
CO8.2

**QUANTIFICAZIONE MEDIANTE
REAL-TIME PCR DI GENI DI
TOXOPLASMA GONDII IN PAZIENTI
AIDS CON ENCEFALITE
TOXOPLASMICA (ET) RIATTIVATA**

**Seraceni S., Eudes* N., Peyron F. *,
Giuliodori M., Marchetti D., Cultrera R.,
Contini C.**

Sezione di Malattie Infettive, Dipartimento di Medicina
Clinica e sperimentale, Università di Ferrara.

*Laboratoire de Parasitologie et Pathologie Exotique,
Université Claude Bernard, Lyon, France

La Real-time PCR è stata finalizzata principalmente alla ricerca del gene B1 di *T. gondii*, mentre non sono stati finora esplorati geni coinvolti nello *switch* bradizoita-tachizoita della fase di riattivazione dell'infezione, in pazienti con AIDS.

Obiettivi. Ci siamo prefissi lo scopo di quantificare tramite Real-time PCR (Light Cycler, Roche) la presenza di geni di *T. gondii* stadio-specifici (SAG4, MAG1) in campioni di liquor cefalorachidiano (LCR) di pazienti AIDS con ET, precedentemente testati in n-PCR (1).

Metodi. Sono stati analizzati 39 LCR da 34 pazienti con AIDS (1° episodio di ET o riattivazione). La Real-Time Lyght Cycler PCR (LC-PCR) è stata eseguita impiegando l'LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche). La curva dello standard (CS), inserita in ogni Real-time come riferimento, è stata ottenuta clonando i prodotti PCR amplificanti i diversi geni (B1, SAG4, MAG1), del ceppo di controllo RH di *T. gondii*. I risultati sono stati espressi esaminando la soglia di rilevazione del segnale di fluorescenza (Crossing point -Cp). Il Cp di ogni campione è stato rapportato alla concentrazione del parassita ottenuta dalla CS, ottenendo per interpolazione, la quantificazione di *T. gondii*.

Risultati: 18 (46%), 12 (31%) e 16 (41%) positività sono state riscontrate con la n-PCR per i geni B1, SAG4 e MAG1, rispettivamente; 20 (51%), 9 (23%) e 12 (31%) positività sono state invece ottenute con la LC-PCR per gli stessi geni. Valori percentuali concordanti sono stati ottenuti con entrambe le metodiche con ciascun gene in un'elevata percentuale di casi. In generale, percentuali di positività e statisticamente significative sono state ottenute nei pazienti con recidive di ET rispetto a quelli con 1° episodio.

Conclusioni. L'LC-PCR è apparsa più specifica della n-PCR. La CS tuttavia influisce sulla sensibilità della quantificazione. Infatti, mentre per il gene B1 la concentrazione protozoaria captata con l'LC-PCR è risultata assai bassa (circa 10³), per i geni SAG4 e MAG1,

si è dimostrata più elevata, (10³-10⁴). L'applicazione della LC-PCR effettuata con geni bradizoita specifici può assumere un importante valore nel determinare la carica di DNA parassitario e la sua cinetica nei diversi momenti dell'infezione ed in particolare in pazienti che hanno praticato terapia o profilassi specifica.

BIBLIOGRAFIA

1. Contini C., et al. The role of stage-specific oligonucleotide primers in providing effective laboratory support for the molecular diagnosis of reactivated *Toxoplasma gondii* encephalitis in patients with AIDS. *J Med Microbiol* 2002; 51: 879-890.

Lavoro eseguito con i contributi di FEMS Fellowship prize (2003-2004), MIUR 2003, CARIFE e CARICE (2003-2004)

CO8.3

**PARASSITOSI INTESTINALE
ASSOCIATA A SPIROCHETOSI
INTESTINALE:
DESCRIZIONE DEI PRIMI CASI.**

**Calderaro A., Incaprera M., Bommezzadri S.,
Piccolo G., Zuelli C., Villanacci V.,
Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G.,
Chezzi C.**

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio,
Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;
Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica,
Spedali Civili, Università degli Studi di Brescia.

Infezioni miste da patogeni intestinali coinvolti nell'insorgenza di malattie gastrointestinali compaiono frequentemente nei paesi con basse condizioni igienico-sanitarie e spesso rimangono non diagnosticate a causa della mancanza di adeguati metodi di laboratorio. In questo lavoro descriviamo 7 casi di spirochetosi intestinale da *Brachyspira pilosicoli* e/o *Brachyspira aalborgi* associata a parassiti in pazienti immigrati o italiani viaggiatori in paesi in via di sviluppo che presentavano diarrea persistente e dolori addominali di incerta eziologia.

Vengono descritti casi di spirochetosi intestinale da *B. pilosicoli* associati alla presenza di parassiti patogeni (*Giardia intestinalis* e *Schistosoma mansoni*), casi di spirochetosi intestinale da *B. aalborgi* associata a protozoi patogeni (*Giardia intestinalis*) e casi di spirochetosi intestinale da *B. pilosicoli* + *B. aalborgi* associata a protozoi patogeni (*Entamoeba histolytica*).

Inoltre, vengono descritti casi di spirochetosi intestinale associata a protozoi non patogeni (*Chilomastix mesnili* e *Entamoeba dispar*) o ad incerta patogenicità (*Blastocystis hominis*).

In tutti questi casi l'associazione tra i metodi tradizio-

nali (osservazione microscopica ed esame colturale) e le indagini molecolari (RFLP-PCR per l'identificazione delle spirochete e PCR per l'identificazione di *E. histolytica* ed *E. dispar*), condotte direttamente sui campioni biologici (feci e biopsie coliche), ha consentito una rapida e corretta diagnosi.

La descrizione di questi casi vuole soprattutto richiamare l'attenzione sul ruolo fondamentale che hanno assunto le indagini molecolari nel Laboratorio di Microbiologia Clinica. Nei casi descritti infatti, hanno permesso di porre una rapida e corretta diagnosi consentendo anche di escludere in un caso il sospetto di morbo di Chron.

Per questo motivo abbiamo valutato un ulteriore saggio di nested-PCR (nested-PCR 2002) recentemente descritto in letteratura appositamente per la identificazione di plasmodi della specie *P. ovale* mutati nel gene 18S. Verranno a questo proposito descritti i risultati ottenuti analizzando campioni di pazienti con sospetta malaria mediante nested-PCR 2002 comparativamente ai saggi nested-PCR 1993 e Real-time PCR, al fine di verificare quale saggio tra questi possa essere il più affidabile e specifico da utilizzare per la diagnosi di laboratorio di malaria come supporto all'indagine microscopica.

CO8.4

VALUTAZIONE DI METODI DI RIFERIMENTO PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DI MALARIA

Calderaro A., Piccolo G., Zuelli C., Perandin F.¹, Manca N.¹, Ricci L.², Arcangeletti M.C., Medici M.C., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;
¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;*
²*Arcispedale di Reggio Emilia.*

Negli ultimi due anni presso il nostro laboratorio sono stati messi a punto e valutati diversi saggi molecolari da affiancare all'indagine microscopica, tutt'ora metodo di riferimento per la diagnosi di laboratorio di malaria, ma poco sensibile e poco specifico. In particolare, saggi di nested-PCR (nested-PCR 1993), real-time-PCR e PCR seguita da ibridazione in micropiastra, si sono rivelati altamente sensibili, specifici e capaci di svelare infezioni miste non rivelate dalla microscopia. Inoltre, i saggi di PCR si sono dimostrati utili anche per aggiornare l'epidemiologia locale della malaria d'importazione. In particolare, grazie a queste indagini molecolari, è stato osservato a Parma un aumento della prevalenza delle infezioni da *Plasmodium ovale*, anche in accordo con i dati nazionali.

Le indagini molecolari da noi valutate hanno mostrato risultati concordanti tra loro nei casi di infezione da *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, mentre hanno mostrato risultati discordanti in presenza di infezioni da *P. ovale*. Questo risultato è verosimilmente dovuto alla presenza di mutazioni puntiformi nel gene 18S rDNA di *P. ovale*, come già riportato ampiamente in letteratura, che possono interferire con i saggi di PCR aventi questo gene come bersaglio. Di conseguenza nessuno dei tre saggi da noi valutati può essere considerato un saggio di riferimento molecolare per la specie *P. ovale*.