

comunicazioni orali

SESSIONE 7

La Biologia Molecolare in microbiologia: stato dell'arte

Giovedì 21 Settembre 2006, ore 09.00 - 13.00, AUDITORIUM

CO7.1

REAL-TIME PCR E *DIENTAMOEBIA FRAGILIS*: UN APPROCCIO MOLECOLARE ALLA DIAGNOSI PARASSITOLOGICA.

De Canale E.¹, Biasolo M.A.^{1,2}, Tessari A.¹, Mengoli C.^{1,2}, Palu' G.^{1,2}.

¹Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

²Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova.

Introduzione.

Dientamoeba fragilis è un protozoo intestinale che negli ultimi anni ha suscitato un interesse crescente. Diversi autori hanno associato la presenza di questo protozoo a numerosi sintomi prevalentemente a carico dell'apparato gastrointestinale, anche se è stata riportata la presenza di portatori asintomatici. L'esecuzione dell'esame copro-parassitologico per l'identificazione di *Dientamoeba fragilis* richiede la presenza di un parassitologo esperto, appositamente addestrato al riconoscimento del trofozita mediante analisi microscopica. In questo lavoro abbiamo valutato una nuova tecnica molecolare in Real-Time PCR per la rilevazione di questo parassita.

Metodi.

lo studio ha coinvolto 26 pazienti afferiti all'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova nel corso dell'anno 2004 e risultati positivi alla ricerca di *Dientamoeba fragilis* mediante l'utilizzo dei tradizionali approcci diagnostici. Trentotto volontari sani arruolati tra gli studenti di medicina dell'università di Padova e loro congiunti sono stati considerati come controllo. I due gruppi sono stati riesaminati con una metodica originale in Real-Time PCR (TaqMan) utilizzando un singolo campione di feci per ciascun soggetto, analogamente ad un'inchiesta epidemiologica. Sul medesimo campione di feci è stato inoltre con-

dotto un esame microscopico diretto, uno dopo colorazioni permanenti e un test in PCR convenzionale.

Risultati.

nella tabella seguente sono illustrate la sensibilità e la specificità della microscopia tradizionale e delle metodiche molecolari in TaqMan e in PCR convenzionale su gel.

	Microscopia diretta su feci fissate	Microscopia su colorazione Tricromica	Microscopia su colorazione di Giemsa	PCR convenzionale su gel	Real-time TaqMan PCR
Sensibilità	92,3% (24/26)	92,3% (24/26)	42,3% (11/26)	73,1% (19/26)	100% (26/26)
Specificità	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)	100% (38/38)

Conclusioni.

Le indagini mediante la microscopia ottica presentano performance accettabili ai fini diagnostici, tuttavia la Real-Time TaqMan PCR ha dimostrato una superiore capacità di rivelare la presenza di *Dientamoeba fragilis* rispetto alle tradizionali tecniche microscopiche e alla PCR su gel. L'alto livello di sensibilità e specificità della metodica riscontrati in questo studio potrebbe rendere sufficiente il prelievo di un unico campione di feci, per il rilevamento del protozoo, con una riduzione dei costi ed evitando di manipolare sostanze ritenute tossiche nel corso dell'esecuzione delle colorazioni permanenti.

CO7.2

VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI DI RESISTENZA AGLI ANTIVIRALI NEI SOGGETTI IN TRATTAMENTO PER INFEZIONE CRONICA DA HBV: MUTAZIONI SECONDARIE INDOTTE DA LAMIVUDINA POSSONO INFLUIRE SUI SUCCESSIVI TRATTAMENTI

Crobu M.G., Ravanini P., Nicosia A.M., Grossini E., Cagliano M., Kroumova V., Di Natale C., Fortina G.

Azienda "Ospedale Maggiore della Carità"

- Novara - Laboratorio Microbiologia e Virologia

Introduzione.

Il virus dell'epatite B è causa di un elevato numero di

epatiti croniche che vengono trattate con terapie a base di farmaci antivirali, quali Lamivudina, Adefovir, Entecavir. Il trattamento con questi farmaci porta spesso all'insorgenza di varianti resistenti, che possono essere messe in evidenza con metodi di sequenziamento del gene P.

Metodi e risultati.

Riportiamo i dati relativi al monitoraggio del trattamento di 90 pazienti in terapia con Lamivudina o Adefovir per un periodo di due anni.

Nel caso delle resistenze a Lamivudina, dopo due anni, il 58% dei pazienti (52 casi) non dimostrava la presenza di mutazioni di resistenza. Invece in 12 casi (13%) è risultata presente la singola mutazione M204I; in 8 casi (9%) le due mutazioni M204I e L180M; in 16 casi (18%) le due mutazioni M204V e L180M; e in 2 casi (2%) le tre mutazioni M204I, L180M, V173L.

Solo 4 di questi 90 pazienti sono stati trattati anche con Adefovir per almeno due anni. Tra questi, solo un caso è risultato positivo per le due mutazioni A181V e N236T. Interessanti però sono i dati relativi alla comparsa di altre mutazioni, in corso di terapia con Lamivudina, e che potenzialmente possono pregiudicare i successivi eventuali trattamenti con altri farmaci antivirali.

In 13 casi su 90 (14%) sono comparse le mutazioni A181S (1 caso), Q215S (10 casi), V214A (1 caso) e I233V (1 caso). Queste mutazioni possono essere responsabili di resistenza ad Adefovir.

In 9 casi su 90 (10%) sono comparse le mutazioni M250L (3 casi), M250V (1 caso), T184S (4 casi) e T184I (1 caso). Queste mutazioni possono essere responsabili di resistenza ad Entecavir.

Conclusioni.

Questi dati ci indicano come la valutazione complessiva del pannello di resistenza sia importante per indirizzare una corretta scelta clinica della terapia da utilizzare in caso di fallimento del primo trattamento. La rilevazione di tutte queste mutazioni dovrebbe essere quindi inclusa nei sistemi diagnostici in uso, e i metodi di sequenziamento appaiono i più adatti ad una implementazione di questo tipo senza influire su un aumento dei costi o dei tempi operativi.

CO7.3

LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA

Calderaro A., Gorrini C., Piccolo G., Peruzzi S., Bommezzadri S., Dettori G., Chezzi C.

*Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.*

Introduzione.

Diversi metodi molecolari, affiancati a quelli tradizio-

nali, si sono dimostrati utili durante 5 anni di applicazione alla diagnosi di laboratorio di parassitosi causate da protozoi.

Metodi.

Sono stati applicati per la ricerca del DNA di protozoi i seguenti metodi: PCR e/o nested PCR convenzionale, Real-time PCR (TaqMan; FRET).

Risultati.

Diagnosi di amebiasi. Solo grazie ai metodi molecolari (PCR convenzionale e Real-time PCR chimica FRET), è stata correttamente rilevata la prevalenza di casi di amebiasi (infezione da *E. histolytica* 0,6%) e dei casi di infezione da *E. dispar* (0,8%). I metodi diagnostici tradizionali (esame microscopico e colturale) non consentono la differenziazione dei casi di amebiasi dai casi di infezione da *E. dispar* (non patogena).

Diagnosi di malaria. La diagnosi di malaria mediante esame microscopico è affiancata, nel nostro laboratorio, da nested PCR e/o Real-time PCR. I metodi molecolari si sono rivelati sensibili, specifici (rivelando infezioni miste), rapidi, di semplice esecuzione ed automatizzati (Real-time PCR). I risultati ottenuti hanno dimostrato la seguente prevalenza: *P. falciparum* 80% (esame microscopico 78%), *P. vivax* 2% (esame microscopico 5,4%), *P. ovale* 9,2% (esame microscopico 6,8%), *P. malariae* 2% (esame microscopico 0%), infezioni miste (causate da 2 o più plasmodi) 6,5% (esame microscopico 1,3%), *Plasmodium spp.* 0% (esame microscopico 5,4%).

Diagnosi di toxoplasmosi. La diagnosi di toxoplasmosi mediante metodi molecolari [PCR convenzionale, Real-time PCR (Taqman e FRET)] si è rivelata indispensabile in un caso di infezione cerebrale in un paziente immunodepresso e per escludere l'infezione in casi di sospetta toxoplasmosi congenita.

Diagnosi di leishmaniosi. Soltanto il saggio Real-time PCR (FRET) ha permesso di diagnosticare 1 caso di leishmaniosi viscerale non rivelata dal metodo colturale e di escludere la diagnosi in casi sospetti (59).

Conclusioni.

L'applicazione dei metodi molecolari ha notevolmente migliorato l'accuratezza della diagnosi di infezione da questi protozoi consentendoci anche di valutare la corretta prevalenza delle rispettive parassitosi nella nostra realtà.