

P142

DIENTAMOEBA FRAGILIS E LIQUIDI FISSATIVI: VALUTAZIONE AI FINI DI UNA RAPIDA IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI.

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.

Dientamoeba fragilis (DF) è un protozoo intestinale a diffusione cosmopolita. La prevalenza di questa infestazione, negli USA e in altri paesi industrializzati, è comunemente del 2-4% nella popolazione non selezionata. Il tasso di prevalenza, tuttavia, aumenta ed è compreso tra il 19 ed il 69% in gruppi di pazienti selezionati. Scopo del nostro lavoro è di dimostrare l'importanza dell'utilizzo di un liquido fissativo adatto per la raccolta ed il trasporto del campione fecale nei casi sospetti per dientamebosi e di sottolineare l'importanza dell'addestramento al microscopio in parassitologia.

Materiali e metodi:

Dieci pazienti risultati positivi per DF hanno raccolto a domicilio quattro aliquote dal medesimo campione fecale subito dopo l'evacuazione. Le aliquote sono state raccolte in tre flaconi contenenti liquidi fissativi diversi e in uno privo di liquido. I campioni sono giunti al nostro laboratorio entro 3 ore dall'emissione e tutte le aliquote sono state immediatamente esaminate al microscopio ottico da tre parassitologi addestrati al riconoscimento di DF tramite l'esame diretto dei campioni fecali. Dieci microlitri di sospensione fecale sono stati osservati a "fresco" a 400 ingrandimenti con coprioggetto di 22x22 mm. Nel frattempo è stata eseguita la colorazione di Giemsa su tutti i campioni. I liquidi fissativi oggetto del nostro studio sono stati: SAF (sodio acetato-acido acetico-formalina), ECOFIX e FORMALINA 10%.

Risultati:

Complessivamente i trofozoiti di DF sono stati ritrovati solo nei campioni di sei pazienti e soltanto nelle aliquote raccolte in SAF ed Ecofix. Quantitativamente, il materiale conservato in SAF presentava un numero di trofozoiti per campo microscopico superiore di circa un terzo rispetto allo stesso materiale raccolto in ECOFIX. DF è stata rilevata solo in quattro campioni conservati in FORMALINA 10% ma in numero ridotto di oltre la metà rispetto ai protozoi presenti nella frazione raccolta in SAF. Solo tre campioni raccolti in assenza di liquido fissativo contenevano protozoi ma in numero ridotto di almeno un terzo rispetto al SAF.

Da un punto di vista qualitativo solo i trofozoiti conservati in SAF venivano immediatamente identificati da personale addestrato, mentre quelli conservati in ECOFIX si presentavano poco riconoscibili all'osservazione diretta perché "coartati". Al contrario i trofozoiti conservati in 10% FORMALINA apparivano come "diafanizzati" e sono stati riconosciuti a fatica anche da personale esperto. I protozoi ancora presenti nelle aliquote non "fissate" apparivano morfologicamente simili a quelli visibili nelle frazioni raccolte in SAF.

Conclusioni:

Dei liquidi fissativi da noi studiati il SAF, oltre a preservare l'integrità morfologica, appare abbastanza "aggressivo" da fissare i protozoi in atteggiamenti plastici (pseudopodi tipo "golf-club") che ne facilitano l'identificazione rapida. DF potrebbe rappresentare un parassita ideale nello studio delle proprietà "fissative" dei liquidi conservanti.

P143

LEISHMANIOSI VISCERALE: SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ DI TECNICHE DIAGNOSTICHE "CLASSICHE" E DI UNA METODICA IN "NESTED" PCRGatti S.¹, Gramegna M.², Klersy C.³, Madama S.², Bruno A.⁴, Maserati R.⁴, Bernuzzi A.M.¹, Cevini C.¹ e Scaglia M.⁴¹Lab.Parassitologia, Serv.Virologia, IRCCS S.Matteo, Pavia;²Clonit Srl, Milano;³Serv.Biom. Epidemiol.Clinica, IRCCS S. Matteo, Pavia;⁴Dip. Malattie Infettive, Università-IRCCS S.Matteo, Pavia**Scopo dello studio**

Stabilire la concordanza diagnostica di varie metodologie diagnostiche, in particolare tecniche classiche come l'identificazione microscopica e l'isolamento culturale di *Leishmania* spp., e di una "nested" PCR in 2 gruppi di soggetti, rispettivamente immunocompetenti (IC) ed immunodepressi (ID) per varie cause. Come "gold standard" è stato considerato l'insieme dei dati epidemiologico-clinici e laboratoristici dei soggetti in esame.

Pazienti e metodi

Sono stati esaminati 67 soggetti (35 IC, 32 ID di cui 18 HIV-positivi, 6 pazienti sottoposti a trapianto d'organi ed 8 affetti da emolinfopatie maligne). Il protocollo diagnostico è stato comprensivo di: a) esame microscopico diretto di strisci o apposizioni di agoaspirato midollare e/o di citocentrifugato di sangue periferico, colorati con Giemsa; b) coltura *in vitro* in terreno NNN-agar; c) screening sierologico mediante test immunocromatografico rapido (RapydTest, RT, Diasys Europe Ltd, Wokingham RG41 2QL, England), immunofluorescenza indiretta (IFAT, *Leishmania* Spot IF[®], bioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France) ed immunoblotting (Wb, *Leishmania* WB IgG[®], LDBIO Diagnostics, 69009 Lyon, France); d) "nested" PCR (Clonit Srl, Milano, Italy), con amplificazione di un segmento di 215 bp situato sul gene che codifica per la sub-unità 18S dell'RNA ribosomale. L'analisi statistica è stata effettuata con programma Stata 7.

Risultati e Considerazioni conclusive

Per 41 pazienti (61.2%) è stata confermata la diagnosi di infezione viscerale da *Leishmania* spp.; 19 soggetti erano IC, 12 HIV-positivi, 4 pazienti trapiantati e 6 erano affetti da neoplasie. L'analisi statistica ha evidenziato che nel gruppo dei soggetti IC la concordanza tra le differenti tecniche diagnostiche dirette, sierologiche e test in PCR è risultata pressoché sovrapponibile in riferimento alle percentuali di sensibilità (da 83.3 al 100%), tranne che per citocentrifugato e coltura da "buffy-coat", che hanno invece registrato tassi percentuali di concordanza inferiori (78.9 e 83.3 % rispettivamente). Al contrario, nel gruppo di soggetti ID, soprattutto se HIV-positivi, si è evidenziato che le indagini sierologiche possono essere considerate il primo "step" diagnostico in un protocollo di screening per la leishmaniosi viscerale (IFAT: sensibilità 80.9%, specificità 100%; Wb: sensibilità 95.2%, specificità 100%). Dai risultati ottenuti è stata confermata l'attendibilità della "nested" PCR, specie se eseguita su sangue periferico, nella diagnosi di leishmaniosi viscerale sia in soggetti IC che ID (sensibilità pazienti IC: 93.3%; sensibilità pazienti ID: 100%; specificità in entrambi i gruppi: 100%).