

081

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* COMPLEX IN ULCERA CUTANEA DA PAZIENTE DI RITORNO DA SOGGIORNO NELLA FORESTA AMAZZONICA.

Grande R.¹, Maraschini A.¹, Torresani E.¹, Bottini S.², Lunardon L.², Gramiccia M.³

¹UO Laboratorio Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche - Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli, Regina Elena - Milano,

²Istituto di Scienze Dermatologiche - Università degli Studi di Milano,

³MIPI - Istituto Superiore di Sanità - Roma

Introduzione. P.E., di anni 50, in buone condizioni generali, veniva visitato presso il nostro ambulatorio per un'ulcera cutanea localizzata sul dorso della mano destra dalle dimensioni di circa 2 cm. di diametro di aspetto infiltrato. Il paziente riferiva un soggiorno di circa un mese nella Foresta Amazzonica al confine tra Bolivia e Brasile nell'Agosto 2006 e di esser stato sottoposto ad una serie di esami ematochimici, biotipici e colturali per ricerca batteri e miceti presso un'altra struttura sanitaria con esito negativo. Al momento della presentazione presso il nostro Ambulatorio il paziente non era stato sottoposto ad alcuna terapia e l'ulcera osservata non mostrava tendenza alla guarigione spontanea.

Materiali e Metodi. Il paziente veniva sottoposto a tamponamento cutaneo della lesione per ricerca di batteri e miceti e ad una nuova biopsia cutanea. Veniva quindi prelevato del materiale dal bordo della lesione e seminato in terreno bifasico NNN; una porzione del materiale prelevato veniva approntata su vetrino e colorata secondo Giemsa; il preparato colorato veniva osservato in microscopia ottica a 100x. Veniva effettuato un prelievo ematico per la sierologia specifica (Western Blot LD Bio e ricerca immunocromatografica anticorpi anti rK39 DID).

Risultati. La biopsia ha evidenziato un "quadro granulomatoso suggestivo di leishmaniosi cutanea". La lettura microscopica del preparato e gli esami colturali hanno dato esito negativo. La sierologia è risultata positiva alle bande specifiche per Western Blot e negativa alla ricerca per anticorpi anti rK39. L'esame colturale per *Leishmania* ha dato esito positivo al 6° giorno di osservazione. La coltura è stata quindi inviata presso l'Istituto Superiore di Sanità dove il lisato colturale è stato sottoposto a starch gel electrophoresis per lo studio di 13 isoenzimi; il ceppo è stato identificato appartenere a uno zimodema di *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex.

Discussione. La Leishmaniosi è una malattia parassitaria trasmessa all'uomo dalla puntura di un flebotomo. I quadri clinici sono multiformi e dipendenti dalla specie di protozoo coinvolto. Il nostro report sottolinea l'importanza del prendere in considerazione la Leishmaniosi cutanea nella diagnosi differenziale per ulcere cutanee di pazienti provenienti da area endemica e, soprattutto, l'importanza dell'esame colturale e della successiva diagnosi di specie per attuare una terapia congrua.

082

SVILUPPO DI SAGGI LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) PER LA DIAGNOSI DI *TOXOPLASMA GONDII*

Meroni¹ V., Putignani² L., Russo² C., Genco¹ F., Adlerstein³ D., Menichella² D.

¹Dipartimento di Malattie Infettive, Università di Pavia, Fondazione I.R.C.C.S. Policlinico "San Matteo", Via Taramelli 5, 27100, Pavia.

²Unità di Microbiologia e Virologia, Ospedale Pediatrico e I.R.C.C.S. "Bambino Gesù", Piazza Sant'Onofrio 4, 00165, Roma.

³DiaSorin SpA Molecular Diagnostics, Via Crescentino SNC, I 3040 Saluggia (VC).

Introduzione. La toxoplasmosi è un'infezione a decorso generalmente lieve e asintomatico che può tuttavia generare gravi conseguenze se contratta da individui immunocompromessi o durante la vita fetale. E' fondamentale, pertanto, una diagnostica sensibile e specifica che permetta di individuare tempestivamente sia infezioni prenatali che disseminate tipiche del paziente immunocompromesso. Scopo dello studio è stata la progettazione di saggi LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) e la loro applicazione alla rilevazione di *Toxoplasma gondii* in campioni clinici al fine di valutarne il potenziale diagnostico.

Metodi. I saggi LAMP sono stati disegnati su porzioni interne del gene multicopie B1 (25 copie) e della regione ripetuta RE (200-300 copie) del genoma di *T. gondii*, genotipo I, ceppo RH. Il saggio LAMP RE, è stato utilizzato per analizzare in triplicato 15 campioni clinici (liquidi amniotici e sangue periferico), precedentemente caratterizzati mediante metodiche diagnostiche di Real-Time PCR e Nested-PCR seguite da "follow-up" clinico-sierologico di validazione.

Risultati. Diluizioni seriali da 10.000 a 1 copia di DNA genomico hanno mostrato linearità fino a 10 copie per il saggio B1 e fino a 1 copia per il saggio RE. Per entrambi i saggi è stata riscontrata una specificità riproducibile. Quattordici dei 15 campioni clinici analizzati mediante LAMP RE hanno prodotto risultati concordanti con quelli ottenuti coi precedenti protocolli diagnostici. Solo in un caso, risultato negativo sia in Nested-PCR che Real-Time PCR, il saggio LAMP è risultato positivo su uno dei tre replicati eseguiti.

Conclusioni. I saggi LAMP possono costituire una valida alternativa alle attuali metodiche identificative basate su PCR per la diagnosi di toxoplasmosi in gravidanza e nel paziente immunocompromesso. Inoltre, l'elevata rapidità di esecuzione del saggio (40 min), unita alle caratteristiche di sensibilità e specificità, rendono i saggi LAMP un nuovo strumento di "routine" da inserire in algoritmi diagnostici per l'identificazione precoce di toxoplasmosi.