

compromessi, ed i test immunocromatografici. Il citocentrifugato è una tecnica di facile esecuzione, non invasiva e dotata di buona sensibilità e specificità; per questi motivi può essere utilizzato come screening preliminare per i soggetti con sospetta leishmaniosi viscerale ed anche nel follow-up post-terapeutico.

Per quanto riguarda l'evidenziazione di anticorpi specifici, il test immunocromatografico che sfrutta l'antigene ricombinante K39, derivato da una sequenza altamente conservata evidenziata originariamente in *L.chagasi* (oggi sinonimo di *L.infantum*), ma comune anche a *L.donovani*, si è rivelato sensibile (86-100%) e specifico (82-100%), con alcune limitazioni legate soprattutto a false negatività in soggetti HIV-positivi, e a differenti gradi di sensibilità correlati all'epidemiologia di *Leishmania* spp.

I test in PCR su sangue periferico si sono dimostrati estremamente sensibili e specifici sia su pazienti normoergici che ipoergici.

Amebosi – Nell'ambito delle infezioni da *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* le tecniche diagnostiche laboratoristiche si sono arricchite in questi anni di tests immunocromatografici ed immunoenzimatici in grado di evidenziare direttamente dal campione fecale il complesso delle 2 specie "gemelle" ed anche di identificare specificamente la sola *E.histolytica* patogena. Tali tests si basano sull'impiego di anticorpi monoclonali contro determinanti antigenici di superficie (lectine, serine ecc.), presenti in *E.histolytica*. Il limite principale di queste tecniche è rappresentato dal fatto che gli Ag rilevabili sono patrimonio delle sole forme vegetative, non delle cisti. Per tale motivo la % di sensibilità del test si abbassa notevolmente nei portatori asintomatici di *E.histolytica*, nelle cui feci sono solitamente presenti solo forme cistiche.

Le tecniche in PCR hanno avuto un notevole sviluppo anche nell'ambito delle infezioni amebiche, anche se i tests biomolecolari effettuati su materiale fecale risentono della presenza di numerosi inibitori.

Giardiosi e criptosporidiosi – Anche per queste infezioni protozoarie intestinali sono state messe a punto metodiche diagnostiche rapide - evidenzianti antigeni di superficie - quali tests di immunofluorescenza diretta, tests immunocromatografici ed immunoenzimatici su campioni fecali freschi o congelati. La sensibilità e specificità di queste tecniche si sono rivelate decisamente elevate in molti studi epidemiologici.

In conclusione, le tecniche di diagnosi rapida rappresentano un valido apporto metodologico nell'ambito di molte infezioni parassitarie; tuttavia in alcuni casi, segnatamente le infezioni malariche e le leishmaniosi, non possono essere ancora considerate un'alternativa assoluta ai metodi diretti, anche se può risultare utile il loro utilizzo ad integrazione dei protocolli diagnostici convenzionali. Per contro, in riferimento alle patologie parassitarie intestinali, tali nuovi tests si segnalano come possibile alternativa sensibile e specifica ai metodi tradizionali.

S8.6

INDAGINI MOLECOLARI AVANZATE PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI INFEZIONI DA PROTOZOI

Calderaro A.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università di Parma.

Diverse indagini molecolari avanzate si stanno dimostrando sempre più utili nella diagnosi di laboratorio di infezione da microrganismi patogeni di interesse medico, quando opportunamente affiancate a quelle tradizionali, dirette (microscopia, coltura) e indirette, (ricerca di anticorpi specifici). In questo studio verranno presentati, a titolo esemplificativo, i risultati ottenuti presso il nostro laboratorio durante la messa a punto, validazione e applicazione di indagini molecolari avanzate alla diagnosi di laboratorio di infezioni sostenute da protozoi di interesse medico (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, plasmodi della malaria, *Toxoplasma gondii*).

Infezioni da *E. histolytica* e *E. dispar* - Nel nostro laboratorio la diagnosi di infezione da *E. histolytica* viene correntemente effettuata mediante metodo tradizionale (esame colturale ed esame microscopico) affiancati da una reazione di amplificazione genica (PCR "rRNA-ssu") rapida, sensibile e specifica. Soltanto grazie all'uso del metodo molecolare sono stati diagnosticati alcuni casi di amebiasi che altrimenti sarebbero stati misconosciuti: nel primo caso, è stato dimostrato il DNA di *E. histolytica* nell'aspirato da ascesso epatico di un paziente con addome acuto e appendicite complicata di incerta eziologia; in un secondo caso, il DNA del protozoo è stato evidenziato in prelievi biopsici della mucosa colica di un paziente contemporaneamente al DNA di batteri enteropatogeni (*B. pilosicoli* e *B. aalborgi*) dimostrando, per la prima volta in assoluto, una coinfezione da ameba e spirochete intestinali. Inoltre, con questo metodo molecolare è stato possibile identificare *Entamoeba dispar*, ameba intestinale non patogena e morfologicamente indifferenziabile da *E. histolytica*, isolata in coltura e/o osservata in preparati microscopici diretti da campioni di feci di pazienti con sospetta parassitosi intestinale.

Infezioni da plasmodi della malaria (*P. falciparum* (*P.f.*), *P. vivax* (*P.v.*), *P. malariae* (*P.m.*) e *P. ovale* (*P.o.*)) - Una reazione di amplificazione genica (nested-PCR specie-specifica, 18S rDNA) per la diagnosi di laboratorio di malaria, utilizzata nel nostro laboratorio da circa 5 anni a fianco delle indagini tradizionali e valutata su 443 campioni di 325 pazienti, si è rivelata più sensibile e specifica dell'esame microscopico, soprattutto nei casi di bassa parassitemia, e ha consentito di diagnosticare infezioni miste altrimenti

non rivelabili. Inoltre, da circa 1 anno è in uso quotidiano nel nostro laboratorio la real-time PCR ("18S rDNA"), valutata per *Plasmodium spp.* e per *P.f.*, *P.v.* e *P.o.* su 163 campioni di sangue da pazienti con sospetta malaria, che si è rivelata sensibile, specifica, rapida, di semplice esecuzione. Per i notevoli vantaggi offerti da questo sistema, esso ha sostituito la nested-PCR per l'identificazione di *P. spp.* e dei tre plasmodi *P.f.*, *P.v.* e *P.o.* e attualmente, la reazione nested-PCR è in uso esclusivamente per la ricerca e identificazione di *P. malariae*. La disponibilità di tali metodi molecolari avanzati ha consentito di organizzare in modo proficuo il flusso di lavoro. In particolare, la real-time PCR eseguita parallelamente all'esame microscopico e ad un saggio immunocromatografico rapido per la ricerca degli antigeni di plasmodi su tutti i campioni pervenuti in laboratorio per sospetta malaria, permette in un tempo rapido (3 ore) e con un costo di 30-40 Euro per reazione, di ottenere una conferma del risultato microscopico soprattutto nei casi critici (bassa parassitemia, infezioni miste).

Infezioni da *T. gondii* - Solo grazie all'uso di una reazione di amplificazione genica (nested-PCR specie-specifica, "gene B1") è stato possibile diagnosticare un caso di toxoplasmosi cerebrale in un paziente immunodepresso con sierologia di dubbia interpretazione e sospetta toxoplasmosi all'esame istopatologico e di escludere l'infezione in altri casi di sospetta toxoplasmosi congenita. La nested-PCR viene vantaggiosamente impiegata (su campioni di liquido cefalo-rachidiano, sangue periferico e materiale biotico), infatti, nel nostro laboratorio per la diagnosi di toxoplasmosi in quei casi in cui i metodi indiretti (sierologia) sono poco affidabili come può accadere nei soggetti immunocompromessi oppure per porre una diagnosi prenatale (liquido amniotico).

In conclusione, la descrizione di tutti questi casi vuole soprattutto richiamare l'attenzione sul ruolo fondamentale che hanno assunto le indagini molecolari nel Laboratorio di Parassitologia Clinica grazie alle quali è possibile effettuare una rapida e corretta diagnosi utilizzando anche campioni biologici per i quali le indagini parassitologiche tradizionali potrebbero fornire risultati non interpretabili (esempio campioni prelevati durante o dopo la somministrazione di terapia antiparassitaria, campioni prelevabili in quantità ridotta non sufficiente per indagini tradizionali).