

**P140****DIAGNOSI MOLECOLARE DI MENINGO-ENCEFALITE AMEBICA PRIMARIA**

Dal Bello F., Tommasini T., Cusinato R., Mengoli C., Franchin E., De Canale E.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche  
U.O. di Microbiologia e Virologia  
Complesso Convenzionato Azienda Ospedaliera -  
Università Padova.

Piccole amebe a vita libera, diffuse in tutti i continenti, appartenenti ai generi *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Balamuthia* possono causare infezioni del SNC.

Tradizionalmente la diagnosi di queste infezioni richiede l'identificazione morfologica e/o l'isolamento colturale dei protozoi. In occasione di un recente caso clinico le indagini molecolari hanno dato un contributo determinante all'identificazione di specie del protozoo e hanno confermato il dato microscopico positivo a fronte di un esame colturale negativo per amebe ambientali.

Il caso clinico riguarda un ragazzo deceduto nell'arco di pochi giorni con sintomi di interessamento del SNC che nei giorni precedenti il ricovero si era bagnato nelle acque di un fiume.

Nel mese di luglio dell'anno 2003 è giunto alla nostra osservazione un campione autoptico di materiale cerebrale dopo circa 40 ore dal decesso. Gli esami colturali per batteri e miceti hanno dato esito negativo, come pure le ricerche di micobatteri e virus neurotropi eseguite con indagini colturali e molecolari. Contemporaneamente sono stati allestiti esami colturali per amebe ambientali e preparati per microscopia ottica.

L'osservazione dei preparati colorati al Gram e al Giemsa, oltre ai polimorfonucleati neutrofilici, ha permesso di rilevare la presenza di numerosi elementi cellulari che per le loro proprietà morfotintoriali sono stati classificati come trofozoiti di amebe ambientali.

La ricerca colturale di amebe ambientali su terreni xenici è rimasta negativa, mentre il controllo positivo di crescita, costituito da cisti di *Acanthamoeba castellanii* ha dato luogo allo sviluppo di numerosi trofozoiti.

Il DNA genomico è stato estratto da biopsia cerebrale usando un kit QiaAmp (Qiagen, Hilden, Germany). È stato quindi amplificata la regione completa della Internal Transcribed Unit ribosomiale (ITS) usando due coppie di primers localizzati nelle subunità *small* (SSU) e *large* (LSU) del gene rRNA. Il ceppo del campione in esame ha mostrato un match perfetto (similarità  $\geq 99$  %) con le sequenze dei ceppi di *Naegleria fowleri* presenti in GenBank.

L'estate dell'anno 2003 alle nostre latitudini è stata caratterizzata da temperature particolarmente elevate che hanno riscaldato le acque dolci ed hanno creato le condizioni ambientali ideali per la selezione e la moltiplicazione di protozoi termofili come *Naegleria fowleri* in grado di tollerare temperature dai 40 ai 45°C. La larga distribuzione ambientale rende molto probabile il contatto di questi protozoi con l'uomo; pertanto in particolari zone a rischio e nel corso di periodi dell'anno caratterizzati da alte temperature e scarse precipitazioni le autorità competenti sono tenute ad avvisare la cittadinanza di non bagnarsi in acque libere di superficie dolci e poco profonde.

**P141****VALUTAZIONE DI UN NUOVO SISTEMA PER LA CONCENTRAZIONE DEI PARASSITI INTESTINALI**

De Canale E., Tessari A., Lo Russo L., Campion L.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche  
U.O. di Microbiologia e Virologia  
Complesso Convenzionato Azienda Ospedaliera -  
Università Padova.

Il test Para-Pak SpinCon (Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, Ohio) è un sistema per la concentrazione dei parassiti intestinali a partire da campioni fecali raccolti in liquido fissativo.

Il test SpinCon è stato progettato per eseguire la concentrazione dei parassiti senza l'utilizzo di sostanze potenzialmente pericolose, ma sfruttando le piccole dimensioni dei parassiti. Il materiale fecale, fissato e trattato con il surfattante, nel corso di un'unica centrifugazione (1800-2200rpm x 10min.) viene lasciato filtrare attraverso 2 griglie metalliche a porosità decrescente e mentre la maggior parte del materiale fecale da eliminare viene trattenuto dalle 2 griglie i parassiti vengono concentrati sul fondo di una provetta conica. Questo nuovo sistema è stato da noi paragonato al tradizionale metodo di arricchimento FEA (formalina-etere/etilacetato); ventiquattro campioni fecali positivi per parassiti intestinali, raccolti in SAF (sodio acetato-acido acetico-formalina), sono stati esaminati in doppio con i due sistemi in modo da verificare il recupero di trofozoiti, cisti, uova e larve di elminti. Tre parassitologi esperti hanno conteggiato il numero totale di parassiti contenuti in aliquote di 10 microlitri di sospensione fecale. Di ogni campione sono state osservate tre aliquote ad alto ingrandimento (400X) con l'ausilio di vetrini coprioggetto di 22x22 mm. ed il numero totale dei parassiti riportato è in realtà la media delle tre osservazioni e dei campioni esaminati.

Vengono di seguito riportati il numero di organismi osservati rispettivamente nei campioni non concentrati (baseline), concentrati mediante FEA e SpinCon: trofozoiti di *Entamoeba histolytica/dispar* 8/10/11; trofozoiti di *Dientamoeba fragilis* 45/50/55; cisti di *Entamoeba coli* 7/10/11; cisti di *Giardia lamblia* 18/45/50; uova di *D. latum* 2/5/5; uova di *Ascaris lumbricoides* 3/6/6; uova di *Schistosoma mansoni* 1/2/2; uova di *Taenia* sp. 33/45/52; uova di *H. nana* 2/4/4; larve di *Strongyloides stercoralis* 1/2/2.

Abbiamo notato nei campioni concentrati con lo SpinCon lievi alterazioni della morfologia come: uova parzialmente decorticate di *Ascaris lumbricoides*, uova di *D. latum* con opercoli aperti e larve di *Strongyloides stercoralis* con tagli da trauma meccanico. Tuttavia, il nuovo sistema è pratico e veloce e il campione concentrato si presenta omogeneo e privo di detriti grossolani. SpinCon rappresenta una valida alternativa ai tradizionali sistemi di concentrazione che utilizzando prodotti chimici potenzialmente tossici, oltre a rappresentare un pericolo per gli operatori sanitari, richiedono un impegno economico per un adeguato smaltimento dei rifiuti.