



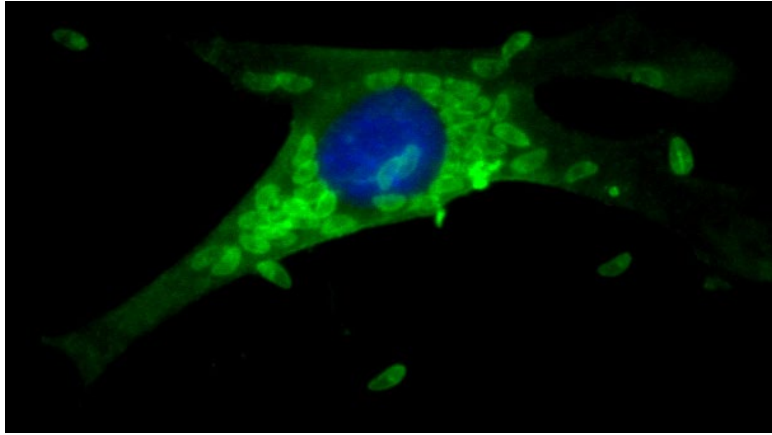
Immunità cellulo-mediata nelle infezioni da *Toxoplasma gondii*

Genco Francesca

SC di Virologia e Microbiologia
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo
Pavia

XLVI Congresso Nazionale AMCLI
10 - 13 Novembre 2018
Palacongressi di Rimini

TOXOPLASMA GONDII



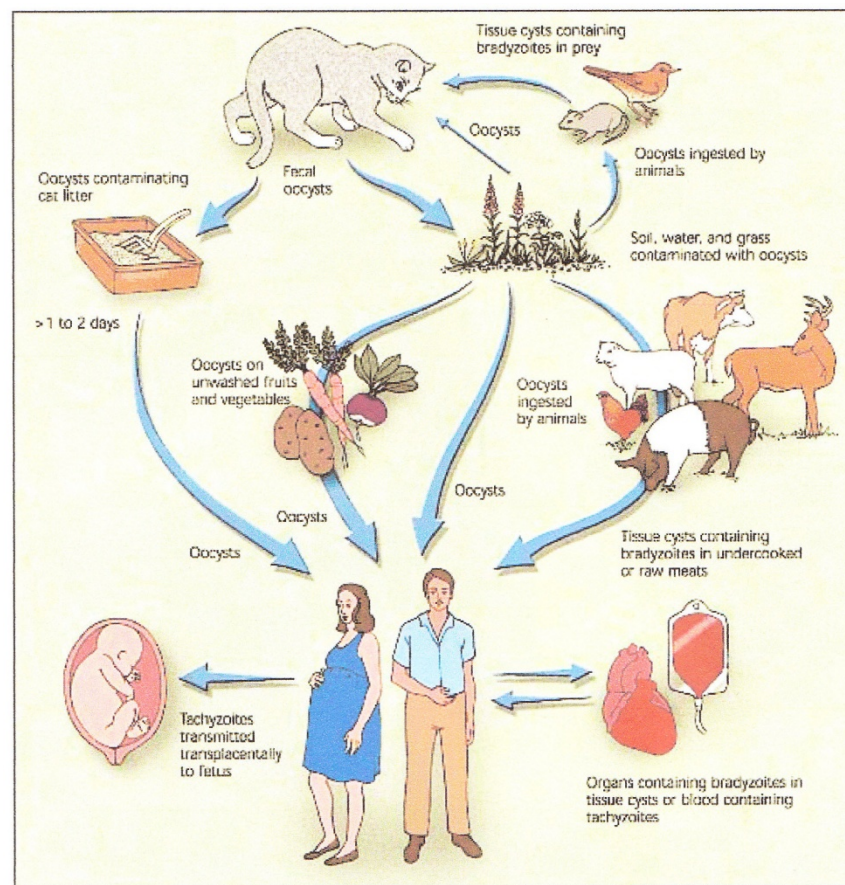
- worldwide distribution/ one third of the human population is chronically infected
- capable to infect all warm-blooded animals
- highly transmissible
- *3 forms Oocyst, Tachyzoite, Bradyzoite*
- 3 genotypes (I-II-III)
- routes of infection (food contaminated with oocysts; *contact with cat faeces, soil and contaminated water...*)

Low prevalence (10 -30%): North America, nel Suth East Asia ,North Europe, Sahelian country of Africa

Moderate prevalence (30-50%) Central and Southern Europe

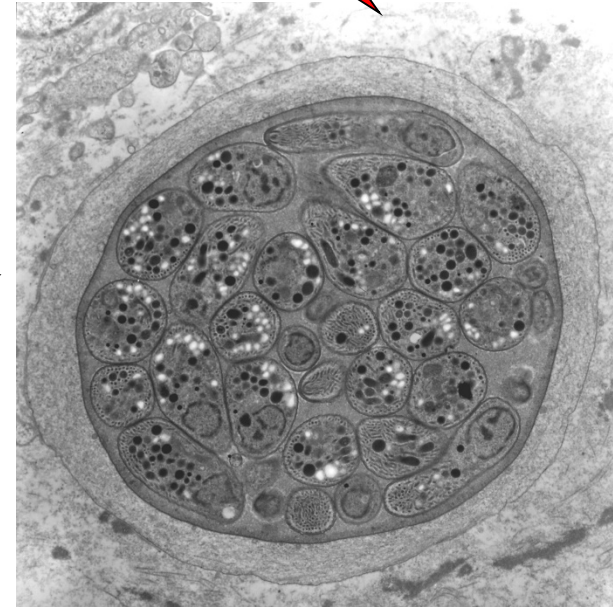
High prevalence (>50%) Latin America Tropical African countries

CICLO BIOLOGICO





Invading stage



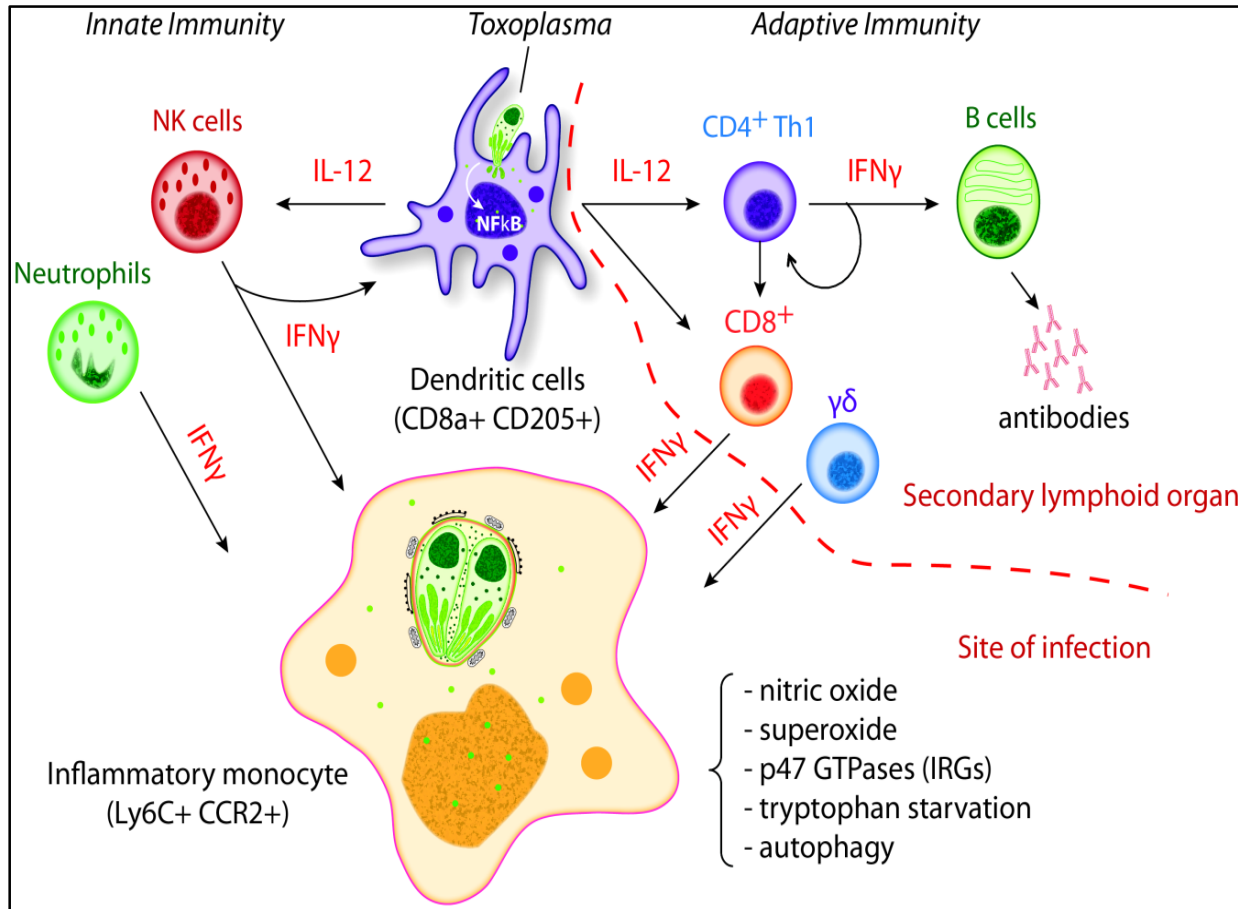
Chronic stage

Immunity



Protective but non sterilizing Immunity

IMMUNE RESPONSE TO *T. GONDII*



IFN- γ è is the major lymphokine involved in the resistance to *T. gondii*

L'infezione da *T. gondii* stimola una risposta umorale mediante la produzione di anticorpi

TOXOPLASMOSI IN GRAVIDANZA:

- *Diagnosi difficile*
- *Infezione asintomatica*
- *Sierologia di difficile interpretazione*

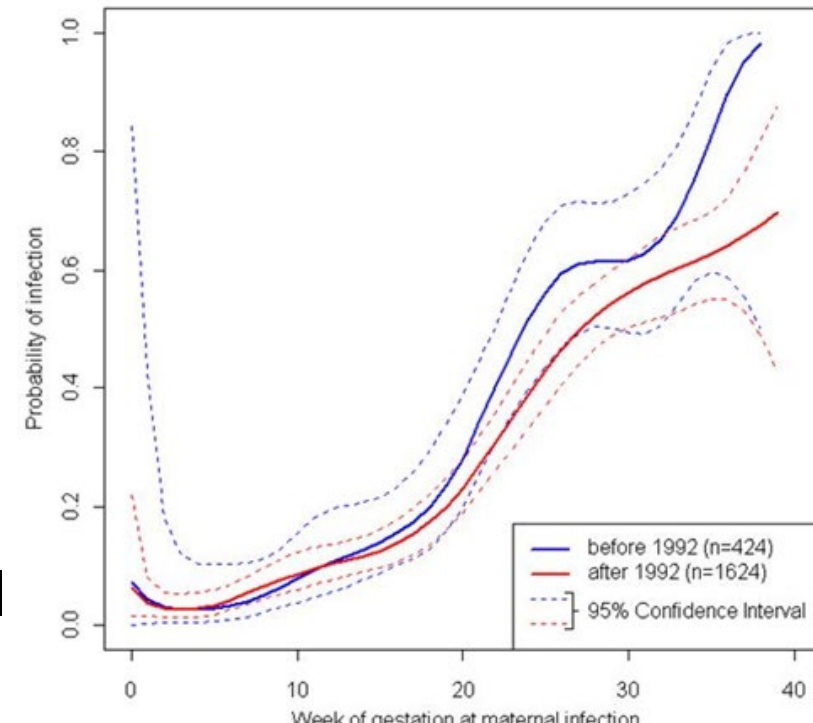


***Necessità di nuovi test sensibili e specifici,
standardizzati, semplici da eseguire e
interpretare***

Efficacia della terapia prenatale

Nella prevenzione dell'infezione

- Efficace se somministrata entro le 4 settimane dall'infezione materna (*Thiebault et al Lancet 2007*)
- Riduzione significativa del rischio dal 1992 con l'introduzione in Francia dello screening mensile *Wallon et al. CID 2013*
- Il trattamento prenatale riduce il rischio di trasmissione dalla madre al figlio *Prusa-Romana et al 2015*



Efficacia della terapia prenatale

Riduzione sequele (Pirimetamina + sulfadiazina)

- Riduzione di gravi sequele neurologiche *Cortina-borja et al. Plos med 2012.*
- Riduzione segni clinici a 3 anni di età
– Wallon et al . *CID 2013*

Risk of clinical signs at age 3 years	<u>1995</u>	After 1995	
PCR availability on amniotic fluid	No	Yes	
Pyr + Sulf antenatal treatment	Alternating with spiramycine for 3-week periods Introduced with delay	Continuous	
Clinical signs/infected children	87/794	46/1,150	P<10 ⁻⁴

Quadri sierologici della donna in gravidanza

• IgG+, IgM-	→	<i>la donna è immune se fatto nel 1° trimestre</i>
• IgG-, IgM-	→	<i>Non immune; profilassi igienico-alimentare</i>
• IgG+, IgM+	→	<i>Infezione acuta? Persistenza IgM? Avidity test</i>
• IgG-, IgM+	→	<i>Sieroconversione? False IgM ?</i>

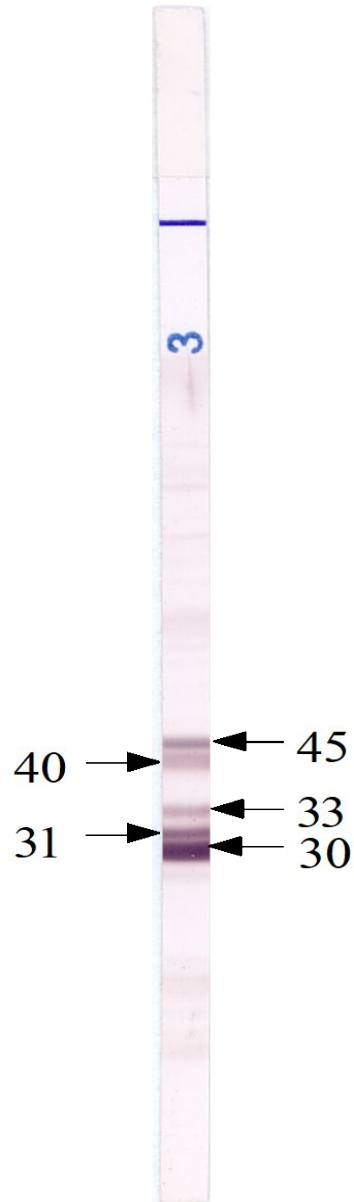
IgM+= TERAPIA!! Ma spiramicina altera la maturazione anticorpale

LDBIOTOXO II

- (immunoblot)
- Pronto all'uso
- standardizzato(90'- 90'- 60')
- controllo positivo per IgG

5 bande specifiche:

30 – 31 – 33 – 40 – 45 kDa



IgG positivo: devono essere presenti
almeno 3 bande specifiche

IgM positivo: devono essere presenti
almeno 2 bande specifiche, inclusa la
banda di 30 kDa

INTERFERON γ RELEASE ASSAY (IGRA)

Mycobacterium tuberculosis = *Toxoplasma gondii*

Risposta immune simile :

- *Patogeni intracellulari*
- *Produzione IFN- γ da cellule T sensibilizzate*

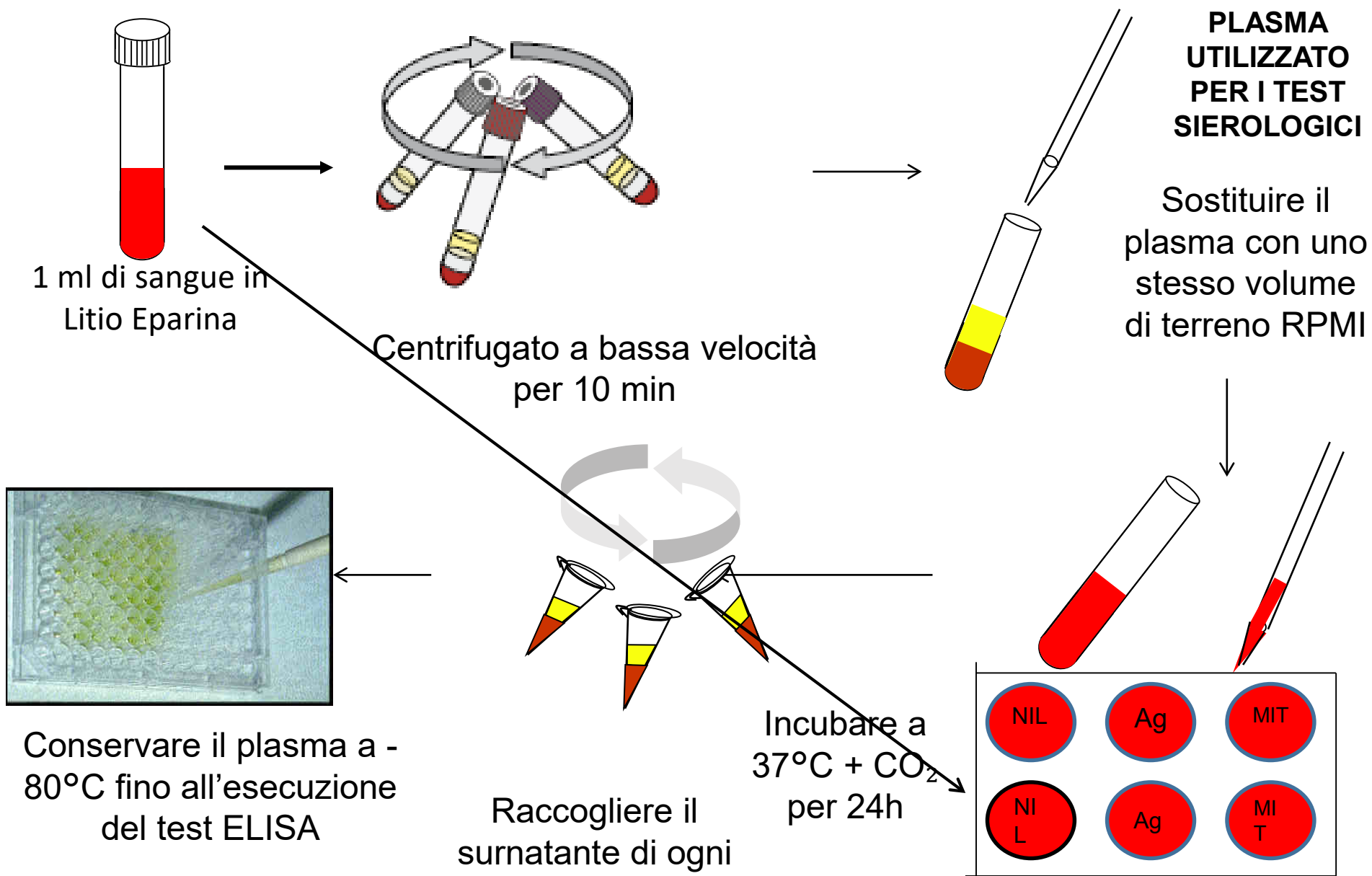


QuantiFERON®

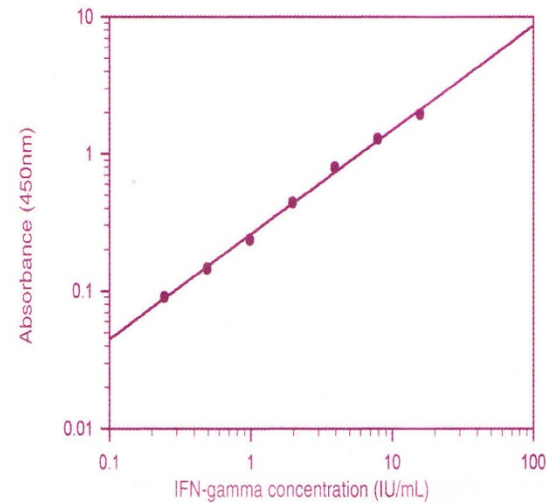
ToxoFERON
Interferon
gamma

1. ESECUZIONE DEL TEST

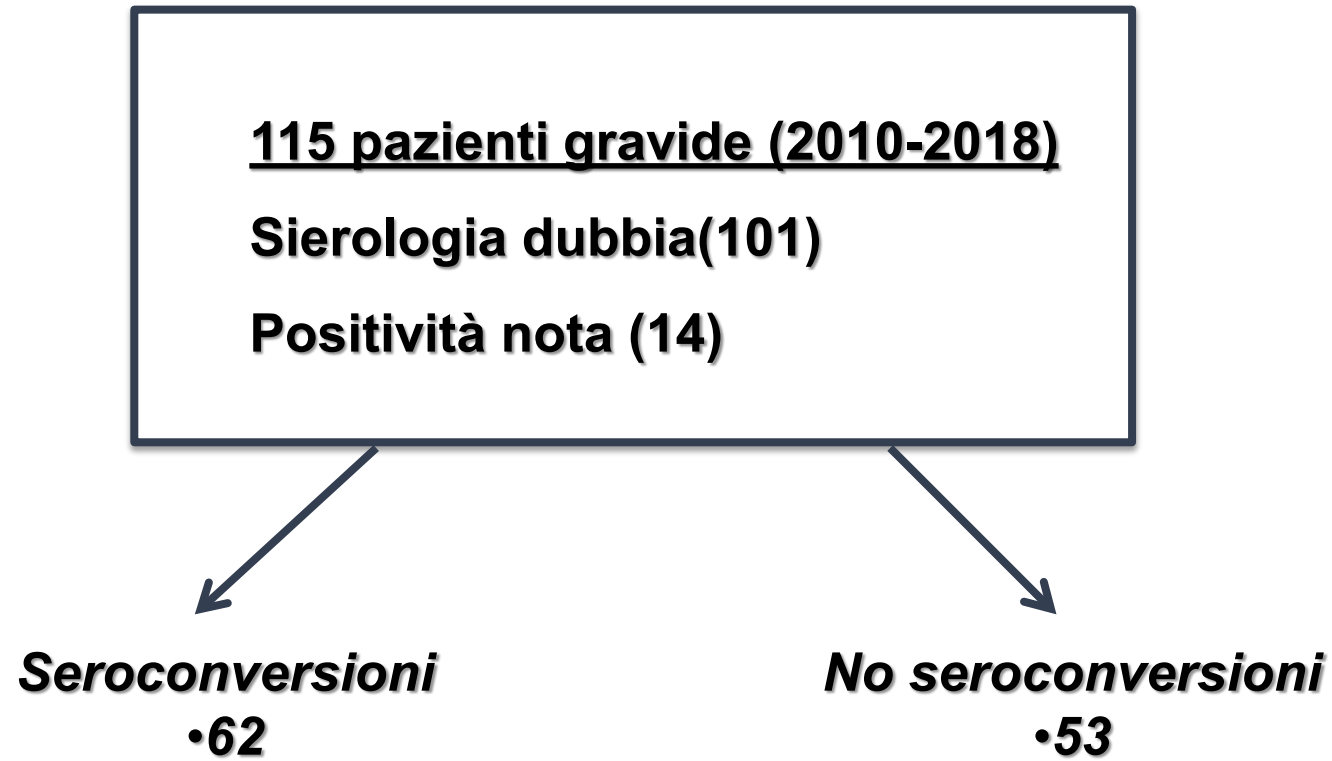
QuantiFERON Cellestis® (ADA)



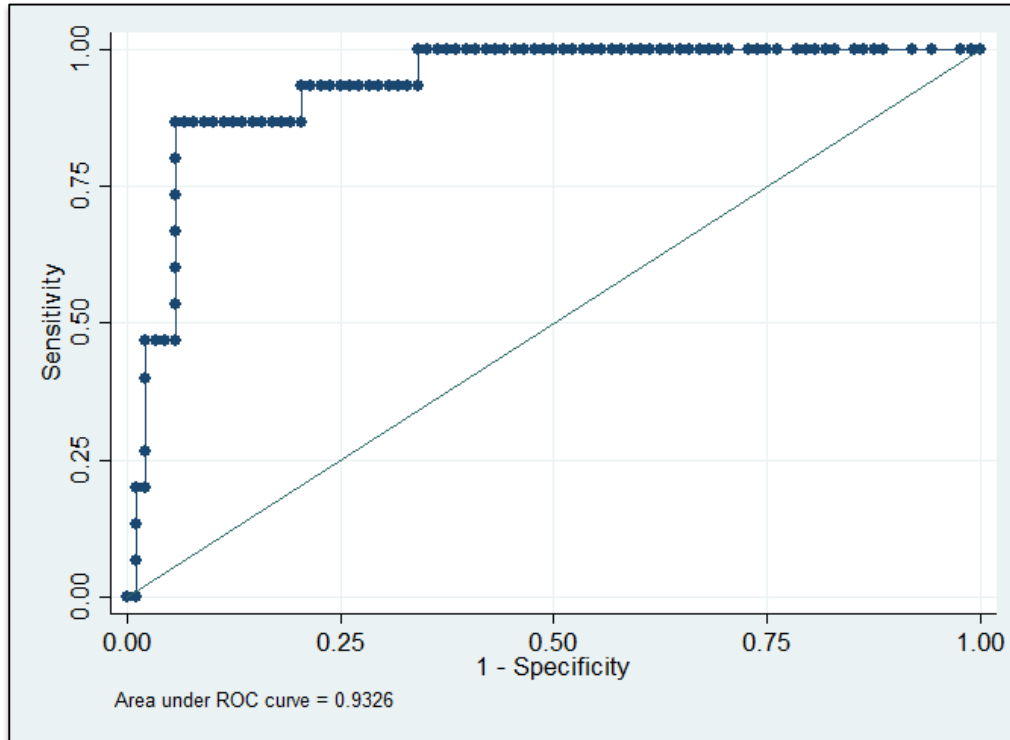
Il dosaggio quantitativo dell'INF- γ viene eseguito mediante un test ELISA (QuantiFERON CMI Cellestis®) e calcolato grazie ad un apposito software per l'analisi dei dati grezzi, espresso poi in UI/ml



Materiali e metodi



RISULTATI



Through the analysis by means of the ROC curve the Cut-Off value was determined to be **0,74**

Our test scored a sensitivity of **81%** and a specificity of **92%**.

Caso clinico (MG)

Ultima mestruazione 18/01/2016

TEST	26/03/2016	06/04/2016 *	24/04/2016
IgG CLIA	NEG	NEG	25
IgG ELFA	NEG	NEG	17
IgM CLIA	POS	POS	POS
IgM ISAGA	12+	12+	12+
IgA ELISA	NEG	NEG	DUBBIO
WB IgG/IgM	POS/POS	POS/POS	
IGRA		POS	

* Terapia dal 6/04/2016

Caso clinico (PJ)

Ultima mestruazione 29/07/2013

TEST	24/09/2013*	01/10/2013	15/10/2013	23/10/2013	22/04/2014
IgG CLIA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
IgG ELFA	NEG	NEG	NEG	4	NEG
IgM CLIA	POS	POS	POS	POS	DUB
IgM ISAGA	12+	12+	12+	12+	8+
IgA ELISA	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
WB IgG/IgM	POS/POS	POS/POS	POS/POS		POS/POS
IGRA			POS		

*Terapia dal 25/09/2013

Caso clinico (BA)

Ultima mestruazione 16/08/2011

TEST	21/11/2011	14/12/2011	25/01/2012
IgG CLIA	NEG	NEG	NEG
IgG ELFA	NEG	NEG	NEG
IgM CLIA	POS	POS	POS
IgM ISAGA	NEG	NEG	NEG
IgA ELISA	NEG	NEG	NEG
WB IgG/IgM	NEG/DUB	NEG/DUB	NEG/DUB
IGRA			NEG

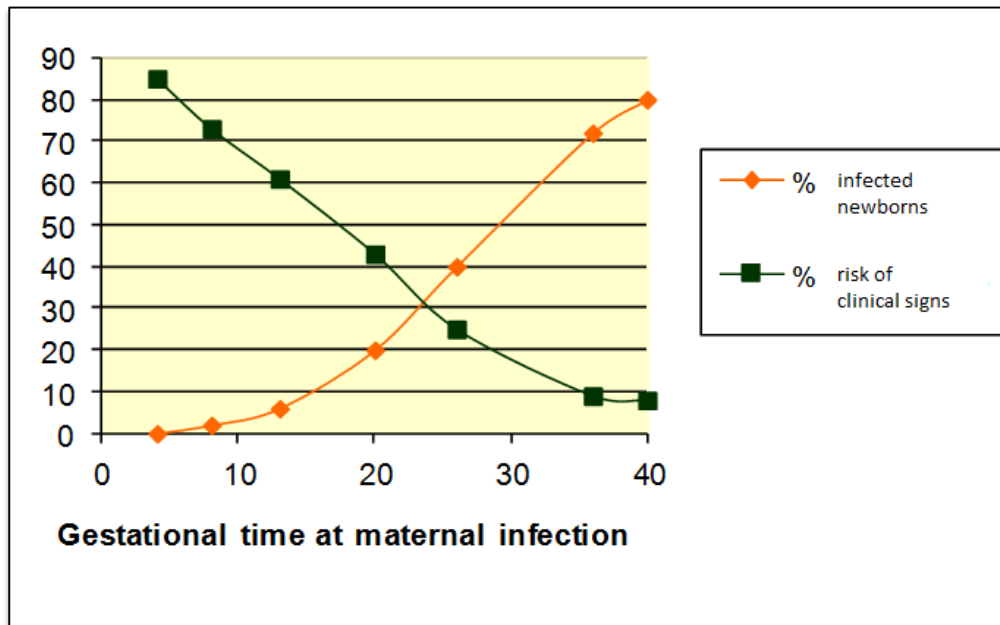
Terapia dal 13/10/2011

CONCLUSIONI

- *I test sierologici da soli non sono sufficienti per una precisa diagnosi di Toxoplasmosi nelle madri con sierologia dubbia e nei neonati senza IgM*
- *L' IGRA per Toxoplasma gondii risulta essere sensibile e specifico*
- *L' IGRA permette di trattare solo i pazienti infetti*

TRANSMISSION vs CLINICAL SIGNS

PRIMARY INFECTION



*Inverse
relationship
between
gestational age
at maternal
infection and
transmission rate*

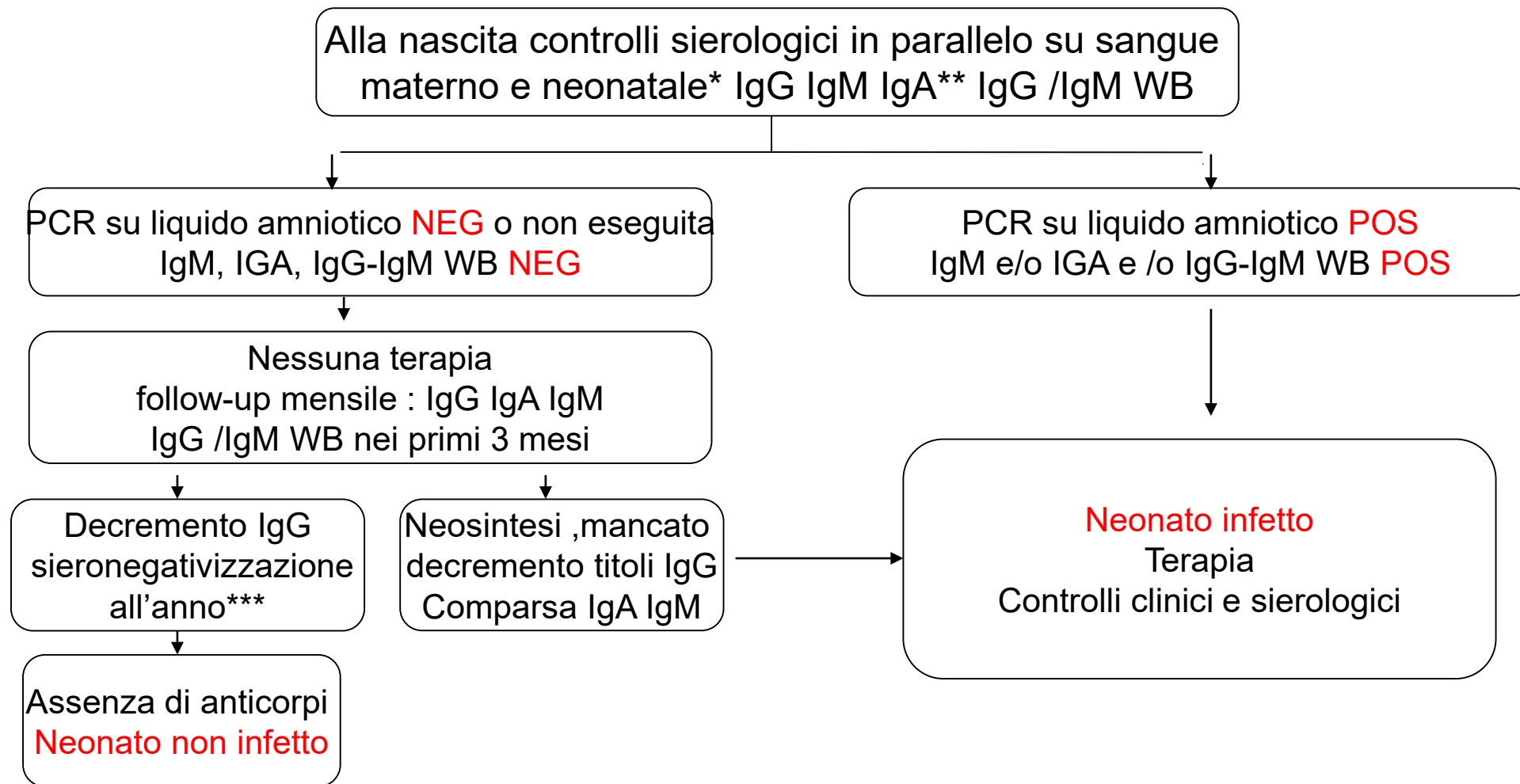
Meroni V., personal communication

Nei neonati trattati prima e dopo la nascita

- I casi gravi sono **estremamente** rari
- La toxoplasmosi congenita è una malattia **oculare cronica**
- Che ha globalmente una **prognosi buona**
- Ma può durare **tutta la vita**



Diagnosi sierologica della toxoplasmosi congenita



*è preferibile usare il sangue periferico del neonato

** i test più sensibili sono IgM e IgA ISAGA

*** tutti i test vanno eseguiti nello stesso laboratorio e i sieri conservati congelati per un anno

E' possibile osservare la sieronegativizzazione dei titoli anticorpali in corso di terapia

Come escludere un'infezione congenita?

Negativizzazione delle IgG specifiche



follow-up a un anno

**IgG
materne
*In utero***

IgG alla nascita

Decremento Negativizzazione all'anno

Test sierologici

- Comparative IgG/IgM Western Blot (LDBIO Lyon France) sul siero di madre e neonato
- Vidas TOXO IgG(BIOMERIEUX Marcy l'Etoile, France)
- IgM ISAGA(BIOMERIEUX Marcy l'Etoile France)
- ELISA IgA (DiaSorin Saluggia Italy)

Western Blot comparativo eseguito nei primi 3 mesi di vita

IgG-IgM WESTERN BLOT			
	POS	NEG	TOT
POS	38	6	44
NEG	2	178	180
TOT	40	184	224

Sens 95,0 (IC 95% : 83,1-99,4)*
Spec 96,7 (IC 95% : 93,0-98,8)

IgM ISAGA + IgA ELISA			
	POS	NEG	TOT
POS	30	2	32
NEG	10	182	192
TOT	40	184	224

Sens 75,0 (IC 95% : 58,8-87,3)*
Spec 98,9 (IC 95% : 96,1-99,3)

Campioni alla nascita

Sierologia

- Sangue periferico materno

Sierologia e immunologia

- 1ml sangue periferico del neonato
- 1ml sangue periferico del neonato in Litio eparina

Materiali e Metodi

•
1162 campioni da 1ml di sangue intero in Litio Eparina provenienti da 552 bambini nati da madre con infezione certa o probabile da *Toxoplasma gondii* in gravidanza.

1134 da 506 neonati non infetti e 28 da 46 neonati con infezione congenita accertata alla nascita e/o al termine dell'anno di follow-up.

Di questi, 283 sono stati seguiti dalla nascita, 223 entro i primi tre mesi di vita e comunque tutti sono stati controllati con i test sierologici in uso presso il laboratorio fino all'anno di età per escludere eventuali infezioni.

Sovrapponibilità dei dati

Su 122 campioni è stato possibile effettuare il dosaggio sia in S (sangue intero) che in R (plasma sostituito con RPMI)



RISULTATI SOVRAPPONIBILI → Solo R

```
. kap risul_r risul_s, t
```

risul_r	N	risul_s		P	Total
		ND			
N	39	13	2	54	
ND	5	36	1	42	
P	2	2	18	22	
Total	46	51	21	118	

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
78.81%	36.54%	0.6661	0.0672	9.92	0.0000

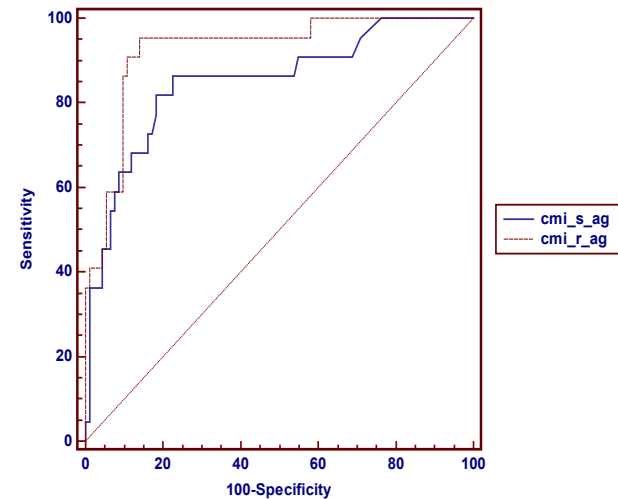
Sensibilità, Specificità, Cut-Off

SENSIBILITA' → **S: 81,58% (IC 95%)**
R: 93% (IC95%)

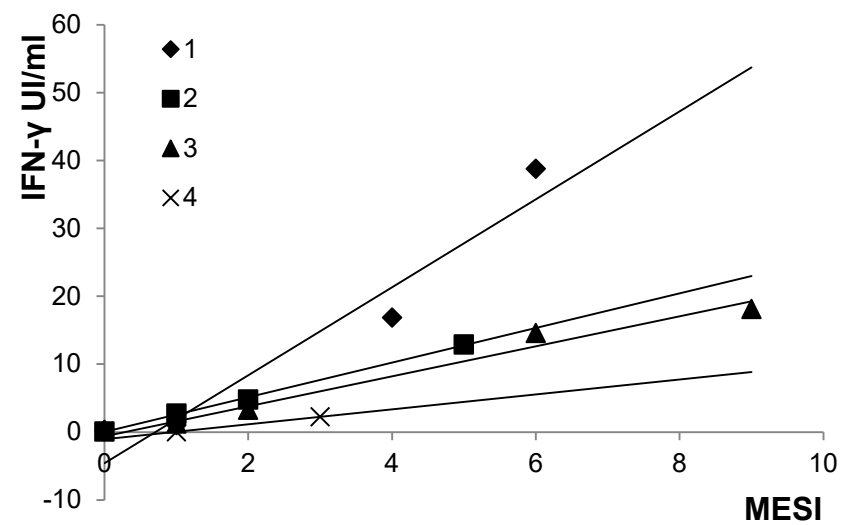
SPECIFICITA' → **S: 83,48% (IC 95%)**
R: 89,7% (IC95%)

CUT OFF → **S: 0,151 (IC 95%)**
R: 0,156 (IC95%)

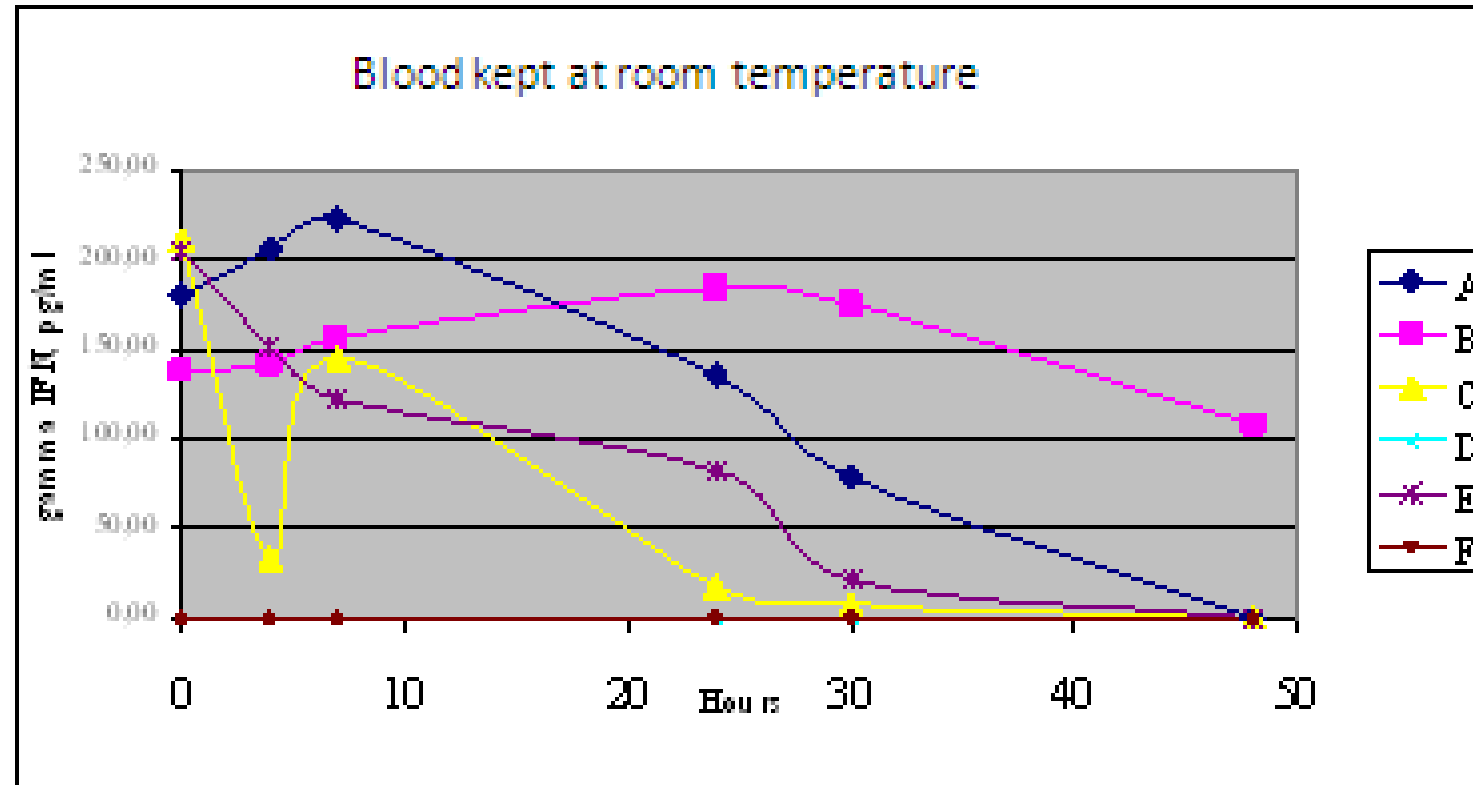
P=0.076



Aumento del release di INF- γ al progredire dell'età



Intervallo tra momento del prelievo e esecuzione del test



- Decremento importante della secrezione di IFN- γ dopo 24vore

J Clin Microbiol. 2010 Jan;48(1):41-5.

Diagnosis of congenital toxoplasmosis by using
a whole-blood gamma interferon release assay.

Chapey E, Wallon M, Debize G, Rabillaud M, Peyron F

132 NEONATI

(Gennaio –Dicembre 2011)

Neonati	IgM/IgA POS	IgM/IgA NEG	IgG/IgM WB POS	IgG/IgM WB NEG	IGRA POS	IGRA NEG
INFETTI (10)	4	6	9	1	10	0
NON INFETTI (122)	0	122	0	122	0	65
TESTATI	132		132		75	

Risultati -neonati

Newborn infected	Total
Yes	4
No	89
Not known	11
Total	104

→ **3 asintomatici**

→ **1 retinocoroidite
perimaculare**

IGRA TEST era positivo in tutti i neonati infetti e nelle loro madri

Caso clinico (MA)

Data nascita 28/09/17

TEST	29/09/2017	25/10/2017	28/02/2018	03/10/2018
IgG CLIA	>400			NEG
IgG ELFA	1261	717	56	NEG
IgM CLIA	NEG	NEG	NEG	NEG
IgM ISAGA	NEG	NEG	NEG	NEG
IgA ELISA	NEG	NEG	NEG	NEG
WB IgG/IgM	NEG/NEG	NEG/NEG		
IGRA	NEG	NEG		

Caso clinico (DM)

Data nascita 01/10/2017

TEST	06/10/2017	22/11/2017	25/10/2018
IgG CLIA	191		NEG
IgG ELFA	574	86	NEG
IgM CLIA	NEG	NEG	NEG
IgM ISAGA	NEG	NEG	NEG
IgA ELISA	NEG	NEG	NEG
WB IgG/IgM	NEG/NEG	NEG/NEG	
IGRA	ND	NEG	

Caso clinico (SA)

Data nascita 31/05/18

TEST	02/08/2018	4/09/2018	10/9/2018*	06/11/2018
IgG CLIA	>400	299	265	68
IgG ELFA	902	394	265	144
IgM CLIA	NEG	NEG	NEG	NEG
IgM ISAGA	NEG	NEG	NEG	NEG
IgA ELISA	NEG	NEG	NEG	MEG
WB IgG/IgM				
IGRA			POS(0,180)	POS(1,195)

*Terapia

CONCLUSIONI

Nessuno dei neonati con infezione congenita è risultato negativo a tutti i prelievi effettuati, in qualche caso si è verificata un'assenza di risposta nella produzione di INF- γ nei primi

prelievi

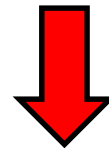
Minor capacità di risposta
del neonato

Precoce
somministrazione della
terapia

Il numero di test non determinati è stato del 16%

Secrezione spontanea di
INF- γ nei controlli

Mancanza di risposta al
mitogeno

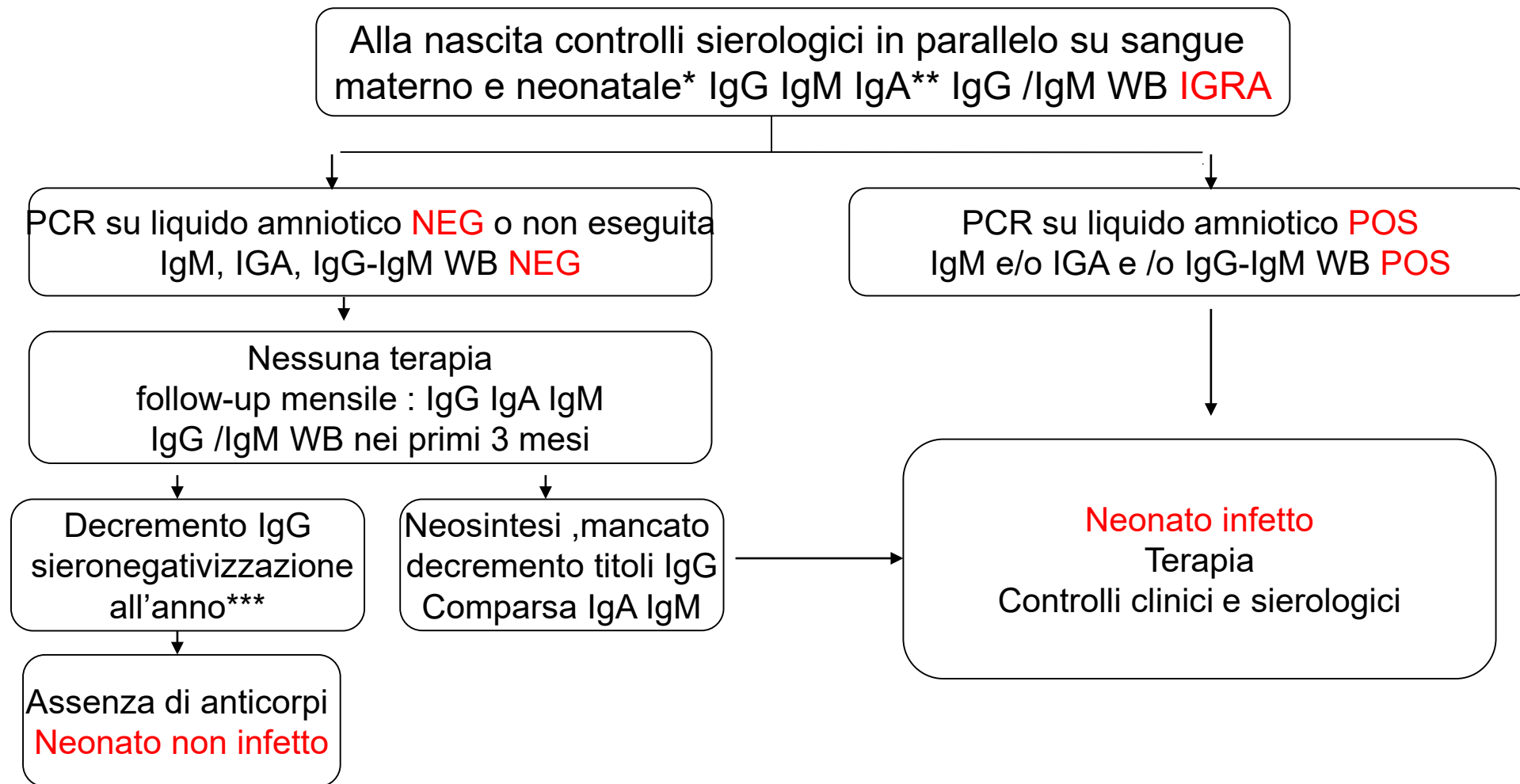


La ripetizione dell'esame il mese successivo ha portato ad una definizione del risultato del test

**Questo test, associato alla sierologia, ci ha
permesso di fare diagnosi di infezione
congenita in TUTTI I NEONATI INFETTI
ENTRO I PRIMI 3 MESI DI VITA, potendo
così sottoporli ad un tempestivo e corretto
trattamento farmacologico**

**A TUTTI I NEONATI risultati NON INFETTI, non
è stata somministrata alcuna terapia, ed è
stata confermata l'assenza di infezione con la
completa sieronegatività all'anno di vita**

Diagnosi sierologica della toxoplasmosi congenita



*è preferibile usare il sangue periferico del neonato

** i test più sensibili sono IgM e IgA ISAGA

*** tutti i test vanno eseguiti nello stesso laboratorio e i sieri conservati congelati per un anno

E' possibile osservare la sieronegativizzazione dei titoli anticorpali in corso di terapia



MATERA, ITALY 2019

VI INTERNATIONAL CONGRESS ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS

Casa Cava, 15th-17th September, 2019



Honorary President

Jack Remington

President

Valeria Meroni

Scientific Committee

Daniel Ajzenberg (Limoges, France)
Justus Garweg (Bern, Switzerland)
Jorge Enrique Gomez- Marin
(Armenia, Colombia)
Laura Kramer (Parma, Italy)
Laurent Mandelbrot (Paris, France)
Valeria Meroni (Pavia, Italy)
Jose Montoya (Palo Alto, United States)
Francois Peyron (Lyon, France)
Eskild Petersen (Muscat, Oman)
Daniel Vitor Vasconcelos Santos
(Belo Horizonte, Brazil)
Luigia Scudeller (Pavia, Italy)
Martine Wallon (Lyon, France)

Organizing Committee

Alessia Arossa (Pavia, Italy)
Lina Bollani (Pavia, Italy)
Fabrizio Bruschi (Pisa, Italy)
Agata Calvario (Bari, Italy)
Riccardo Davanzo (Matera, Italy)
Giulio De Stefano (Matera, Italy)
Francesca Genco (Pavia, Italy)
Gaetano Filice (Pavia, Italy)
Piero Marone (Pavia, Italy)
Giuseppe Miragliotta (Bari, Italy)
Guido Scalia (Catania, Italy)
Arsenio Spinillo (Pavia, Italy)
Mauro Stronati (Pavia, Italy)
Lina Tomasoni (Brescia, Italy)

TOPICS

Day 1 - Assessing the burden of congenital toxoplasmosis in 2019

- Epidemiology
- Short-term outcome:
 - In fetuses
 - In newborns
- Long-term outcome:
 - Ocular toxoplasmosis
 - Immune response
 - Neuro-psychiatric effects
- Case reports

Day 2 - Reducing the burden of congenital toxoplasmosis

- Improvement of diagnostics and management
- Toxo-free meat
- Vaccine strategy
- Prenatal education
- Prenatal screening
- Neonatal screening
- Estimation of cost efficacy of different screening programs

Day 3 - Improving our knowledge of congenital toxoplasmosis

- Guidelines for congenital toxoplasmosis: myth or reality?
- Patient stories and internet fake news
- From ICOCT 2000 to ICOCT 2019: why the same questions congress after congress?