

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-

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