

Rischi da contaminazione protozoaria

Simone M. Cacciò

Reparto di Malattie Parassitarie Gastroenteriche e Tissutali
Istituto Superiore di Sanità, Roma


Consumo di molluschi bivalvi e rischi correlati
20 Novembre 2012



Struttura di questa relazione

- Introduzione agli organismi
- Cenni tassonomici
- Epidemiologia descrittiva
- L'importanza dell'acqua nella trasmissione
- I parassiti e i molluschi bivalvi
- Aspetti metodologici
- Gli studi e i dati dall'Italia
- Sommario e conclusioni

Di chi stiamo parlando?

- **Protozoi**, quindi organismi eucariotici unicellulari (moltissimi) 
- Protozoi che possono ritrovarsi **nei molluschi bivalvi** (pochi)

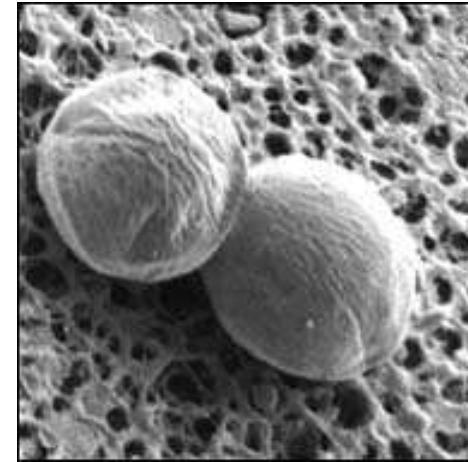
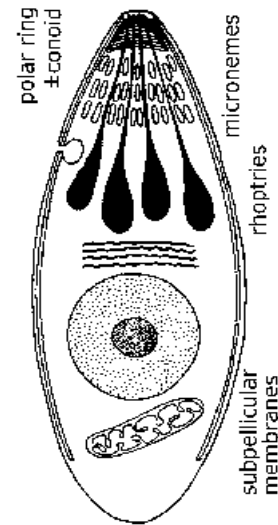


Cryptosporidium
Giardia
(Toxoplasma)

Cryptosporidium

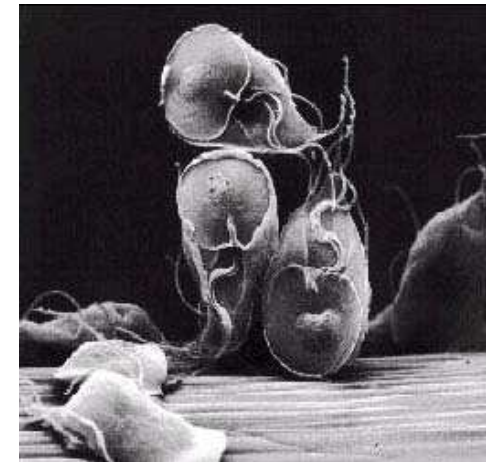
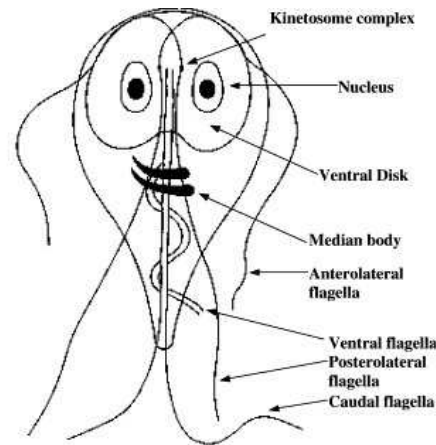
Toxoplasma

Apicomplexa
intracellulare
fase sessuata

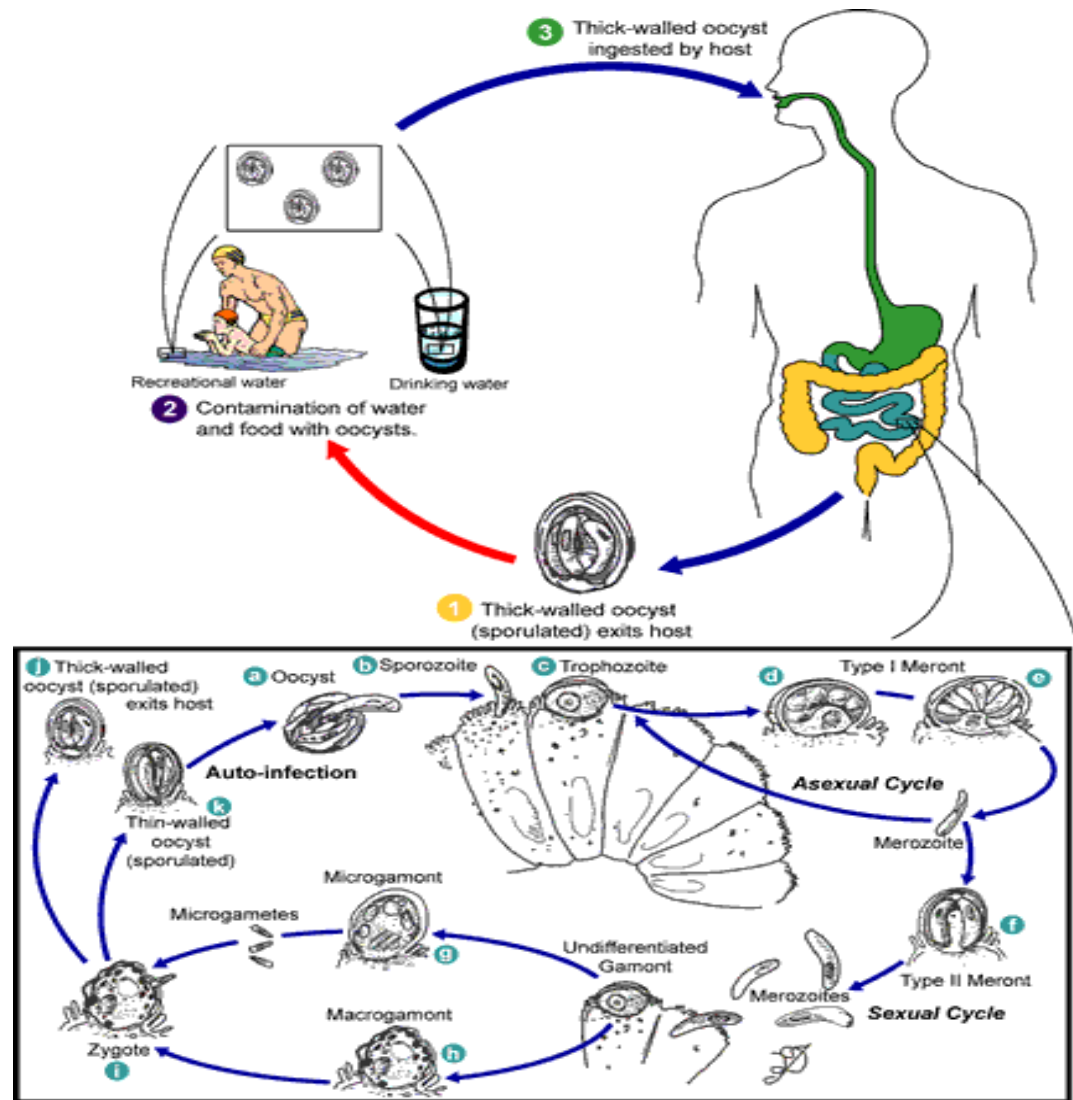


Giardia

Flagellato
extracellulare
fase sessuata?

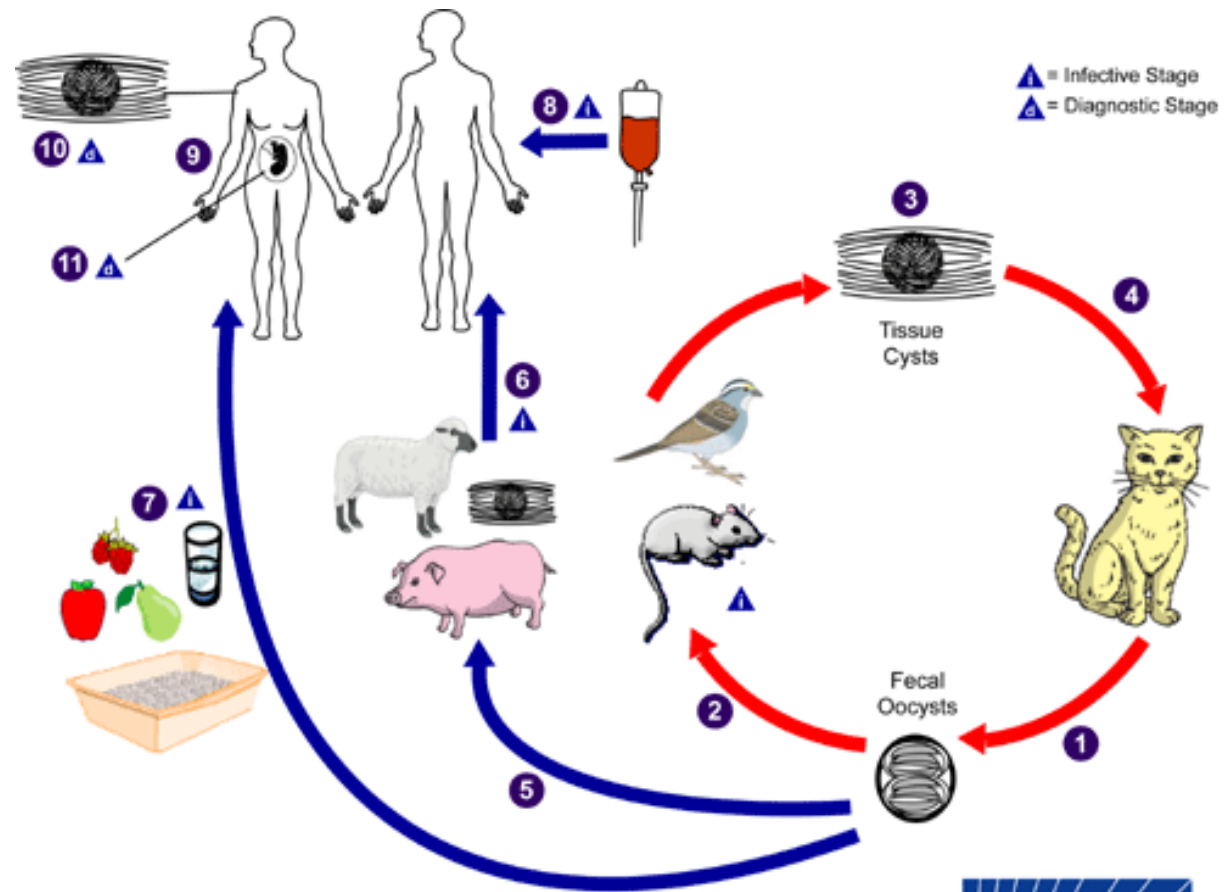


Ciclo vitale di *Cryptosporidium*

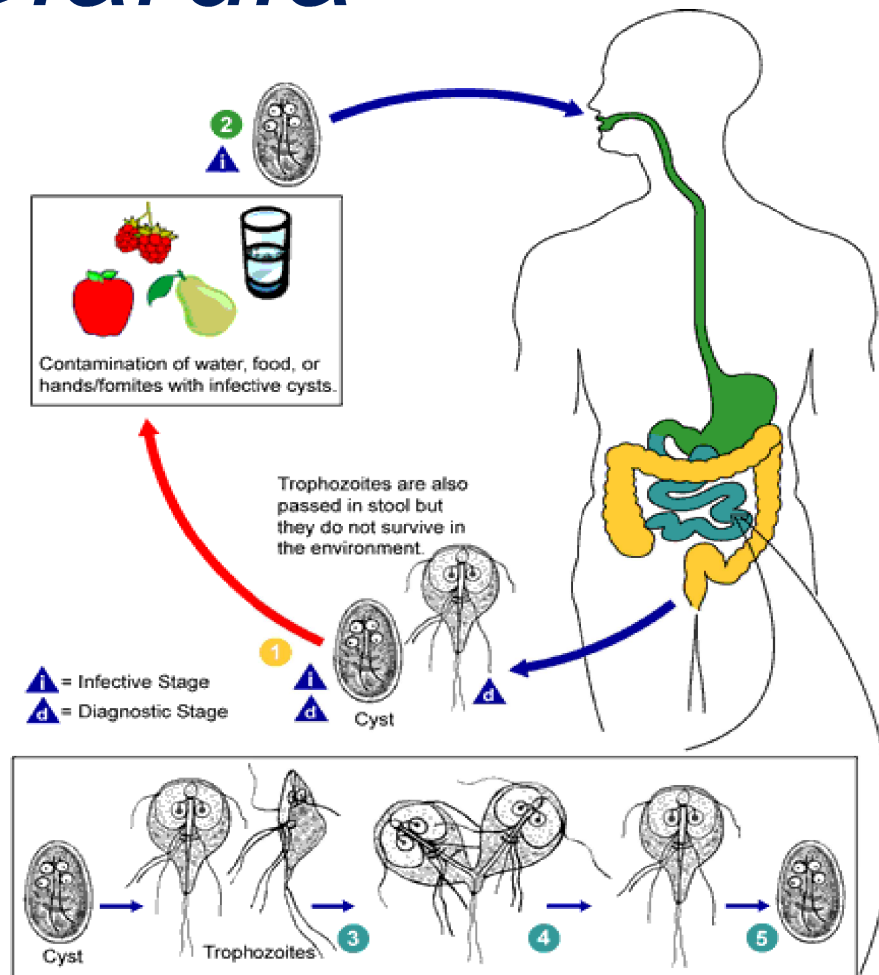


Source: CDC

Ciclo vitale di *Toxoplasma gondii*



Ciclo vitale di *Giardia*



Fonte: CDC

Tassonomia di *Cryptosporidium*

- In generale la tassonomia dei protozoi sta subendo importanti revisioni, soprattutto alla luce dei dati genetici accumulati negli ultimi anni.
- Non fa eccezione *Cryptosporidium*, un genere che comprende attualmente
- **22 specie considerate valide**
- **60 “genotipi” il cui stato tassonomico è ancora incerto**

Patogeni umani

Specie comuni

- *C. hominis*

- *C. parvum*

- *C. meleagridis*

- *C. canis*

- *C. felis*



90% dei casi umani attribuibili a queste 2 specie

Il bovino è il più importante serbatoio di ceppi con **potenziale zoonotico**

Specie rare

- *C. suis*

- *C. muris*

- *C. andersoni*



Tassonomia di *Giardia*

Specie Ospite

- *G. agilis* Anfibi
- *G. ardeae* Uccelli
- *G. psittaci* Uccelli
- *G. muris* Roditori
- *G. microti* Roditori
- *G. duodenalis* Mammiferi (uomo incluso)
(*G. lamblia*, *G. intestinalis*)

Giardia duodenalis

- Gruppi genetici (assemblaggi) Ospite
- **Assemblaggio A** Uomo, altri primati, animali da reddito, cane, gatto, animali selvatici
- **Assemblaggio B** Uomo, altri primati, animali da reddito, cane, cavallo, roditori selvatici
- Assemblaggi C, D cane, gatto, carnivori selvatici
- Assemblaggio E animali da reddito
- Assemblaggio F gatto
- Assemblaggio G ratto
- Assemblaggio H mammiferi marini

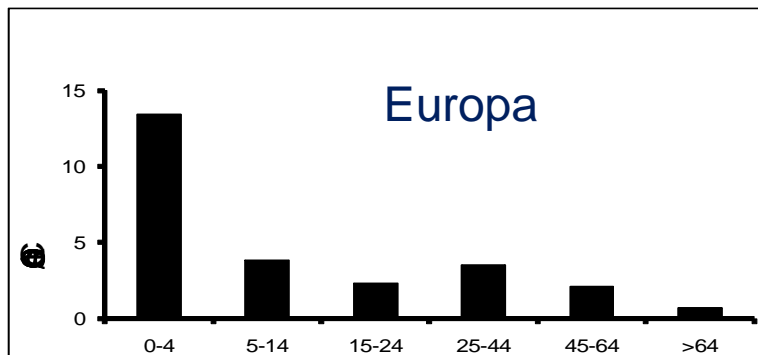
Proprietà che influenzano l'epidemiologia

- Oocisti e cisti di piccole dimensioni (5-15 μm), con elevata capacità di sopravvivenza nell'ambiente
- Immediatamente infettive (eccetto *Toxoplasma*)
- Distribuzione globale
- Trasmissione diretta ed indiretta
- Ampio serbatoio animale
- Bassa dose infettiva (circa 10 cisti / oocisti)
- Enorme capacità di moltiplicazione nell'ospite

Epidemiologia descrittiva-1



Distribuzione globale di queste infezioni, con prevalenze molto elevate nei paesi in via di sviluppo. Sia la criptosporidiosi che la giardiasi sono incluse tra le malattie neglette legate alla povertà



Distribuzione dei casi per classi di età mostra che la maggior parte delle infezioni **colpisce i bambini**

Epidemiologia descrittiva-2



Per entrambi i parassiti, numerosi ospiti animali possono svolgere una funzione di serbatoio, quindi esiste **trasmissione zoonotica**. Di particolare rilievo sono gli **animali da reddito** (specie quelli giovani)



La **trasmissione idrica** è estremamente importante per questi parassiti. Vedremo più avanti in dettaglio questo aspetto

Epidemiologia descrittiva-3



Diversi studi caso-controllo hanno permesso di identificare i principali **fattori di rischio**:

- Contatti con l'acqua
- Contatti con persone infette
- Stato immunitario del soggetto
- Viaggi all'estero

L'importanza dell'acqua

- Se si considera l'elevata prevalenza dell'infezione, l'ampio numero di specie suscettibili, ed il fatto che un singolo animale infetto può emettere con le feci fino a **miliardi di cisti / oocisti al giorno**, non è difficile comprendere come la **contaminazione** dell'ambiente da parte di questi parassiti è **inevitabile e coinvolge tutto il mondo**.

Epidemie legate al consumo di acqua

- La (famosa) epidemia di Milwaukee (USA) nel 2003 coinvolse praticamente tutta la comunità (**>400,000 persone infettate!!**) e fece conoscere *Cryptosporidium* in tutto il mondo.
- Dal 2007 ad oggi, almeno **325** epidemie di infezioni gastrointestinali associate all'acqua e causate da protozoi parassiti sono state registrate, di cui il 93% è stato registrato in Europa e in Nord-America
- *Cryptosporidium* e *Giardia* sono responsabili **della quasi totalità** di queste epidemie (50.8% e 40.6%, rispettivamente).



Le cisti e le oocisti sono state ritrovate
nelle acque reflue nelle acque di superficie
nelle acque di falda nelle acque di sorgente
nelle acque potabili nelle acque usate a scopo ricreazionale
e..... nell'ambiente marino

·In sintesi, *Cryptosporidium* e *Giardia* sono ovunque



Specie di *Cryptosporidium* in campioni di acqua

Acque di superficie

- *C. parvum* (70)
- *C. andersoni* (63)
- Genotipo cervo (61)
- *C. hominis* (51)
- Genotipo topo muschiato (47)
- *C. muris* (14)
- *C. baileyi* (12)

Acque reflue

- *C. andersoni* (31)
- *C. muris* (6)
- Genotipo cervo (6)
- *C. felis* (1)
- *C. canis* (1)

Acque reflue urbane

- *C. parvum*
- *C. hominis*

Giardia in campioni di acqua

Acque reflue

- *G. duodenalis* ass. A
 - *G. duodenalis* ass. B
- (Italia, USA, Norvegia)

Acque superficiali

- *G. duodenalis* ass. A
 - *G. duodenalis* ass. B
- (acqua di lago, Italia)
- (acqua di fiume, Finlandia)

Acque di scarto ai macelli

- *G. duodenalis* ass. A
 - *G. duodenalis* ass. E
- (92%)
- (Francia)

Acque reflue riutilizzabili

- *G. duodenalis* ass. A
- (USA)

E in Italia?

- Le **acque di superficie** risultano essere molto spesso **contaminate** da *Cryptosporidium* e *Giardia*, di norma a concentrazioni basse ma con picchi elevati per *Giardia* (fino a 465 cisti per litro)
- Le **acque reflue** risultano essere molto più spesso **contaminate e con concentrazioni più elevate**.
Diversi studi sono stati eseguiti su impianti di depurazione, anche per valutare l'efficienza di rimozione delle cisti e oocisti in impianti che utilizzano diverse tecnologie
- Le **acque potabili** e quelle **ricreazionali** sono risultate **libere** da parassiti

E in Italia?

Studio di **acque reflue** prelevate agli impianti di trattamento (ingresso, fasi intermedie, uscita) di Bergamo, Napoli, Cagliari e Palermo

Tutti i campioni sono risultati positivi per cisti di *Giardia*, con concentrazioni comprese tra 2000 e 40.000 cisti / litro, mentre *Cryptosporidium* è stato riscontrato più raramente

Gli **assemblaggi A e B** erano presenti in ogni località

Stagionalità: picco in autunno / inverno in ciascuna località

Numeri non trascurabili di cisti si ritrovano negli **effluenti**

I parassiti nei molluschi bivalvi

- Le ricerche in questo ambito furono iniziate negli **USA** verso la fine degli anni '90. Due principali ragioni motivarono tali studi:
- 1) il ruolo dell'acqua nella trasmissione dei parassiti all'uomo. Una naturale estensione fu quindi di verificare l'eventuale **ruolo degli organismi marini filtratori**
- 2) la possibilità di utilizzare i **molluschi come bio-indicatori** della contaminazione delle risorse idriche

Chesapeake Bay



“Collectively, these findings establish that bivalve molluscs can effectively remove and retain oocysts of *Cryptosporidium* from feces contaminated estuarine waters”

I parassiti nei molluschi bivalvi

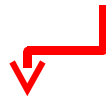
- I risultati **più salienti** dei lavori svolti negli USA e altrove:
- 1) la dimostrazione che sia sperimentalmente sia in un contesto naturale, diverse specie di molluschi sono in grado di **concentrare** *Cryptosporidium* e *Giardia* nei loro tessuti
- 2) la dimostrazione che le oocisti di *Cryptosporidium* mantengono la loro **infettività**, mentre le cisti di *Giardia* sembrano essere almeno in parte inattivate
- 3) la dimostrazione dell'influenza di **fattori ambientali** (piovosità, temperatura dell'acqua) sulla presenza e sulla quantità relativa di oocisti e di cisti reperibili nei molluschi

Aspetti metodologici

- Una metodologia “standard” non è attualmente disponibile. Va ricordato che la maggior parte degli studi ha cercato di adattare, o ha semplicemente utilizzato, quelle metodiche sviluppate per la ricerca dei parassiti nelle acque e nelle feci.
- Inoltre, la scelta di una particolare metodica è funzione del risultato desiderato: si vuole solo
- **EVIDENZIARE** la presenza del parassita, o si vuole anche **IDENTIFICARE** la specie o il genotipo, o ancora **VALUTARE** la vitalità o l'infettività
- Vediamo quali sono le procedure necessarie ad arrivare a questi diversi risultati

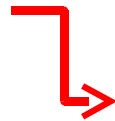
Panoramica del metodo

- Raccolta del campione
- Scelta del tessuto da analizzare
- Fase di concentrazione
- Fase di purificazione dei parassiti



Analisi microscopica

Colorazione e microscopia
Immunofluorescenza
Saggi di vitalità / infettività



Analisi molecolare

Estrazione del DNA
Amplificazione per PCR
Analisi e identificazione

Concentrazione dei parassiti-1

- A partire da **emolinfa** e/o da **tessuti omogeneizzati**

A) Centrifugazione

B) Filtrazione attraverso un setaccio (per i tessuti)

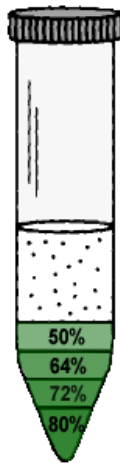
C) Concentrazione su gradiente di sale o di saccarosio

D) Concentrazione per cattura immuno-magnetica

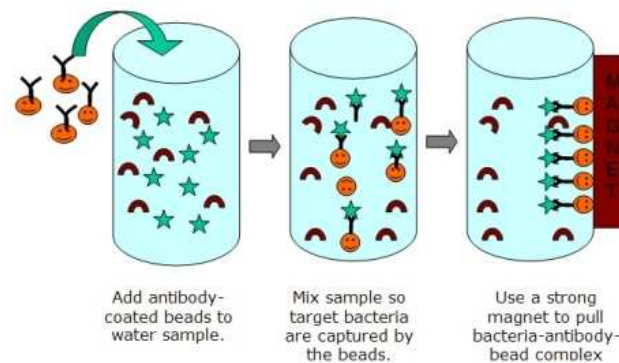
B



C



D



Concentrazione dei parassiti-2

- Una possibile alternativa, anche in virtù della sua semplicità, è rappresentata dall'utilizzo della **PEPSINA** (20 ml di HCl 1M, 80 ml di acqua e 1 grammo di pepsina) per la digestione di 3 grammi di tessuto (da pool di molluschi)
 - Questa digestione enzimatica è simile a quella che viene utilizzata per il recupero delle **larve di *Trichinella*** dai muscoli di animali da reddito (maiali) dopo la macellazione.
 - Sperimentalmente, l'efficienza di recupero a partire da cozze e ostriche inficiate con oocisti e cisti è piuttosto buona (**70-80%**).
 - I risultati ottenuti dimostrano che la digestione con pepsina non interferisce negativamente con le successive fasi di analisi (IMS, microscopia) e comporta una diminuzione della vitalità di circa il 20% dopo un'ora di trattamento.
-
- Robertson e Gjerde, Journal of Food Protection, 2008, 71, 959

Concentrazione dei parassiti-3

Esistono pareri (e risultati) discordanti sull'utilizzo della separazione immunomagnetica:

- Alcuni autori sostengono che tale metodica, seguita da una analisi microscopica, rappresenti il metodo più sensibile
- Altri invece riportano una scarsa efficienza del metodo su alcune specie (cozze) ma non su altre (ostriche) forse in ragione della diversa composizione dei tessuti
- Altri infine sostengono che il metodo sia del tutto inefficace per l'analisi di campioni di tessuti di ostrica

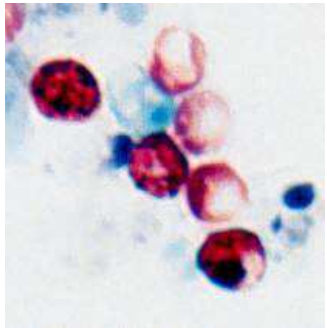
Analisi microscopica

- La maggior parte degli studi punta al **riconoscimento morfologico** dei parassiti dopo la fase di concentrazione.
- Possiamo distinguere due metodiche, una basata sulla **colorazione con reagenti specifici e una basata sull'uso di anticorpi specifici**. In entrambi i casi, il campione da analizzare viene depositato su un vetrino ed esaminato al microscopio.
- Va ricordato che le dimensioni delle oocisti/cisti sono molto ridotte (5-10 μm), quindi bisogna disporre di un buon microscopio per lavorare a ingrandimenti di 40x e 100x, per aumentare l'affidabilità del risultato osservando specifiche caratteristiche morfologiche.

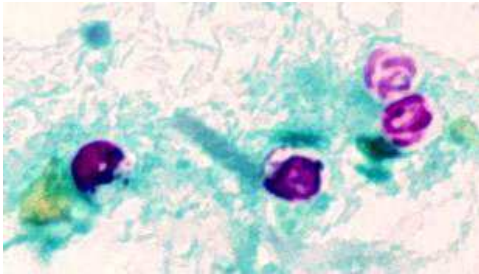
Tecniche di colorazione

- Esistono diverse tecniche di colorazione che possono essere utilizzate per mettere in evidenza le oocisti e le cisti.

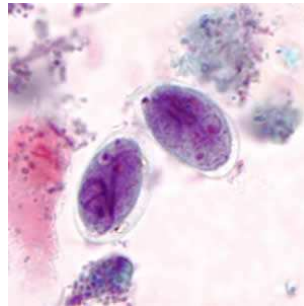
Oocisti di *Cryptosporidium*



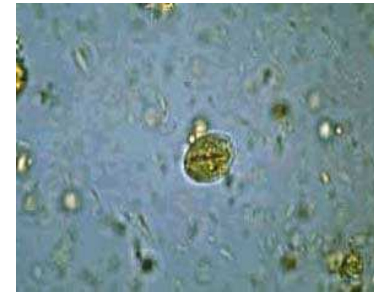
Colorazione acida



Cisti di *Giardia*



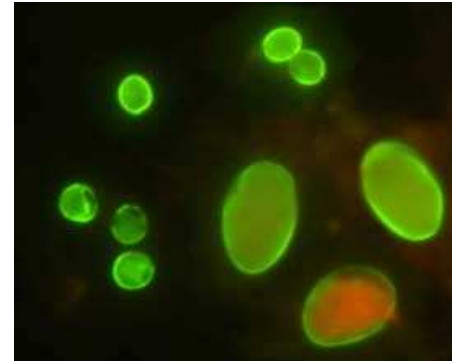
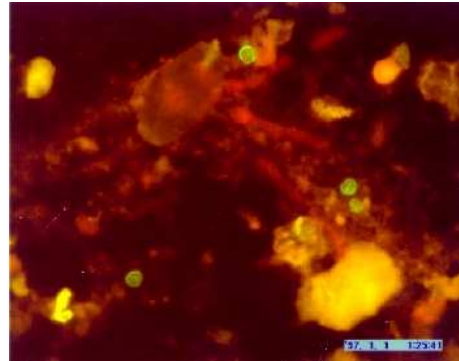
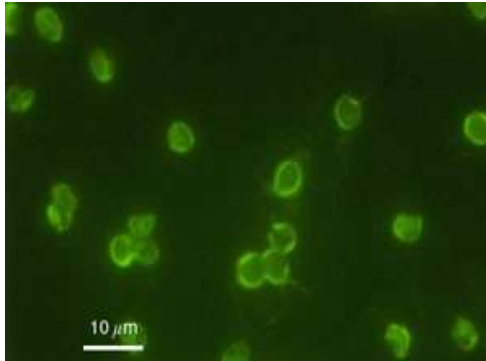
Tricromica



Lugol

- Va ricordato che queste tecniche **non** consentono di riconoscere le diverse specie di parassita, poiché queste non presentano importanti variazioni morfologiche

Tecniche immunologiche e microscopia a fluorescenza



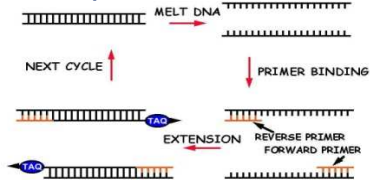

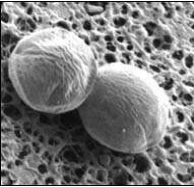
- Questa metodica offre **maggiore sensibilità e specificità** rispetto alle tecniche classiche di colorazione, in quanto sfrutta la reazione specifica **di anticorpi monoclonali** diretti contro epitopi della parete della cisti e della oocisti.
- La presenza di altri organismi autofluorescenti (es., alghe) e di “sporcizia” può mascherare i parassiti e rendere la loro messa in evidenza difficile
- **L'identificazione delle specie non è possibile** con questa metodica

Il problema della infettività

- Il semplice reperimento microscopico delle oocisti e cisti in una data matrice non può darci informazioni sulla vitalità/infettività dei parassiti.
- Rispondere a questa domanda non è affatto semplice. Possiamo sfruttare risultati ottenibili attraverso **metodi indiretti** (uso di coloranti vitali, **FISH**) che mirano a dimostrare l'integrità della cisti/oocisti o la capacità di rispondere a stimoli (**rt-PCR**).
- Più di rado sono stati utilizzate **metodi diretti** (infezioni sperimentali in modello murino o su colture cellulari)

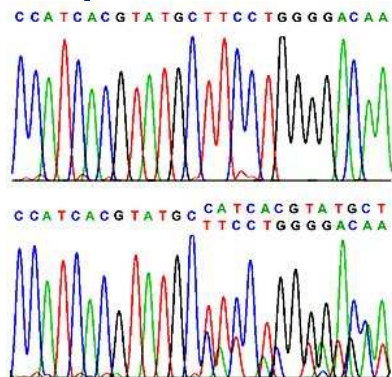
Analisi molecolare

- Le metodiche sfruttano l'amplificazione in vitro (**PCR**) del DNA (o del RNA) e l'**analisi dei prodotti** di amplificazione secondo varie piattaforme permette di **identificare** con ragionevole certezza la **specie** (o il **genotipo**) del parassita presente nel campione in esame.
- Esistono tuttavia dei limiti alla loro applicabilità, che nel caso specifico includono la **difficoltà nell'estrazione degli acidi nucleici** (gli organismi sono molto resistenti alla lisi) e la **presenza di inibitori** (specie da campioni fecali) che pregiudicano l'amplificabilità o ne diminuiscono la resa.

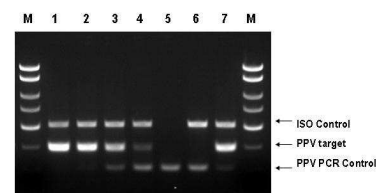


Metodologie di analisi

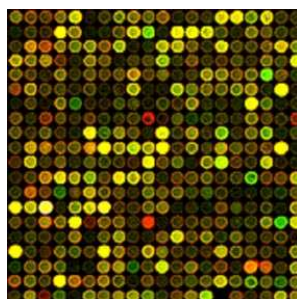
Sequenziamento



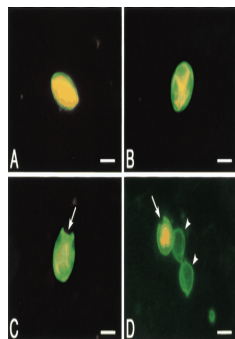
rt-PCR



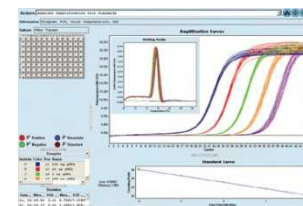
Micro-array



FISH



Real-time PCR



Cosa è stato fatto ad oggi in Europa



Le specie esaminate

- **Mytiloida**

- *Mytilus edulis* (Irlanda, Francia)
- *Mytilus galloprovincialis* (Spagna, Italia)

- **Veneroida**

- *Ruditapes philippinarum* (Italia)
- *Ruditapes decussatus* (Spagna, Italia)
- *Venerupis pullastra* (Spagna)
- *Venerupis rhomboideus* (Spagna)
- *Cerastoderma edule* (Spagna)
- *Chamelea gallina* (Italia)
- *Venus verrucosa* (Spagna)
- *Dosinia exoleta* (Spagna)

- **Ostreoida**

- *Ostrea edulis* (Gran Bretagna) *Ostrica*
- *Crassostrea gigas* (Olanda, Italia)
- *Perna canaliculus* (Spagna)



La situazione in Italia

- Impianti di mitilicoltura sono presenti in 11 regioni italiane ma la maggior parte della produzione si concentra in poche regioni. In ordine decrescente, Puglia, Veneto, Emilia Romagna, Friuli e Sardegna coprono l'80 % della produzione nazionale.
- Nelle prossime diapositive, ho riassunto gli studi effettuati nel nostro Paese e indirizzati all'analisi di molluschi bivalvi per dimostrare la presenza di *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Toxoplasma*

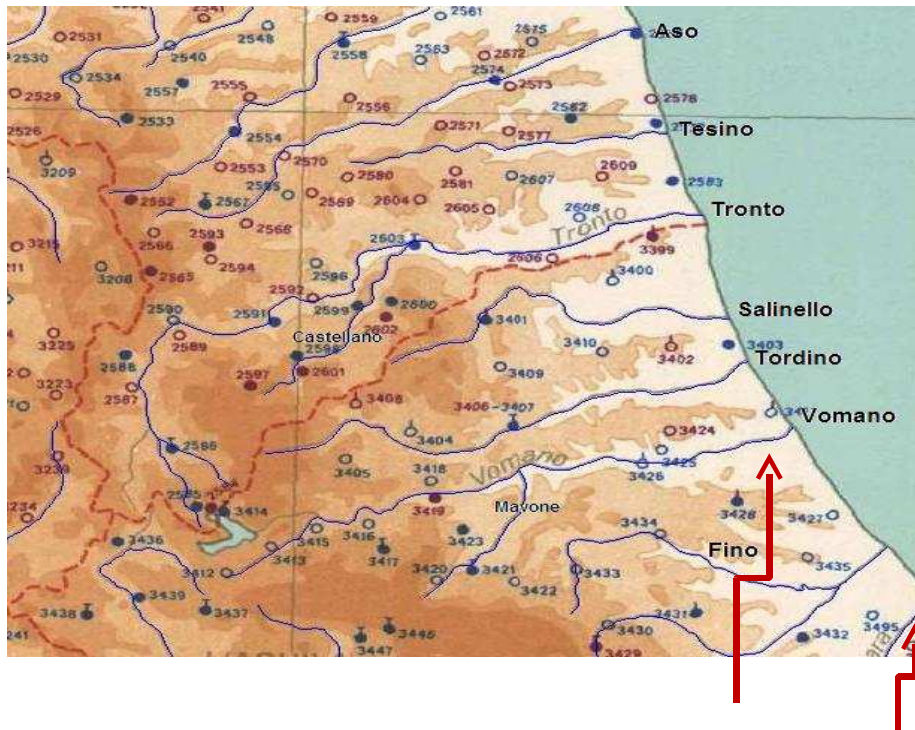
Cryptosporidium in *Chamelea gallina*

- Nel 2003, un totale di **480 vongole** furono raccolte in prossimità delle foci di 4 fiumi abruzzesi (Tronto, Vibrata, Tordino e Vomano). Le analisi furono condotte su aspirati di emolinfa (circa 100 μ l per vongola) e a partire da pool di 30 vongole per ogni sito. Dopo **concentrazione** su gradiente di saccarosio, il **DNA** fu estratto e sottoposto a **PCR** per l'amplificazione di un gene specifico di *Cryptosporidium*.



Cryptosporidium in *Chamelea gallina*

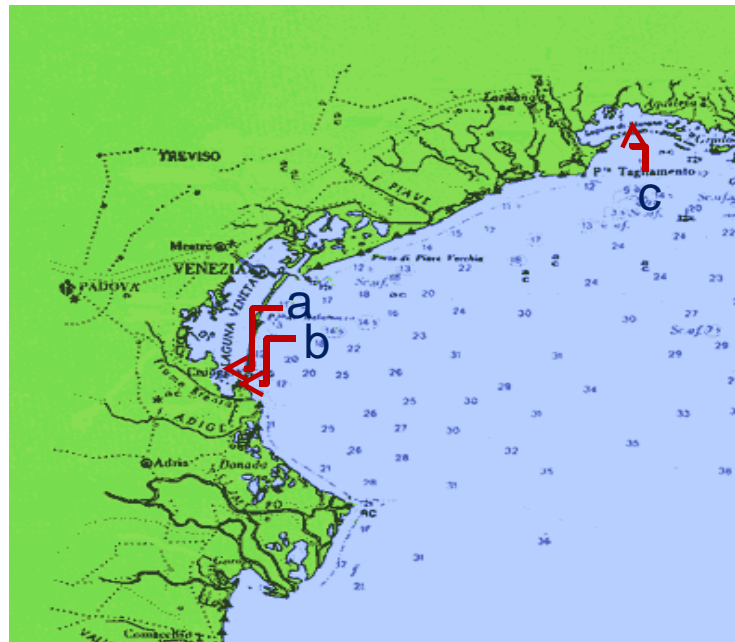
- Dei 16 pools analizzati, solo 2 furono positivi (pools dai fiumi Vibrata e Vomano) e l'analisi di sequenza dimostrò che in entrambi i casi la specie presente era **C. parvum**.



Cryptosporidium in *Ruditapes philipparum* nelle lagune di Chioggia e di Marano

- Nel 2004 dalle lagune di Chioggia (2 siti) e di Marano furono raccolte 60 vongole per sito e per mese (totale di 2160). Dopo essere state misurate e pesate, da ogni vongola fu prelevata l'emolinfa (100 µl) e per convenienza furono analizzati pools di emolinfa da 60 esemplari.

Acque di categoria B



- Dopo **concentrazione** su gradiente di saccarosio, il **DNA** fu estratto e utilizzato per amplificare un frammento specifico del parassita in **PCR**.

Cryptosporidium in *Ruditapes philipparum*

	Chioggia sito a	Chioggia sito b	Marano
Gennaio	-	-	-
Febbraio	-	<i>C. hominis</i>	-
Marzo	-	-	-
Aprile	-	-	-
Maggio	-	-	-
Giugno	-	<i>C. parvum</i>	-
Luglio	-	-	-
Agosto	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	-
Settembre	-	<i>C. parvum</i>	-
Ottobre	-	<i>C. parvum</i>	-
Novembre	-	-	-
Dicembre	-	-	-

Contaminazione sia da *C. parvum* che da *C. hominis*
Maggior contaminazione nel sito B (Chioggia)
Evidenza di una stagionalità

La laguna di Varano: *Giardia* e *Cryptosporidium*

- Uno studio recente ha preso in esame la laguna di Varano (Puglia) allo scopo di verificare la presenza di *Giardia* e di *Cryptosporidium* sia nelle acque che in campioni di *Ruditapes decussatus* e *Mytilus galloprovincialis* provenienti da allevamenti nella laguna stessa.



- I campioni di acqua corrispondevano agli effluenti degli impianti di depurazione delle località Cagnano Varano e Carpino (siti 1 e 3), e alle acque in entrata nella laguna alla estremità dei canali (siti 2 e 4). Furono effettuati prelievi mensili (20 l per gli effluenti e 10 l per le acque di canale) su un periodo di 12 mesi.

La laguna di Varano

- In parallelo, 60 campioni di vongole e di cozze furono raccolti mensilmente (per un totale di 1385 campioni). L'emolinfa (100 µl) fu prelevata da 30 campioni di ciascuna specie e per ciascuna raccolta, riunita e utilizzata per le analisi successive.
- I **campioni di acqua** furono saggiati per la presenza dei parassiti mediante microscopia a fluorescenza e PCR.

ma	Giardia			Cryptosporidium		
	IF pos Assemblaggi	Cisti per litro		IF pos	Oocisti per litro	Specie
Sito 1	9/11	99 ± 150	A / B	4/11	7 ± 10	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Sito 2	7/11	2850 ± 4650	A / B	7/11	585 ± 1745	<i>C. parvum</i>
Sito 3	7/10	38 ± 52	A / B	1/10	3 ± 8	-
Sito 4	0/10	-	-	1/10	10 ± 32	<i>Cryptosporidium</i> spp.

- **Tutti** i campioni di emolinfa (sia dalle vongole che dalle cozze), saggiati come le acque, risultarono **negativi**.

La laguna di Varano: *Toxoplasma gondii*

Uno studio ancora più recente ha nuovamente preso in esame la laguna di Varano allo scopo di verificare la presenza di *Toxoplasma gondii* in

- 109 campioni di *Crassostrea gigas* (6 pools)
- 660 campioni di *Mytilus galloprovincialis* (22 pools)
- 804 campioni di *Tapes decussatus* (28 pools)
- 161 campioni di *Tapes philippinarum* (6 pools)



La laguna di Varano: *Toxoplasma*

- Furono analizzati l'emolinfa, le branchie e le ghiandole digestive. I pools di emolinfa furono prima processati su gradiente di saccarosio. Il DNA venne estratto dai 3 diversi materiali, ed utilizzato sia per una nested PCR che per esperimenti di PCR in tempo reale (o **PCR quantitativa**).
- Un campione di *Tapes decussatus* (pool di emolinfa) e uno di *Crassostrea gigas* (pool di branchie) risultarono **positivi** per *Toxoplasma gondii* negli esperimenti di PCR quantitativa
- In conclusione, esiste la possibilità che oocisti di *Toxoplasma* siano accumulate nei molluschi, e quindi che, almeno in linea di principio, il consumo di molluschi crudi possa essere fonte di infezione nell'uomo. Questo è di particolare rilievo per i soggetti immunocompromessi e per le donne in gravidanza, vista la pericolosità della toxoplasmosi per tali soggetti particolarmente a rischio.

Trasmissione all'uomo

- Nonostante le evidenze della presenza di cisti e oocisti raccolte dagli studi condotti su diverse specie di molluschi, ad oggi **non esistono prove convincenti** di infezioni umane causate dal consumo di tali molluschi.

Perché?

- Anzitutto va ricordato che la **comparsa dei sintomi** dell'infezione **avviene dopo diversi giorni** (1-2 settimane) dall'esposizione, e quindi è difficile che il soggetto **associ i sintomi al consumo di molluschi**.
- In secondo luogo, e per la stessa ragione, è quasi impossibile **disporre di molluschi non consumati** utili a dimostrare la presenza **dell'agente eziologico** e a stabilire un legame epidemiologico.
- La **scarsa conoscenza del rischio** (sia nella popolazione che tra i medici) fa sì che raramente si consideri la possibilità di contrarre tali infezioni attraverso gli alimenti.

Conclusioni

- Abbiamo visto come diverse specie di molluschi abbiano la capacità di **concentrare** cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* e di *Toxoplasma*.
- Sappiamo anche che le oocisti **mantengono la loro infettività** anche a distanza di tempo (dubbio per *Giardia*)
- Abbiamo anche visto che una **metodica standard non** è ancora **disponibile**, ma che diverse tecniche sono utili a caratterizzare, anche a livello molecolare, i parassiti presenti nei molluschi.
- **L'assenza di epidemie** legate al consumo dei molluschi **non** deve farci pensare che questa via di trasmissione sia trascurabile o irrilevante

Grazie della
vostra
attenzione!

