Sorveglianza dei protozoi emergenti nell'acqua

17 settembre 2021

Protozoi water-borne:
il ruolo del laboratorio di microbiologia clinica nella diagnosi e nella sorveglianza
Parte II: *Cryptosporidium ssp*

Raffaele Gargiulo
Laboratorio Provinciale di Microbiologia Clinica
Azienda USL Modena

Inquadramento tassonomico

Cryptosporidium spp è un protozoo, cioè un organismo unicellulare, che infetta le cellule dell'intestino tenue di diversi ospiti vertebrati compreso l'uomo

Phylum Apicomplexa

Classe Coccidea

Ordine Eimeriida

Famiglia Cryptosporidiidae

Genere Cryptosporidium

Specie ***C. hominis, C. parvum***

C. andersoni, C. canis, C. felis, C. meleagridis, ...

Ernest Edward Tyzzer 1875 - 1965

Tyzzer EE. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1907;5(1):12-13.

Primi casi umani diagnosticati mediante biopsia nel 1976

Aumento dei casi con l'epidemia di AIDS

Morfologia I
Forma infettante

Oocisti

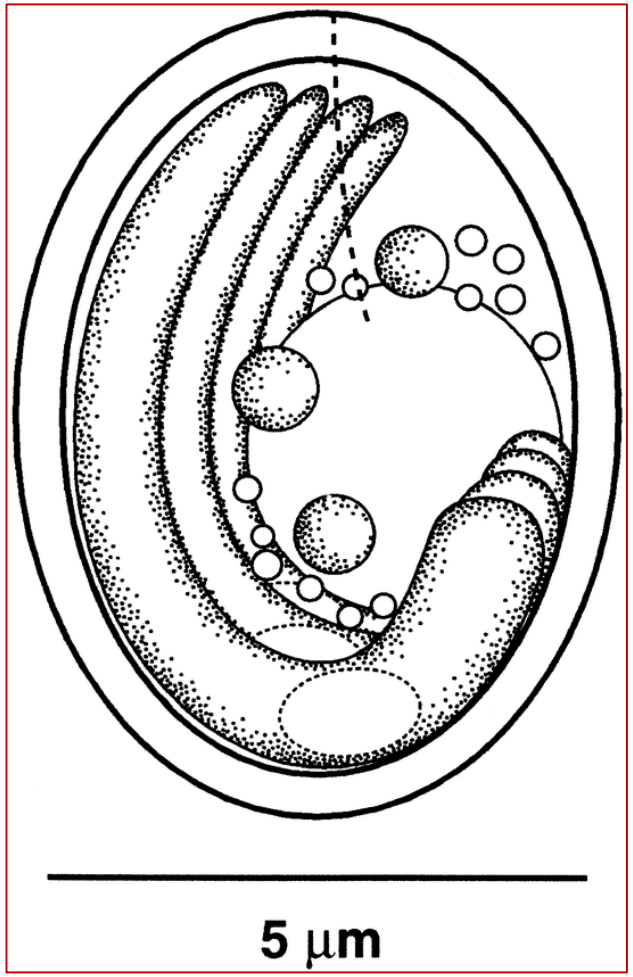
Forma sferica di 4-5 um di diametro

Le oocisti mature contengono 4 sporozoiti

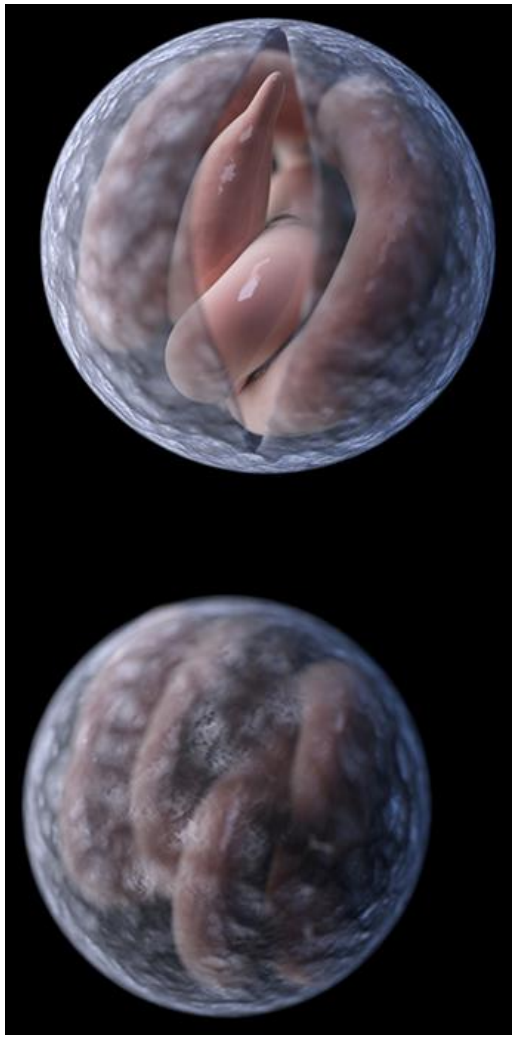
Ci sono due tipi di oocisti:

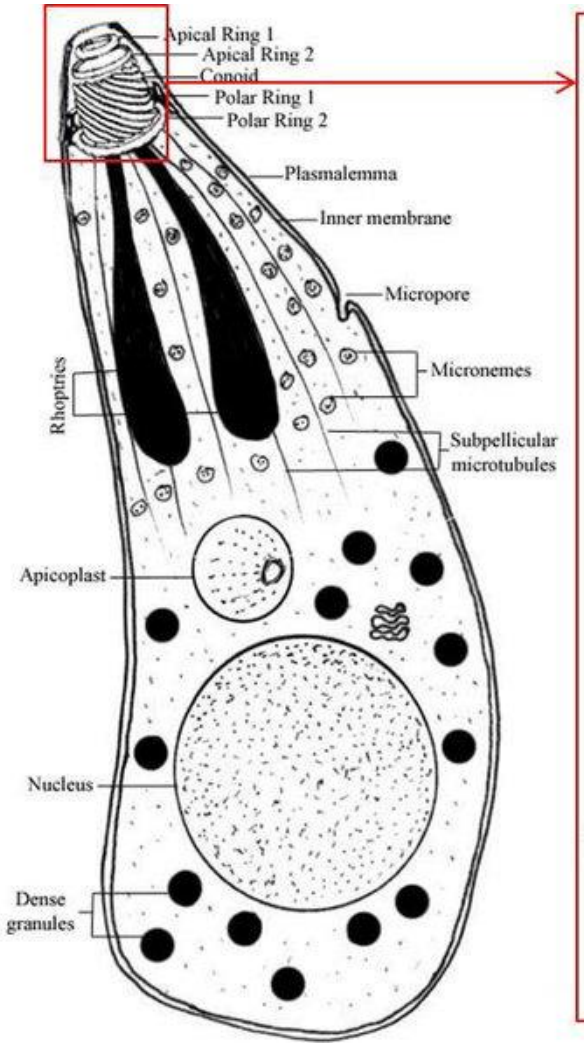
1) **con parete sottile** si aprono direttamente nell'intestino dell'ospite inducendo una reinfezione

2) **con parete spessa**, sono forme di resistenza nell'ambiente esterno, consentono la diffusione da un individuo ad un altro

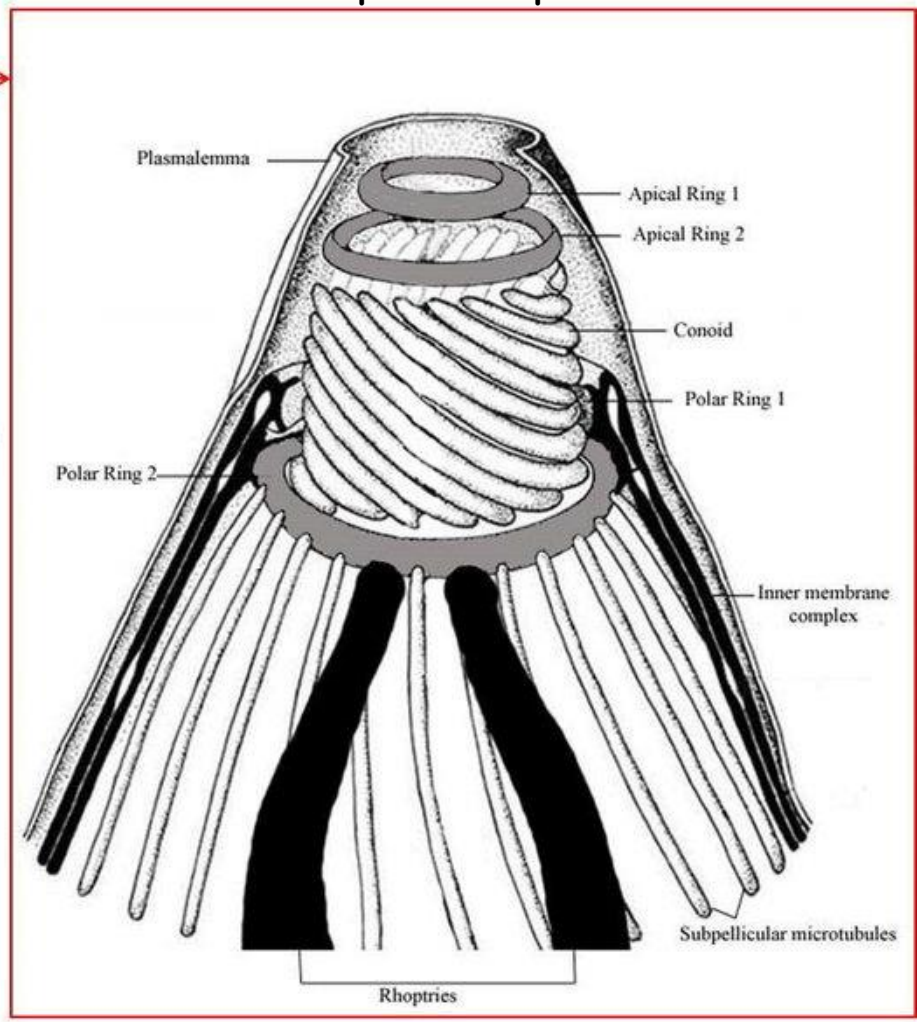


Morfologia II
Forma invasiva
Sporozoiti

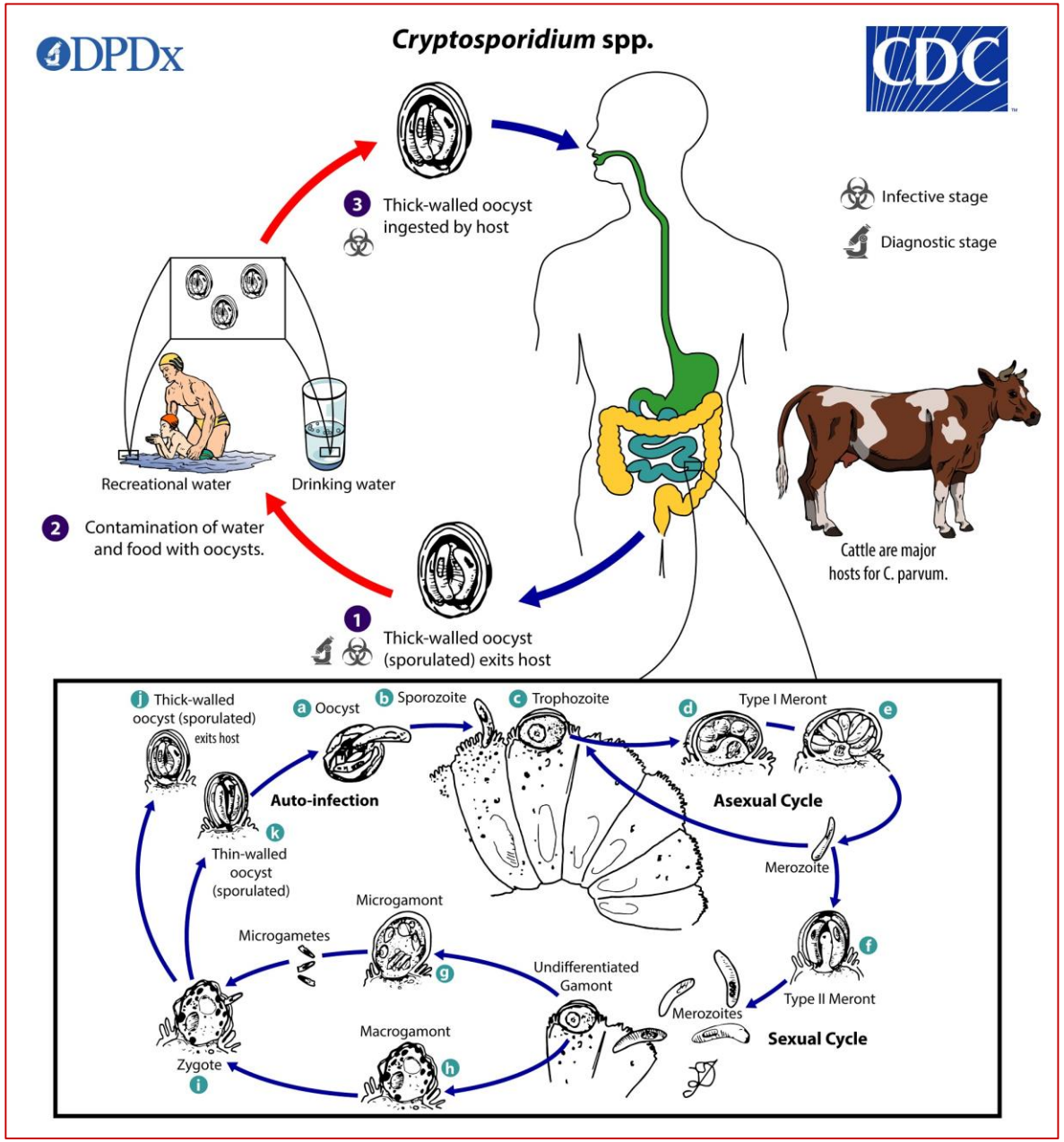




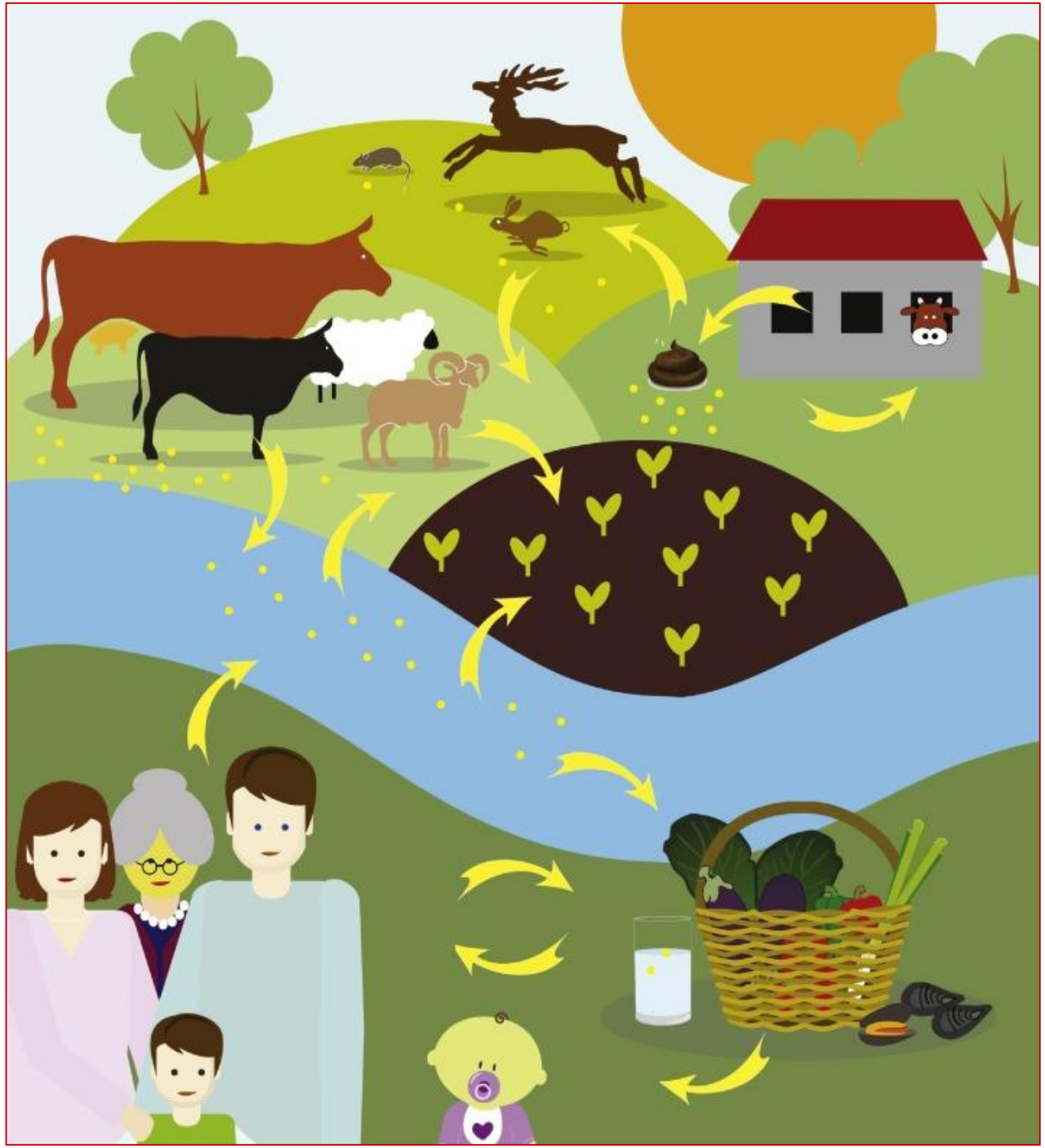
Complesso apicale



Ciclo vitale



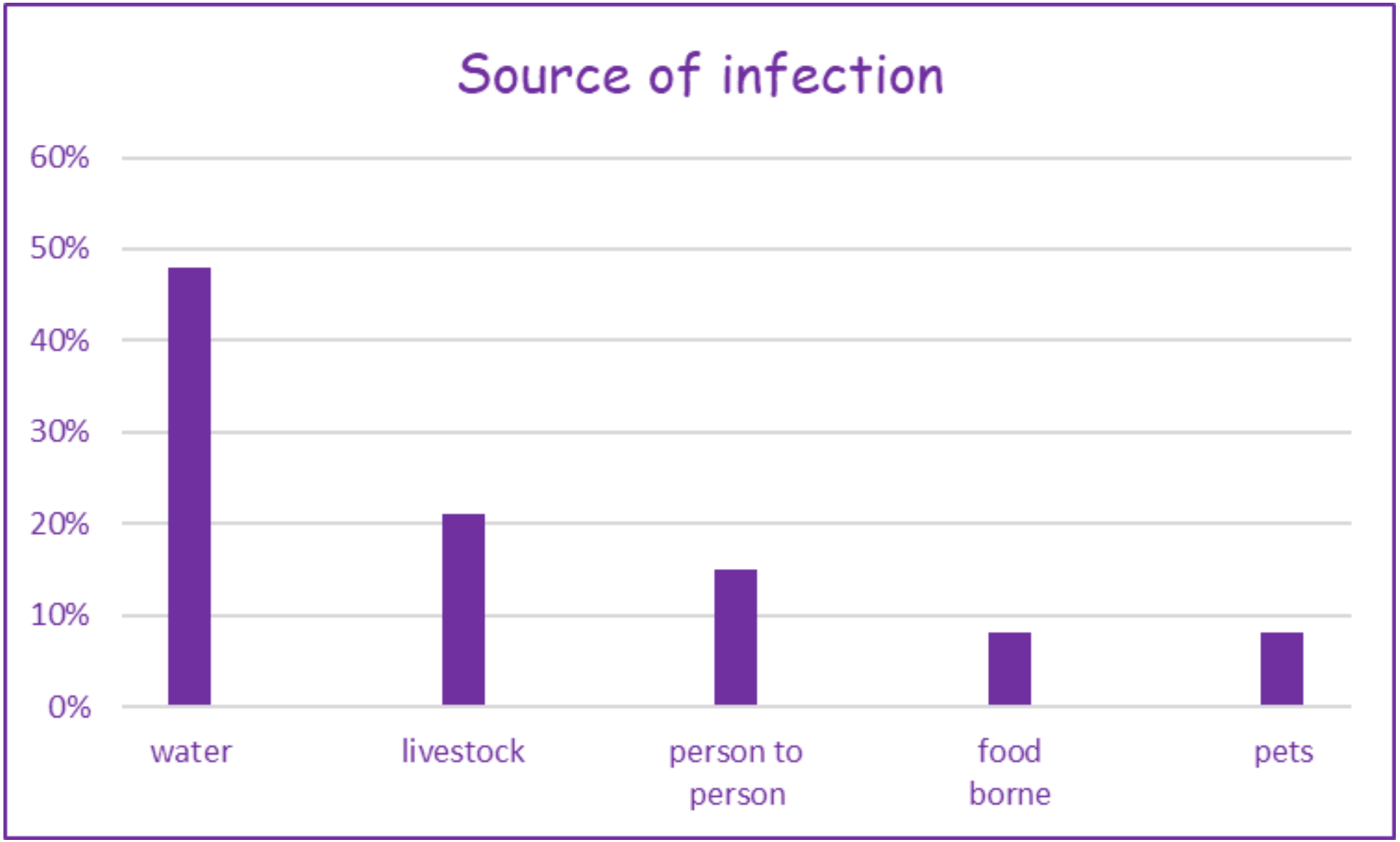
Sono parassiti monoxeni cioè completano il ciclo vitale all'interno di un solo ospite



Le oocisti sono infettive al momento dell'escrezione, consentendo così una **trasmissione oro-fecale** diretta e immediata

- Antroponotica: contatto diretto da persona a persona
- Zoonotica: trasmissione dagli animali all'uomo
- Ambientale: attraverso cibo o acqua contaminata
- Via aerea ????

modificato da Trends Parasitology: 36,3, 2020



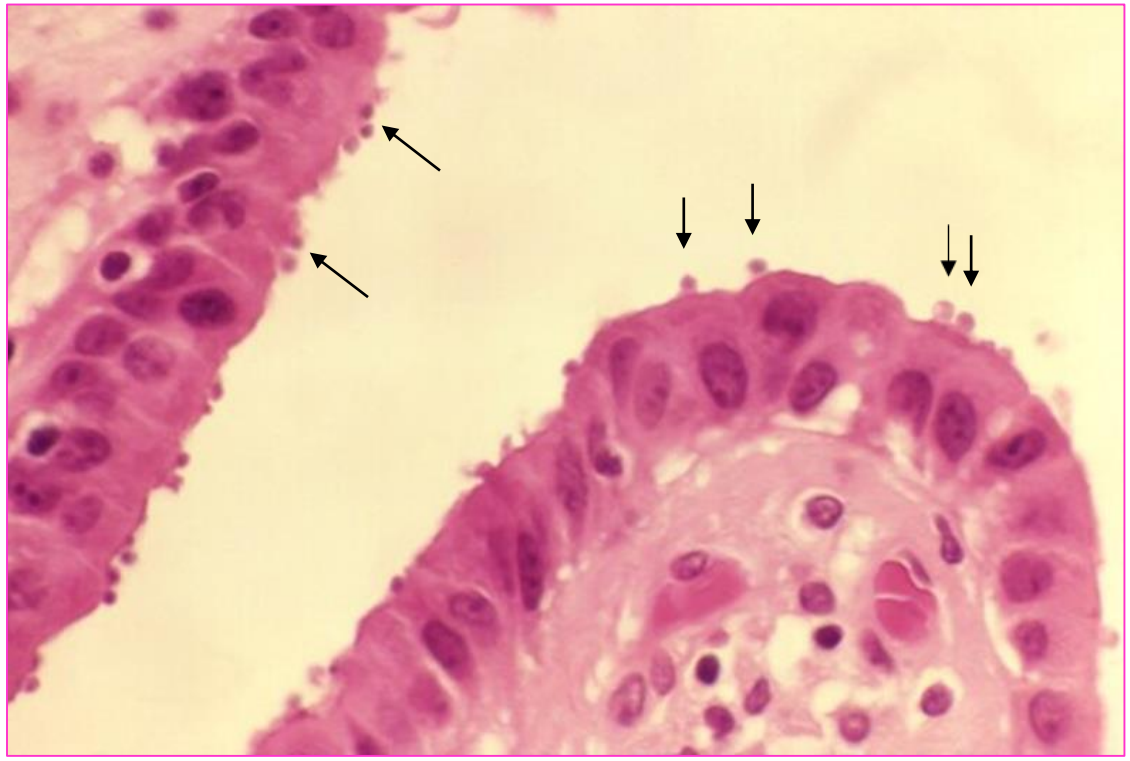
Modificato da PloS One 11, 2016

Fattori di diffusione

- Pochissime oocisti (10 - 100) sono necessarie per trasmettere l'infezione
- Elevato numero di oocisti infettive emesse nelle feci (~10^6/g)
- Escrezione prolungata dopo la scomparsa dei sintomi
- Resistenza alla clorazione dell'acqua potabile e delle piscine

Dove si localizza?

Intestino tenue (duodeno – digiuno)



Apice luminale degli enterociti

Vacuolo parassitoforo

Patogenesi

Riduzione delle dimensioni dei villi

Rigonfiamento e fusione dei villi colpiti

Alterazioni della funzionalità:

- diminuzione dell'assorbimento
- incremento attività secretoria nel lume

Segni e sintomi

Periodo di incubazione: mediamente una settimana (2-10 g)

Persone **immunocompetenti**

Esordio brusco
Diarrea acquosa autolimitante
Crampi addominali
Nausea
Anoressia
Febbre
Affaticamento

Regressione in 1-2 settimane

Persone **immunocompromesse**

Esordio più graduale
Diarrea profusa
Disidratazione
Nausea
Perdita di peso
Coinvolgimento di altri
(vie biliari, pancreas, vie respiratorie)

Tendenza alla cronicizzazione
Potenzialmente letale

Diagnosi di laboratorio

Ricerca nelle feci

Tecniche

- Microscopia (colorazione permanente)
- Test immunocromatografici
- Biologia molecolare

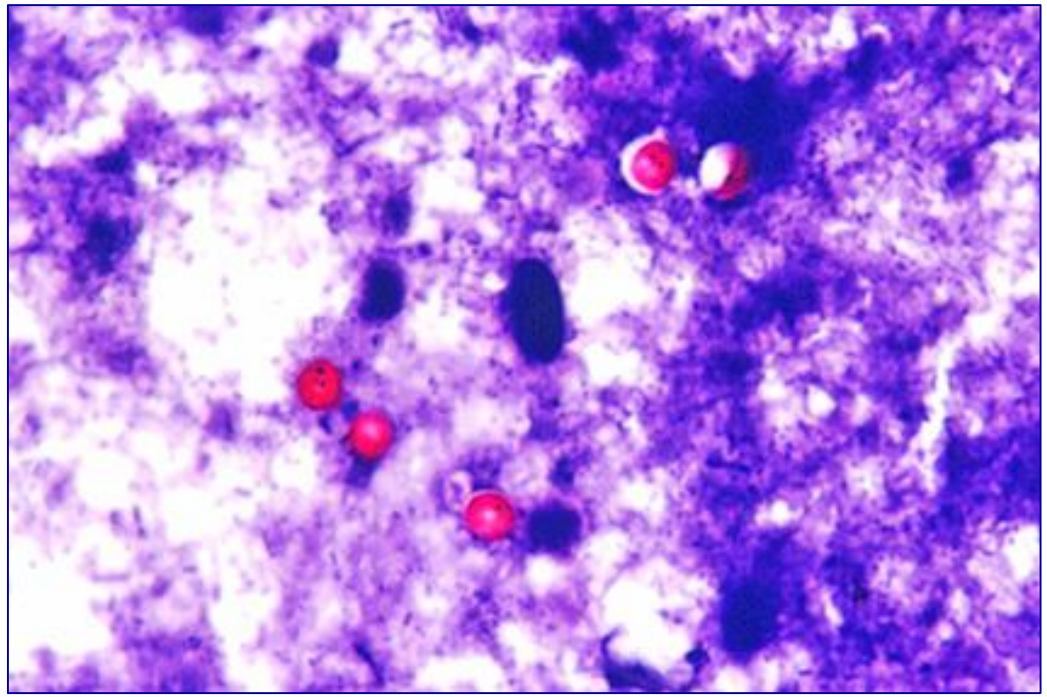
Target

- Oocisti
- Antigeni
- DNA

Microscopia

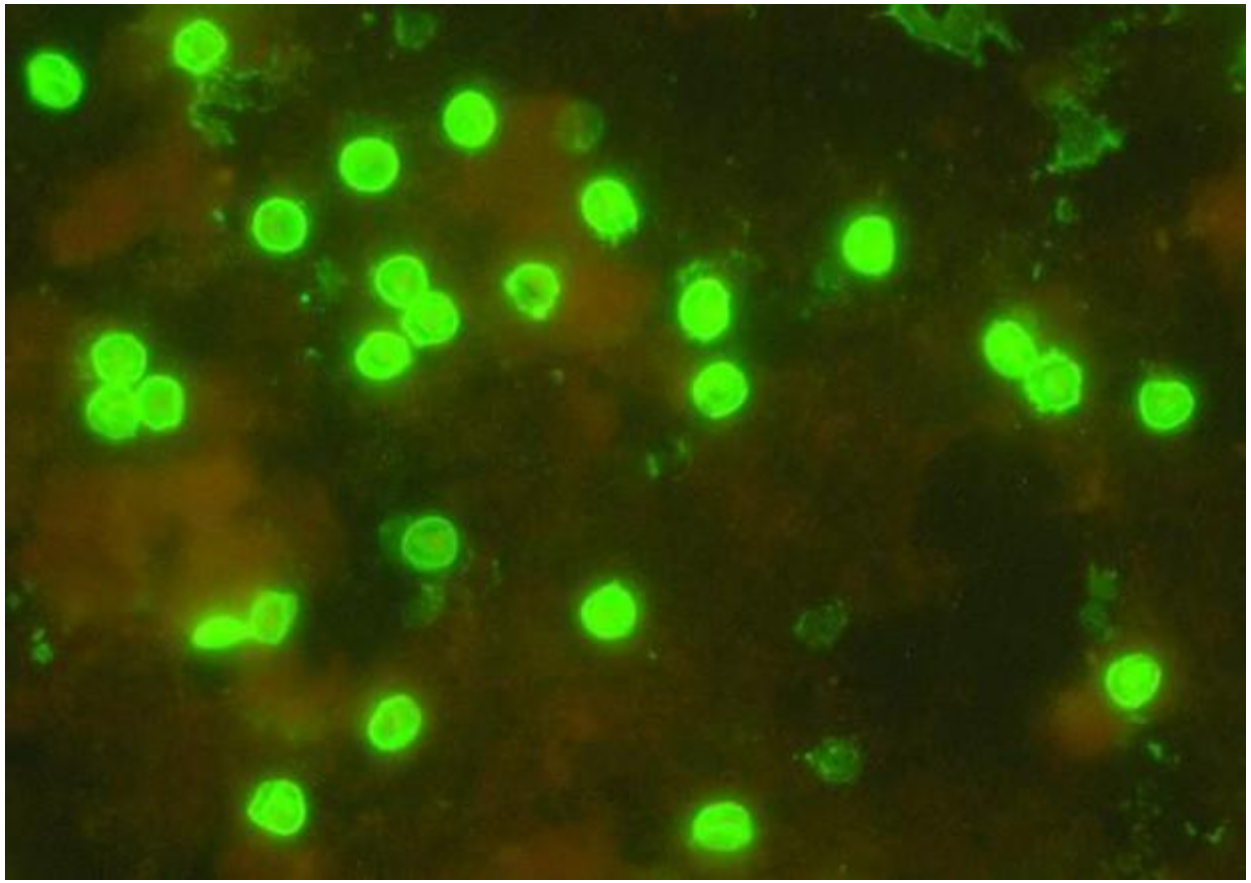
Colorazione permanente

(Ziehl-Neelsen modificata o tecnica di Kinyoun)

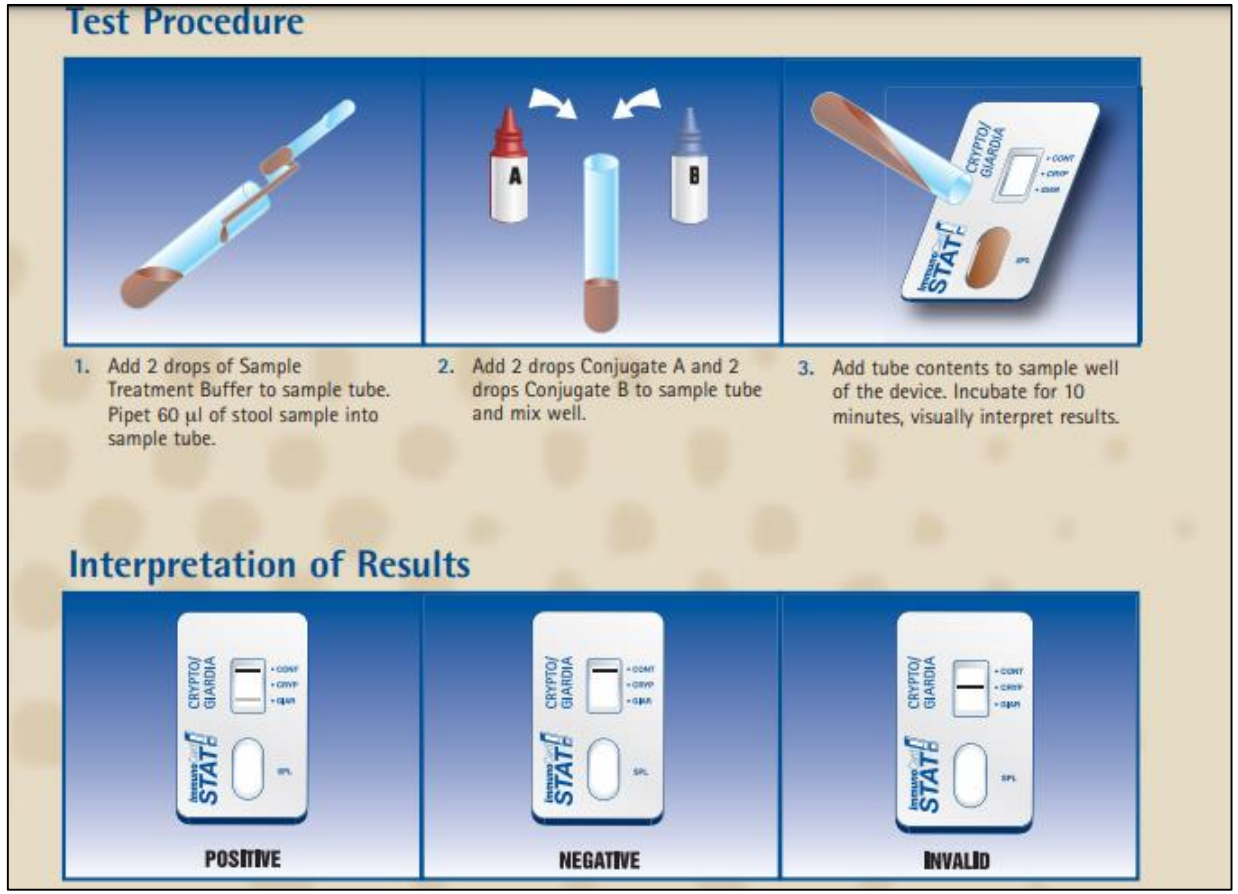


Microscopia a fluorescenza

Immunofluorescenza diretta



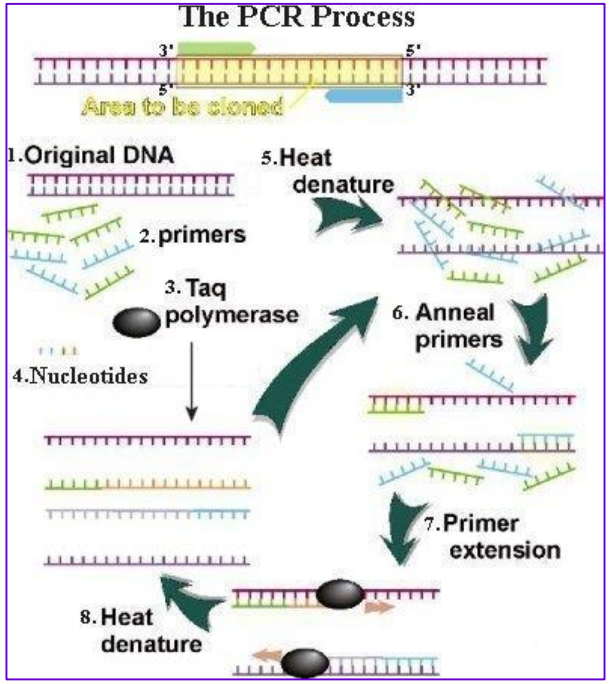
Test immunocromatografico



Biologia molecolare

Bersagli

- 18S rDNA
- Gp60
- Hsp70
- COWP



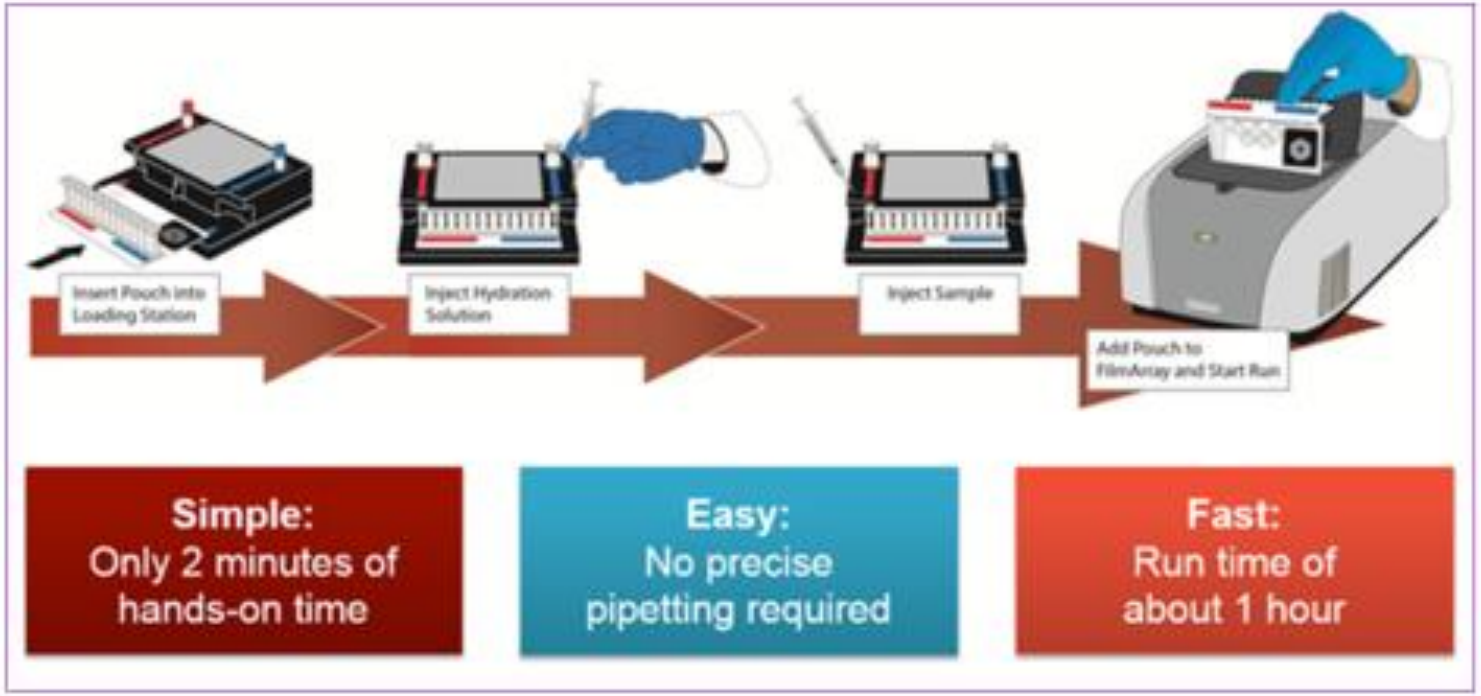
I metodi molecolari sono essenziali per l'identificazione della specie, del genotipo e del sottotipo di Cryptosporidium al fine di identificare specificamente l'organismo responsabile dell'infezione, la fonte e le vie di trasmissione.
Sono utilizzati soprattutto nei laboratori di riferimento

New multiplexed assays

TESTING SYSTEM	TARGETS	SENSITIVITY	SPECIFICITY
BD Max parasitic panel	Giardia, Cryptosporidium, Entamobea histolytica	99.5% Giardia, 99.6% Crypto, 100% Eh	96.2% Giardia, 96.5% Crypto, 100% Eh
Luminex xTAG Gastrointestinal pathogen panel	12 bacteria and viruses, 3 parasites	100% Giardia, Crypto, Eh	100% Giardia, Crypto, Eh
NanoCHIP Gastrointestinal panel	Giardia, Crypto, Eh and E. dispar	Up to 100%	Detection limit of 10^3
Biofire Film Array Gastrointestinal panel	14 bacteria and viruses, 4 parasites (Giardia, Crypto, Eh, Cyclospora)	100% Giardia, Crypto, Eh, Cyclospora	100% Giardia, Crypto, Eh, Cyclospora
EasyScreen	Giardia, Crypto, Eh, D. fragilis, Blastocyctis	100%	92-100%

Ryan et al, Trends Parasitol 2017

ESCMID eLibrary © by author



The FilmArray GI Panel

Simultaneous detection of 23 targets:

Bacteria

- *Aeromonas*
- *Campylobacter*
- *Clostridium difficile*
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Salmonella*
- *Vibrio*
- *Vibrio cholerae*
- *Yersinia enterocolitica*

Diarrheagenic *E. coli*/*Shigella*

- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/st*
- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*
- *Shigella*/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- *E. coli* O157

Viruses

- Adenovirus F40/41
- Human Astrovirus
- Norovirus GI/GII
- Rotavirus A
- Sapovirus

Protozoa

- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia lamblia*

Outbreak modenese

06-09-2019: 2 campioni positivi per *Cryptospridium spp*

(stesso ospedale, stesso reparto)

- Dal 7al 12 settembre 2019 sono stati analizzati 87 campioni di feci provenienti da un gruppo sportivo costituito da ragazzi, familiari e accompagnatori che avevano soggiornato nel comune di Montese (MO)
- Campioni positivi per *Cryptosporidium spp*:72
- Campioni positivi per *Cryptosporidium spp e Giardia intestinalis*: 5
- Campioni inviati all'ISS per genotipizzazione:78

Outbreak modenese

Rotavirus

Adenovirus

Norovirus

Coprocoltura

Esame coproparassitologico standard

Ricerca specifica di *Cryptosporidium*

(linee guida CoSP - AMCLI)

Ricerca specifica di *Cryptosporidium*

Ricerca di copro-antigeni mediante test IC

↓

Colorazione Ziehl-Neelsen modificata

↓

Osservazione microscopica

↓

Ricerca DNA mediante film array

Dalla diagnosi alla sorveglianza

- Utilizzo di metodiche affidabili
- Personale esperto e competente
- Conservazione dei campioni
- Raccolta dei dati clinici
- Raccolta dei dati epidemiologici
- Invio dei campioni al laboratorio di riferimento per la genotipizzazione e sottotipizzazione

Conclusioni

- La criptosporidiasi è una patologia enterica poco conosciuta, ancora più negletta rispetto alla giardiasi, da monitorare e controllare
- Fondamentale il ruolo del laboratoro di microbiologia per la diagnosi e la sorveglianza
- La ricerca del *Cryptosporidium* **non** è eseguita di routine dai laboratori quando si esegue l'esame coproparassitologico standard, per cui deve essere richiesta specificamente dai clinici (spesso i clinici non hanno familiarità con tale parassita)
- Gli outbreak di giardiasi e di criptospridiasi ci sottolineano l'importanza di costruire, mantenere e consolidare una rete di sorveglianza che coinvolga i Laboratori di Microbiologia, i Servizi di Igiene Pubblica, i dipartimenti di Sanità Pubblica e i Laboratori di Riferimento Nazionale