari casi è stata descritta l'infezione congenita in nati da
77 madri immunocompetenti con pregressa immunità (reinfezioni con ceppi diversi?) e in
78 corso di riattivazioni in pazienti immunodepresse. L'infezione della placenta durante la
79 parassitemia materna è un prerequisito per la trasmissione al prodotto del concepimento
80 e il fattore più influente è lo sviluppo del circolo placentare, questa è la ragione per cui
81 La percentuale di trasmissione aumenta con il progredire della gravidanza. In caso di
82 infezione materna acquisita in epoca periconcezionale o nelle prime settimane di
83 gestazione, soprattutto se trattate, non si verifica generalmente trasmissione al feto
84 mentre la frequenza di trasmissione è superiore al 60% nelle infezioni acquisite dalla
85 madre nel terzo trimestre.

86 Epoca di trasmissione e gravità della toxoplasmosi congenita sono inversamente
87 correlate. Infezioni congenite contratte precocemente possono indurre gravi danni al
88 feto come ritardo di crescita, morte fetale, aborto o parto pretermine. Al contrario
89 infezioni congenite contratte durante il terzo trimestre sono generalmente asintomatiche
90. La frequenza di infezioni subcliniche è pari all' 85% circa. La diagnosi di infezione
91 acuta nella madre deve essere fatta tempestivamente al fine di somministrare una
92 corretta terapia per cercare di ridurre la frequenza e la gravità della toxoplasmosi
93 congenita. L'efficacia della terapia è, tuttavia, ancora controversa. Alcuni Autori hanno
94 riportato che la terapia con spiramicina riduce il rischio di infezione connatale del 60%.
95 Altri studi hanno, invece, rilevato che la terapia non influenza l'incidenza dell'infezione
96 e studi ancora più recenti hanno sottolineato che, solo se somministrata entro le prime 4

97 settimane dall' infezione materna, la terapia può ridurre il rischio di lesioni cerebrali nel
98 prodotto del concepimento. Non esistono attualmente studi in doppio cieco che
99 dimostrino inconfutabilmente l'efficacia o l'inefficacia della terapia e finché questi
100 dati non saranno acquisiti si raccomanda di iniziare il più presto possibile il trattamento
101 con spiramicina nei primi mesi di gravidanza e di continuarlo fino alla diagnosi
102 prenatale . Se questa risulta negativa la terapia con spiramicina va comunque continuata
103 fino al parto per impedire il rilascio placentare di tachizoiti nel circolo fetale. In caso di
104 esito positivo la terapia d'elezione è costituita dall'associazione pirimetamina-
105 sulfadiazina. Secondo il nostro protocollo questa terapia va consigliata anche in assenza
106 di diagnosi prenatale in tutte le infezioni materne acquisite dopo la ventiduesima
107 settimana di gestazione. La terapia con pirimetamina-sulfadiazina non va somministrata
108 a soggetti con deficit di G6PDH, va associata alla somministrazione di acido folinico e
109 interrotta 15 giorni prima del parto. Bisogna inoltre ricordare che la terapia modifica la
110 cinetica della risposta anticorpale nella gravida.

111

112

113

114

115 MISURE DI PREVENZIONE

116

117 La prevenzione può essere effettuata a tre livelli:

118 **-Prevenzione primaria.** E' volta a evitare l'infezione in gravidanza e si attua attraverso
119 controlli preconcezionali o nelle fasi precoci della gravidanza al fine di individuare le
120 pazienti sieronegative da sottoporre a monitoraggio sierologico e a una corretta
121 profilassi igienico alimentare (Tab 1). A tale proposito va ricordato che in Italia lo
122 screening per la toxoplasmosi non è obbligatorio ma i test per IgG e IgM
123 preconcezionali e il controllo mensile per tutte le gravide non immuni sono esentati dal
124 pagamento del ticket a norma del DPR 245 del 10/09/98.

125 **-Prevenzione secondaria.** Si attua nelle gravide con infezione certa o sospetta per
126 diagnosticare e trattare l'eventuale infezione fetale al fine di ridurre la frequenza e
127 gravità dei danni (monitoraggio ecografico, diagnosi prenatale).

128 **-Prevenzione terziaria.** Consiste nella diagnosi, terapia , follow-up clinico e
129 sierologico del neonato. Un'accurata e tempestiva diagnosi nel neonato infetto è
130 fondamentale perché anche neonati asintomatici possono sviluppare nel corso degli anni
131 sequele tardive soprattutto corioretiniche.

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145
146
147
148
149

Tab. 1

NORME IGIENICO-ALIMENTARI PER LE GESTANTI RECETTIVE ALLA TOXOPLASMOSI

- **Evitate il contatto con il gatto e le sue feci.** Se possedete un gatto adottate le seguenti precauzioni: alimentate l'animale con cibi cotti o in scatola evitando che cerchi cibo fuori casa, affidate ad altri la pulizia della cassetta facendo sostituire frequentemente la lettiera (quotidianamente) e facendo sterilizzare il contenitore con acqua bollente per almeno 5 minuti
- **Non mangiate carni crude o poco cotte o salumi**
- **Lavate accuratamente frutta e verdura prima del consumo** (quando possibile sbucciarla)
- **Lavate sempre le mani dopo aver toccato carni crude, frutta e verdura evitando nel frattempo di portarle a contatto con la mucosa orale o congiuntivale**
- **Pulite accuratamente le superfici della cucina e gli utensili venuti a contatto con carni crude, verdura e frutta non lavate**
- **Evitate il consumo di uova crude e latte non pastorizzato**
- **Usate sempre guanti di gomma in tutte le attività che comportano il contatto con materiali potenzialmente contaminati dalle feci dei gatti** (giardinaggio, orticoltura pulizia della cassetta del gatto ecc)
- **Evitate viaggi in paesi in cui la toxoplasmosi è molto diffusa** (Africa centrale, Sud America, Francia)
- **Eliminate dalle vostre abitazioni eventuali vettori**(mosche, scarafaggi)
- **Evitate il consumo di frutti di mare crudi** (in particolare cozze , capesante , ostriche crude)

150
151
152

153

154

155

156 **DIAGNOSI**

157

158 Poiché l'infezione è asintomatica nella maggior parte delle pazienti la toxoplasmosi può
159 essere diagnosticata indirettamente con metodi sierologici. Già 2 settimane dopo
160 l'infezione è possibile rilevare anticorpi IgG , IgM, IgA, IgE ma esiste una grande
161 variabilità individuale.

162

163 **Screening :test di primo livello Determinazione di IgG e IgM**

164 La determinazione delle IgG e IgM specifiche antitoxoplasma va eseguita possibilmente
165 prima della gravidanza o comunque nelle prime settimane di gestazione. Vengono
166 utilizzati soprattutto metodi in chemiluminescenza o immunoenzimatici e i risultati per
167 le IgG vanno espressi in unità internazionali. Si possono riscontrare quattro possibili
168 quadri sierologici :

169 **IgG negative IgM negative** : assenza di immunità. Si consiglia la profilassi igienico
170 alimentare e il controllo sierologico mensile possibilmente anche un mese dopo il parto
171 per evidenziare anche le infezioni più tardive.

172 **IgG positive IgM negative**: immunità da pregressa infezione. Si consiglia un controllo
173 a distanza di un mese per verificare la stabilità dei titoli anticorpali. La paziente non
174 deve più effettuare controlli né nell'attuale gravidanza né in quelle successive, se non
175 immunodepressa. Nel caso di immunocompromissione il monitoraggio sierologico
176 va effettuato per identificare eventuali riattivazioni quasi sempre associate ad un
177 incremento dei titoli anticorpali IgG

178 **IgG negative IgM positive**: sier conversione in fase iniziale oppure falsa positività per
179 IgM . Si raccomanda di ripetere i test settimanalmente per rilevare la comparsa anticorpi
180 IgG che confermino la sier conversione .È importante che la terapia venga
181 somministrata nelle prime settimane dell' infezione, ma, poiché può modificare la
182 cinetica anticorpale ritardando o addirittura inibendo la produzione di alcune classi
183 immunoglobuliniche (IgG), è consigliabile effettuare una diagnosi più approfondita con
184 test di secondo livello.

185 **IgG positive IgM positive** : poiché le IgM possono persistere per diversi mesi ,
186 bisogna cercare di datare l'inizio dell' infezione per orientare attraverso il counselling la
187 paziente alla diagnosi prenatale, se necessaria, valutare il tipo di intervento terapeutico e
188 tranquillizzarla se l'infezione risulta antecedente al concepimento. Anche in questo caso
189 bisogna ricorrere a test di secondo livello.

190

191 **Test di secondo livello (Immunoblot , IgG avidity test)**

192

193 Come test di secondo livello possiamo considerare l' immunoblotting per IgG e IgM e il
194 test di avidità per le IgG. Il dosaggio di IgA che si effettua di solito con metodi
195 immunoenzimatici può essere considerato un test di conferma dell'infezione in fase
196 acuta, ma presenta anch'esso dei limiti perché anche questi anticorpi possono persistere
197 per diversi mesi e inoltre non sempre vengono prodotti. I test per IgA trovano il loro
198 miglior impiego nelle riattivazioni e nella diagnosi di infezione congenita nel neonato.
199 I test di immunoblotting per la loro elevata sensibilità permettono di rilevare anticorpi
200 IgG specifici prima dei test tradizionali e di evidenziare la specificità antigenica degli

201 anticorpi IgM. Sono molto utili quindi per evidenziare sier conversionsi in fase iniziale
202 anche se la lettura soggettiva richiede personale esperto.

203 Il test di avidità delle IgG, ormai ampiamente utilizzato, permette di escludere
204 un'infezione recente quando il valore dell'indice di avidità risulta alto. L'indice di
205 avidità può essere espresso in percentuale o in valore assoluto. I limiti di bassa,
206 intermedia, e alta avidità variano a seconda del test utilizzato, e sono inoltre influenzati
207 dalla terapia che ne ritarda la maturazione, analogamente a quanto avviene per la
208 produzione delle IgG. Il test di avidità risulta un utile strumento diagnostico se
209 eseguito all'inizio della gravidanza, tenendo presenti le modificazioni legate alla terapia
210 e la persistenza, in alcuni soggetti, di indici di avidità bassi o intermedi.

211

212 **Test di terzo livello (test diretti, PCR , isolamento)**

213

214 Si ricorre alla diagnosi prenatale quando si è di fronte a una sier conversione certa o
215 presunta in gravidanza e si vuole accertare se l'infezione è stata trasmessa al prodotto
216 del concepimento. In caso di positività e in assenza di segni ecografici si effettua un
217 cambiamento dello schema terapeutico. Nel caso di malformazioni fetali se
218 l'accertamento viene eseguito entro i termini previsti dalla legge (di fatto non oltre la
219 22° settimana di gestazione) può essere eseguita un'interruzione volontaria di
220 gravidanza.

221 L'isolamento del protozoo dal liquido amniotico o dal sangue fetale in topo e/o coltura
222 cellulare sono diagnostici di infezione congenita. La necessità di stabulari attrezzati e il
223 lungo tempo di attesa per la risposta insieme alla scarsa sensibilità dei test hanno fatto
224 abbandonare questi esami nella routine diagnostica, anche se vengono ancora utilizzati
225 per la tipizzazione dei ceppi.

226 Attualmente la diagnosi di infezione fetale si effettua mediante Polymerase Chain
227 Reaction (PCR) su liquido amniotico. Il prelievo di sangue fetale è stato abbandonato
228 perché più rischioso (rischio di aborto intorno al 2%) ed eseguibile solo dopo la 20°
229 settimana di gestazione. Poiché sul sangue fetale è possibile effettuare accertamenti
230 ematochimici e la titolazione degli anticorpi specifici, la cordocentesi rimane un test di
231 conferma.

232 La sensibilità della PCR su liquido amniotico risulta influenzata da una serie di
233 parametri come l'appropriatezza del prelievo (che deve essere eseguito non prima di 4 -
234 6 settimane dall'esordio dell'infezione, possibilmente dopo la 18° settimana di
235 gestazione, non deve essere ematico e in quantità non inferiore ai 10 ml), la
236 conservazione, la terapia materna, e la tecnica impiegata. In letteratura alla PCR
237 eseguita con gene target B1 viene attribuita una sensibilità del 64% con un valore
238 predittivo negativo del 87,8%, una specificità e un valore predittivo positivo del
239 100%. La sensibilità varia con l'età gestazionale ed è significativamente più alta per le
240 infezioni contratte tra la 17° e la 21° settimana di gestazione.

241 Attualmente la metodica in real time e l'uso come target di regioni del gene AF 146527,
242 che è ripetuto 300 volte nel genoma di *Toxoplasma gondii*, hanno sicuramente
243 migliorato le performance diagnostiche della PCR. La real time PCR permette inoltre
244 la quantizzazione dei protozoi infettanti, anche se non è stata ancora dimostrata in modo
245 definitivo una correlazione tra il numero di toxoplasmi nel liquido amniotico e la
246 gravità dell'infezione congenita.

247 Questi test vanno eseguiti da laboratori specializzati e si raccomanda l'impiego di
248 controlli di qualità esterni europei.

249

250

251 INFEZIONE CONGENITA

252

253 MANIFESTAZIONI CLINICHE E TERAPIA

254

255 In circa l'85 % dei casi l'infezione congenita è asintomatica alla nascita ma se non
256 trattata può comportare sequele tardive come coroidoretiniti e ritardo di sviluppo. La
257 sintomatologia comprende idrocefalia, microcefalia, calcificazioni intracraniche,
258 coroidoretinite, strabismo, cecità, sordità, epilessia, ritardo psicomotorio. Nei casi più
259 gravi i segni e i sintomi possono essere aspecifici e comuni ad altre infezioni congenite
260 come quelle da CMV, herpes simplex , rosolia e sifilide. In tutti i casi di infezione,
261 anche asintomatica, la terapia di elezione è rappresentata da pirimetamina-sulfadiazina
262 che va continuata per almeno un anno e associata alla somministrazione di acido
263 folinico.

264

265

266 DIAGNOSI

267

268 La diagnosi nel neonato è soprattutto sierologica. Infatti i test diretti come l'isolamento
269 e la PCR su sangue cordonale, periferico, placenta hanno mostrato scarsa sensibilità e
270 inoltre si può evidenziare la presenza del protozoo nella placenta (cisti tissutali) senza
271 che ci sia infezione connatale. L'infezione connatale è certa quando alla nascita sono
272 presenti IgM e/o IgA e/o quando la PCR sul liquido amniotico è risultata positiva. Gli
273 anticorpi di classe IgG vengono trasmessi passivamente dalla madre al feto e gli
274 anticorpi IgM e IgA di sintesi fetale (e quindi diagnostici) non sempre vengono
275 prodotti. In letteratura è riportato che alla nascita , con i test tradizionali , si riesce a fare
276 diagnosi solo nell'85% (95% CI, 71-99%) dei neonati la cui madre non è stata trattata
277 e nel 73,5% (95% CI, 62-82%) dei neonati la cui madre ha effettuato la terapia. Poiché
278 il neonato non infetto perde progressivamente gli anticorpi di origine materna (con un
279 tempo di dimezzamento di circa trenta giorni) si osserva durante il follow-up una
280 continua diminuzione del titolo anticorpale . Durante il follow-up del bambino infetto
281 invece si assiste o alla persistenza o ad un iniziale decremento seguito da un rialzo del
282 sierotitolo dovuti alla produzione di anticorpi neonatali.

283 La diagnosi certa di infezione congenita si basa ancora oggi sulla positività anticorpale
284 all'anno di vita nel neonato non trattato. Infatti sono stati descritti casi di
285 negativizzazione anticorpale transitoria in neonati trattati con pirimetamina sulfadiazina.
286 La necessità di una diagnosi precoce per poter trattare tutti i neonati infetti anche
287 asintomatici al fine di evitare sequele tardive consiglia di utilizzare test estremamente
288 sensibili.

289 Fra i test per IgM i risultati migliori si ottengono con il test IgM ISAGA soprattutto se
290 questo, analogamente ai test immunoenzimatici e all' IgA ISAGA, viene eseguito con
291 una diluizione del siero in esame inferiore a quella dell'adulto.

292 Un grande contributo alla diagnosi precoce della toxoplasmosi congenita è stato dato
293 dall'impiego dei test di immunoblotting per IgG e IgM . Questi test si basano sulla
294 comparazione delle specificità antigeniche degli anticorpi del neonato e quelli materni e
295 vanno eseguiti in parallelo alla nascita sul sangue materno e neonatale. Successivamente
296 la comparazione dei profili immunologici del bambino nei primi mesi di vita (non oltre

297 il terzo mese) permette di evidenziare precocemente anticorpi di sintesi neonatale . Il
298 test deve essere eseguito manualmente da personale esperto ed è piuttosto costoso.
299 Test per la valutazione dell'immunità cellulo-mediata sono appannaggio di pochi centri
300 specializzati.

301 Si raccomanda , comunque, il follow-up di IgG e IgM mensile fino alla completa
302 scomparsa degli anticorpi e un prelievo definitivo a un anno di vita. Ai test sierologici
303 devono essere affiancati test clinici (ecografia transfontanellare, esami ematochimici,
304 esame audiometrico, visita oculistica , EEG, TAC). La terapia del neonato infetto va
305 proseguita per tutto il primo anno di vita anche in assenza di sintomi e in caso di
306 negativizzazione anticorpale. I rebound anticorpali che compaiono spesso al termine
307 della terapia non hanno di solito rilevanza clinica ma vanno segnalati . Il follow-up
308 clinico di tutti i pazienti infetti va continuato fino all'adolescenza almeno.

309

310

311

312

313

314 BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

315

316 -*Toxoplasma gondii* Louis M. Weiss and Kami Kim editors Academic Press London
317 2007

318 -Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis in Remington
319 & Klein editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant 6th edition
320 Philadelphia 2006 Elsevier Saunders pp980-1091

321 -Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis Lancet 2004; 363: 1965-76

322 -Rorman E, Chen Stein Z, Rilkis I, Ben-David H. Congenital toxoplasmosis prenatal
323 aspects of *Toxoplasma gondii* infection Reproductive Toxicology 2006; 21: 458-472

324 -Syrocot Study Group. Individual patients data meta-analysis of prenatal treatment
325 effect for congenital toxoplasmosis. Lancet 2007; 369: 115-121

326 -Bruegelmans M, Naessens A, Foulon W. Prevention of toxoplasmosis during
327 pregnancy- an epidemiologic survey over 22 consecutive years. J Perinat Med. 2004; 32
328 (3): 211-4

329 -Elsheika HM. Congenital Toxoplasmosis: priorities for further health promotion action.
330 Public Health 2008; 122(4): 335-53

331 -Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy : opportunities and pitfalls of
332 serological diagnosis. Clin Microb Infect. 2006; 12(6):504-12

333

334