

mente (come *C. krusei*) e la resistenza progressiva, dovuta ad alterazioni delle strutture o funzioni cellulari bersaglio degli antifungini, in pazienti sottoposti per tempi lunghi a questi farmaci (AIDS, trapiantati di midollo osseo).

La terapia delle candidosi può essere oggi guidata dai test di suscettibilità in vitro. I test di suscettibilità a *Candida* sono particolarmente utili quando si tratta di ceppi di *Candida non-albicans* isolati da infezioni profonde, soprattutto se i pazienti sono stati già trattati con azoli. Nelle vaginite complicate il test di suscettibilità al fluconazolo è inutile: 1) perché sono rari i ceppi di *C. albicans* resistenti, 2) perché non esiste una correlazione tra fallimento terapeutico e suscettibilità all'antifungino e 3) perché le specie non-*albicans* non devono essere trattate con fluconazolo e frequentemente rispondono invece all'acido borico o alla 5-fluorocitosina topica.

Per i lieviti, negli USA, il NCCLS ha sviluppato la metodologia di microdiluzione in brodo, descritta nel documento M27-A2 (2002), e più recentemente la disco-diffusione al fluconazolo nel documento NCCLS M44-P (2003). In Europa l'EUCAST (2002) ha descritto un metodo di microdiluzione in brodo, escludendo il test per l'amfotericina B (AMB), con alcune varianti rispetto al M27 (micropiastre a fondo piatto, inoculo maggiore, aggiunta del 2% di glucosio) e che presenta alcuni vantaggi rispetto al NCCLS, come la riduzione del tempo di incubazione per la maggior parte delle specie a 24 h e conseguente riduzione del fenomeno di trascinarsi. Breakpoints interpretativi per *Candida* spp (non per *Cryptococcus* spp) sono stati segnalati per 5-fluorocitosina, fluconazolo e itraconazolo, ma non per l'AMB. La metodica NCCLS non è in grado di differenziare i ceppi resistenti da quelli sensibile all'AMB, e sembra che le metodiche in agar diluizione come l'Etest abbiano una maggiore potenzialità. Comunque la maggior parte delle *Candida* isolate rimangono suscettibili all'AMB anche se alcuni ceppi di *C. glabrata* e *C. krusei* richiedono la massima dose di AMB. La concordanza tra le metodiche NCCLS e altri metodi commerciali è in genere elevata con la metodica colorimetrica Yeast-One® e l'Etest®. Diversi studi di test di suscettibilità comparativa sono stati eseguiti anche con i nuovi triazolici (voriconazolo, posaconazolo e ravuconazolo) e con le echinocandine, in particolare con caspofungina. La determinazione della concentrazione minima inibente della caspofungina (lettura ad inibizione completa) presenta ancora problemi tecnici e risulta talvolta difficile da determinare con le metodiche in brodo.

I test di suscettibilità per alcuni funghi filamentosi sono descritti dal NCCLS nel documento M38-A (2002) con metodica di microdiluzione in brodo. Sono in corso studi comparativi con metodiche commerciali.

Le concentrazioni nel sangue dei farmaci antifungini vengono misurati per due ragioni: per assicurare una

adeguata concentrazione del farmaco e per evitare concentrazioni che possano causare effetti collaterali indesiderati. Le metodiche utilizzate per misurare le concentrazioni dei farmaci antifungini più precise si basano nella determinazione dei singoli antifungini, anche in presenza di terapia combinata, mediante high-performance liquid chromatography (HPLC) e risulta particolarmente importante quando si esegue la terapia con itraconazolo orale o con gli altri azoli (fluconazolo, voriconazolo) in associazione con farmaci che interagiscono con loro.

S8.4

SIEROLOGIA DELLE ASCARIDIASI LARVALI

Petithory J.C.*, Cutrupi V.

**Gonesse, Francia; Tione, Italia*

Nell'ascaridiasi umana da *Ascaris lumbricoides* i vermi divengono adulti nell'intestino e la diagnosi viene posta con la scoperta delle uova nelle feci.

Questa parassitosi è praticamente scomparsa nei paesi industriali, ed è in diminuzione nei paesi in via di sviluppo poiché le misure igieniche (eliminazione delle feci nelle latrine) hanno avuto notevole successo.

Diverse specie di nematodi facenti parte della superfamiglia ascaridoidea (Anderson) continuano ad infestare l'Uomo dopo ingestione di uova larvate.

I parassiti non raggiungono lo stadio adulto e le larve sono all'origine di diverse patologie. La difficoltà di trovare le larve e di identificarle ha portato allo sviluppo della diagnostica sierologica che risulta molto complessa per le parentele antigeniche tra i nematodi.

Le toxocarasi sono, attualmente, le più frequenti ascaridiasi larvali. Sono sostenute per i due terzi dei casi da *Toxocara canis* e per un terzo da *Toxocara cati*, rari casi sono dovuti a *T. vitulorum*. E' necessario utilizzare diversi antigeni Escretori - Secretori larvali per raggiungere la diagnosi della specie in causa, mediante immunoelettroforesi e/o immunoblot. Le larve di *Toxocara* sp. Dopo aver migrato nell'organismo s'incistano e rimangono vive per molto tempo fornendo una sierologia positiva per almeno 30 anni. I cuccioli dei cani vengono trattati (albendazolo, fenbendazolo, tiabendazolo...) a 2 e a 8 settimane dalla nascita ciò porterà alla scomparsa della toxocarasi canina negli anni prossimi. Tra i gatti il trattamento farmacologico meno frequente e le facili reinfestazioni causano il persistere della parassitosi.

Baylisascaris procyonis nematode dell'orsetto lavatore è all'origine nell'Uomo di frequenti e gravi infestazioni del sistema nervoso in America e recentemente in Europa (Germania). Le numerose larve permettono la loro scoperta ma la diagnosi è solo sierologica.

Porrocaecum ensicaudatum ascaride degli uccelli, merli in particolare, è cosmopolita. E' spesso ritrovato nell'intestino dei giovani merli. Abbiamo ottenuto delle reazioni sierologiche positive in immunoelettroforesi con antigene larvale in un paziente oligofrenico di Arco (TN).

Anisakis simplex, ascaride del pesce parassita nel 50-90% le aringhe, gli sgombri, i merluzzi ed è all'origine di patologie intestinali gravi ma rare nell'Uomo. La diffusione degli antigeni nella carne dei pesci provoca frequentemente fenomeni orticarioidi nell'Uomo dopo il consumo. La sola dimostrazione sierologica mediante immunoblot può evidenziare l'etiologia parassitaria. Le specie di ascaridi parassiti dei roditori, uccelli, pesci... non possono essere trattati negli animali ospiti saranno quindi le ascaridiasi del futuro.

S8.5

ITESTS RAPIDI NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

¹Gatti S., ²Scaglia M.

¹Laboratorio di Parassitologia, Servizio di Virologia, IRCCS San Matteo, Pavia

²Dipartimento di Malattie Infettive, Università - IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Con il progredire delle conoscenze scientifiche, anche nell'ambito delle infezioni-infestazioni parassitarie, oltre che per vari altri microrganismi, si è manifestata sempre più imperativamente la necessità di disporre di nuove metodologie diagnostiche in grado di affiancare o addirittura sostituire tecniche convenzionali, rappresentate nella maggior parte dei casi in parassitologia dall'identificazione microscopica diretta del patogeno o dall'isolamento culturale dello stesso. I principali requisiti che devono o dovrebbero contraddistinguere questi nuovi approcci diagnostici sono semplicità e rapidità di esecuzione, elevata sensibilità e specificità ed, eventualmente, costi contenuti.

In effetti, da qualche tempo sono stati messi a punti e disponibili anche in commercio vari tests diagnostici rapidi principalmente per malaria, leishmaniosi, amebiosi, giardiosi e criptosporidiosi.

Malaria - Le più recenti tecniche diagnostiche rapide comprendono la microscopia in fluorescenza, i test immunocromatografici su "strip" di nitrocellulosa ed i test biomolecolari. L'utilizzo della microscopia in fluorescenza è stata proposta come metodo alternativo all'osservazione microscopica classica dello striscio di sangue periferico; vengono utilizzati allo scopo alcuni coloranti fluorescenti che presentano una spiccata affinità per gli acidi nucleici cellulari. I fluorocromi maggiormente utilizzati sono l'arancio di acridina (test

Quantitative Buffy Coat, QBC; test di Kawamoto) e la benzotiocarbosipurina; essi hanno una lunghezza d'onda di eccitazione di 490 nm ed emettono entrambi una fluorescenza verde mela. Sono metodiche relativamente rapide e semplici oltre che dotate di ottima sensibilità e specificità, sovrapponibili in questo all'esame microscopico su goccia spessa. In particolare la sensibilità in infezioni con parassitemia < 100 parassiti/μl varia tra 41 e 93%; la specificità nelle infezioni da *P.falciparum* è eccellente (> 90%), mentre per le altre specie malariche si è rivelata decisamente inferiore (circa 50-52%). Gli svantaggi sono rappresentati da: necessità di apparecchiature dedicate (centrifuga da microematocrito, microscopio a fluorescenza); aspecificità del fluorocromi; impossibilità di effettuare con sicurezza diagnosi di specie in tutti i casi.

I tests immunocromatografici "a cattura" per determinanti antigenici specifici sono in grado di rilevare anche parassitemie più basse di quelle valutabili microscopicamente e sono completabili in non più di 10-15 minuti. I determinanti specifici che vengono ricercati con queste tecniche sono un antigene proteico (cosiddetta proteina ricca di istidina-2; HRP-2), idrosolubile e specifico di *P.falciparum*, e l'enzima lattico-deidrogenasi (pLDH), presente in isomeri distinti per le 4 specie plasmodiali interessanti la patologia umana. Tali antigeni sono prodotti sia dalle forme asessuate che sessuate dei parassiti malarici. I tests di II e III generazione in questo campo hanno migliorato la loro sensibilità e presentano un valore limite di identificazione paragonabile a quello di un esperto microscopista (100-200 parassiti/μl). I limiti, soprattutto per i test che vanno a rilevare HRP-2, sono rappresentati da: specificità dell'Ag per *P.falciparum*, quindi incostante rilevazione in caso di infezione da plasmodi non-*falciparum*; persistenza di HRP-2 nel sangue circolante dopo negativizzazione emoscopica a seguito di terapia specifica. In compenso le cross-reazioni con fattore reumatoide che erano una costante o quasi con i tests di I generazione, non costituiscono più problemi legati a false positività.

Un altro approccio diagnostico innovativo per le infezioni malariche è rappresentato dall'identificazione di sequenze nucleotidiche specifiche per *Plasmodium* spp. Sono state sviluppate svariate tecniche in PCR e sono stati proposti differenti "target" specifici, quali il gene codificante per la sub-unità 18S rRNA, per la proteina circumsporozoitica, ecc. Il vantaggio maggiore di queste tecniche biomolecolari è rappresentato dalla estrema sensibilità: il limite di rilevazione è di circa 5 parassiti/μl con il 100% di specificità. Le problematiche in questo caso sono legate alla necessità di disporre di locali idonei, di personale esperto ed al costo delle indagini stesse.

Leishmaniosi - Metodi rapidi e relativamente "nuovi" per la ricerca di *Leishmania* spp. comprendono la ricerca del protozoo nel citocentrifugato da sangue periferico, specie se sono in causa pazienti immuno-