

<sup>1</sup>Oliva E., <sup>2</sup>Gargiulo R., <sup>3</sup>Varani S., <sup>4</sup>Bruno A., <sup>5</sup>Cavallari S., <sup>6</sup>Coppola M.G., <sup>1</sup>Farina C., <sup>1</sup>Raglio A. AMCLI-CoSP

<sup>1</sup>UOC Microbiologia e Virologia, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>2</sup>UOC Microbiologia e Virologia, AUSL Modena

<sup>3</sup>UOC Microbiologia, Azienda Ospedaliero Universitaria St.Orsola-Malpighi, Bologna

<sup>4</sup>U.O.C. Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo di Pavia

<sup>5</sup>UOC Microbiologia, ASST Ovest Milanese, Legnano (MI)

<sup>6</sup>UOS Parassitologia, AORN dei Colli, Presidio Ospedaliero di Cotugno, Napoli

**Introduzione e scopo:** La diagnosi di parassitosi intestinale rimane una sfida molto importante per molti laboratori in quanto richiede un elevato grado di competenze specifiche da parte del microbiologo. Numerosi studi annoverano il fatto che la biologia molecolare, rispetto alla microscopia, presenta numerosi vantaggi come una maggiore sensibilità e specificità. Scopo dello studio è valutare una RT-PCR nella rilevazione di protozoi intestinali da campioni fecali senza conservante.

**Materiali e metodi:** 121 campioni sono stati raccolti presso gli ospedali di Bergamo, Napoli, Bologna, Pavia, Legnano e Modena e conservati a -20 o -80°C. I campioni sono stati esaminati con le tecniche tradizionali: esame macro- e microscopico dopo concentrazione, colorazione con Giemsa o Tricromica, ricerca degli antigeni di *Giardia lamblia* (GI), *E. histolytica/dispar* o *Cryptosporidium* e, ove necessario, coltura per amebe. Il DNA è stato estratto con Microlab (NIMBUS, Hamilton). Tutti i campioni sono stati esaminati con multiplex RT-PCR (Biorad, CFX96, Real Time System) attraverso l'uso del kit Allplex GI-Parassite Assay, Seegene.

**Risultati:** Sui 121 campioni le indagini tradizionali hanno permesso di identificare i seguenti protozoi: 31 non patogeni (*B. hominis*, *E. nana*, *E. coli*, *E. dispar*, *Chilomastix mesnili*), 84 patogeni (22 *Giardia lamblia*, 53 *D. fragilis*, 4 *Cryptosporidium parvum*, 4 *E. histolytica*, 1 *D. fragilis/G. lamblia*), 5 positivi solo all'antigene (2 *G. lamblia*, 2 *E. histolytica*, 1 *C. parvum*), 1 negativo da un paziente con positività alla ricerca di anticorpi anti-*E. histolytica* e PCR da liquido cisti. RT-PCR ha confermato 81/120 concordanti positivi e 27/120 concordanti negativi. E' stata riscontrata la presenza di *C. cayetanensis* in 2 campioni, con *cycle threshold* (ct) superiore a 40 (Fig. 7), e quindi classificati negativi, negatività confermata con la microscopia. RT-PCR ha rilevato *D. fragilis* in 9 campioni risultati positivi per altro parassita con tecnica tradizionale: 6 confermati con revisione vetrino. RT-PCR ha rilevato *E. histolytica* in un paziente con sierologia positiva, ma antigene e microscopia negativa. E' inoltre stato rilevato un *C. parvum*, in un campione segnalato positivo solo per *B. hominis*.



Fig. 1 Trofozoite di *Dientamoeba fragilis*, colorazione tricromica  
Fig. 2 Cisti di *Giardia lamblia*  
Fig. 3 Cisti di *Entamoeba histolytica*, colorazione estemporanea di Lugol  
Fig. 4 Oocisti di *Cryptosporidium* spp dopo colorazione alcool-acido resistente modificata



Tab. 1 Suddivisione dei risultati in base alla concordanza tra esame standard e Biologia molecolare

Tradizionale	N°	RT-PCR				
		Cp	Cn	Fp	Fn	Indeterminato
<i>Giardia lamblia</i>	22	22				
<i>Entamoeba histolytica</i> (Ag e altra PCR pos)	4	4				
Pos solo Sierologia <i>E. histolytica</i>	2	1	1			
<i>Dientamoeba fragilis</i>	53	36+6	13		3 <sup>^</sup>	1+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	4	3+1	1			
<i>Blastocystis hominis</i>	13	12	1			
Non patogeni non previsti in PCR	11		8	1 <sup>°</sup>		2 <sup>'</sup>
Miste patogeni e non patogeni <sup>''</sup>	8	6	2			
Pos solo Antigene (2 GI, 1 Cp, 1 Eh)	4	4				

**LEGENDA**

Cp: concordante positivo, Cn: Concordante negativo, Fn: Falso negativo, Fp: Falso positivo  
\* PCR feci negativa e solo PCR liquido cisti positiva  
<sup>^</sup> PCR positive con altro metodo con CT elevato  
<sup>°</sup> Probabile Fp per *G. lamblia* perché PCR altro metodo e Ag negativi  
<sup>'</sup> PCR positiva ma impossibilità di recupero vetrino per conferma  
<sup>+</sup> PCR Df positiva senza possibilità di conferma vetrino  
<sup>''</sup> Miste: Bh/E. coli/E. nana; E. coli/E. nana; Bh/E. nana/E. hd; Df/GI/Bh;E. hd/ E. Nana; E. nana/ E. hd; Bh/E. coli/E. nana/Chilomastix; Bh/E. coli/E. nana

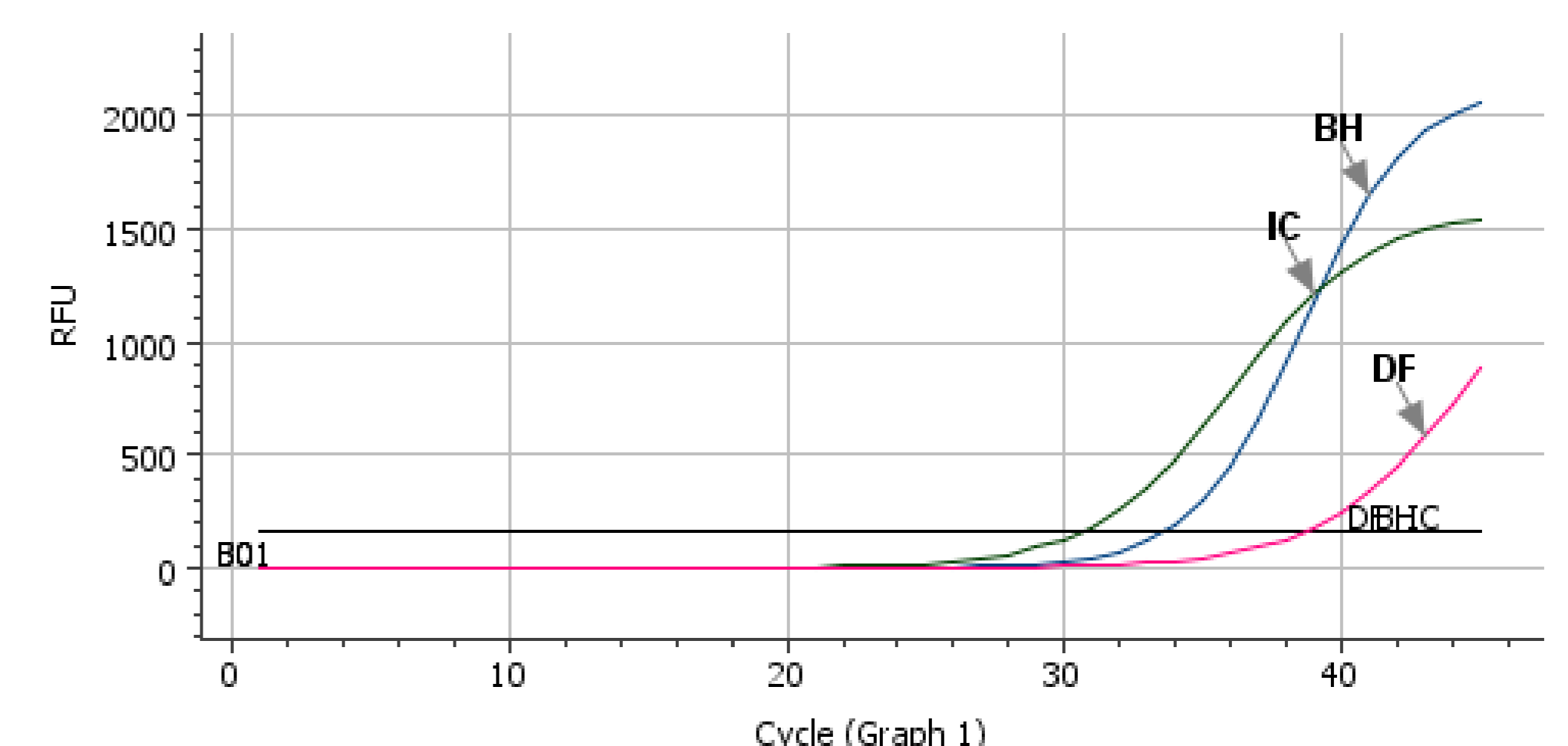


Figura 5: Esempio di risultati positivi per *D. fragilis* e *B. hominis*

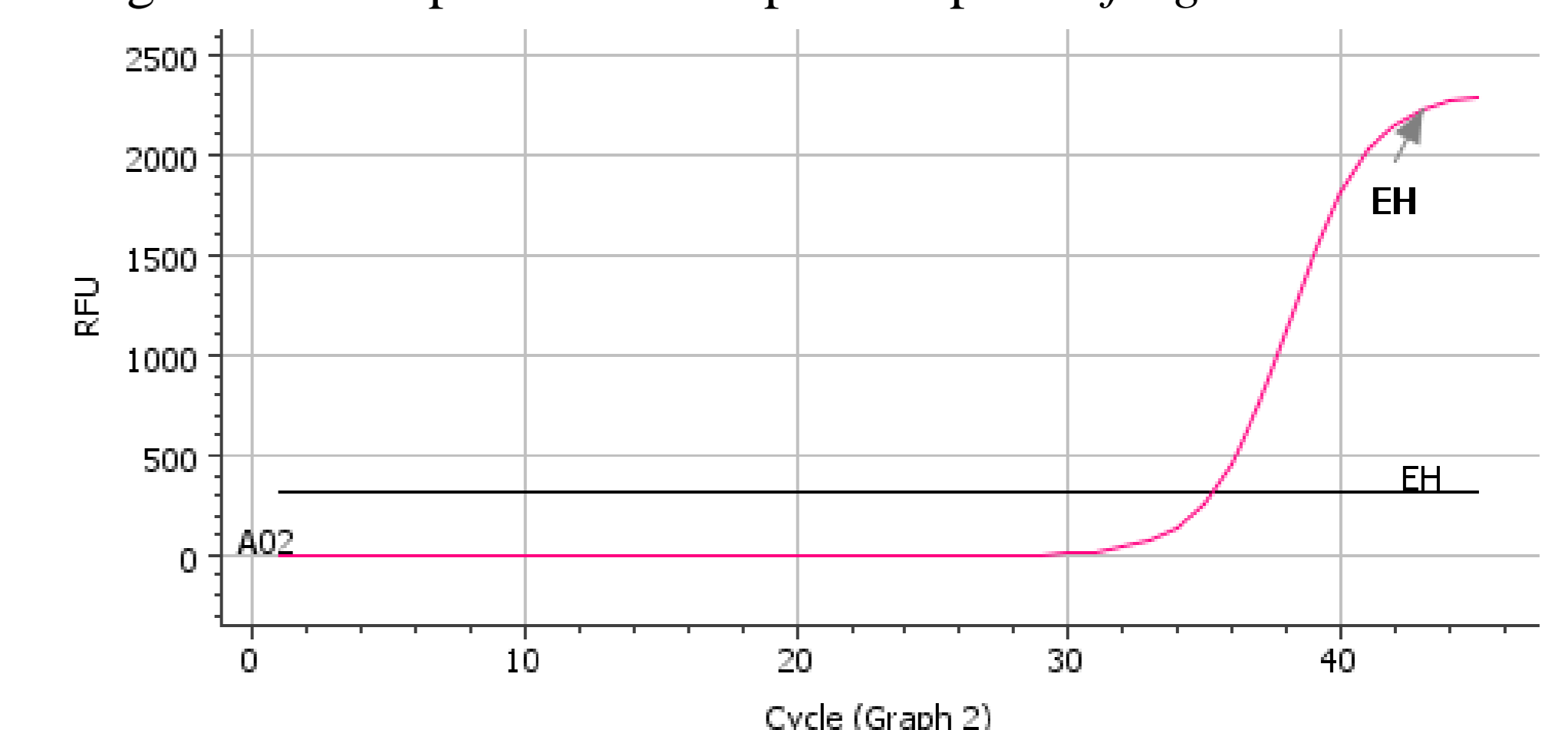


Figura 6: Esempio di risultati positivi per *E. histolytica*

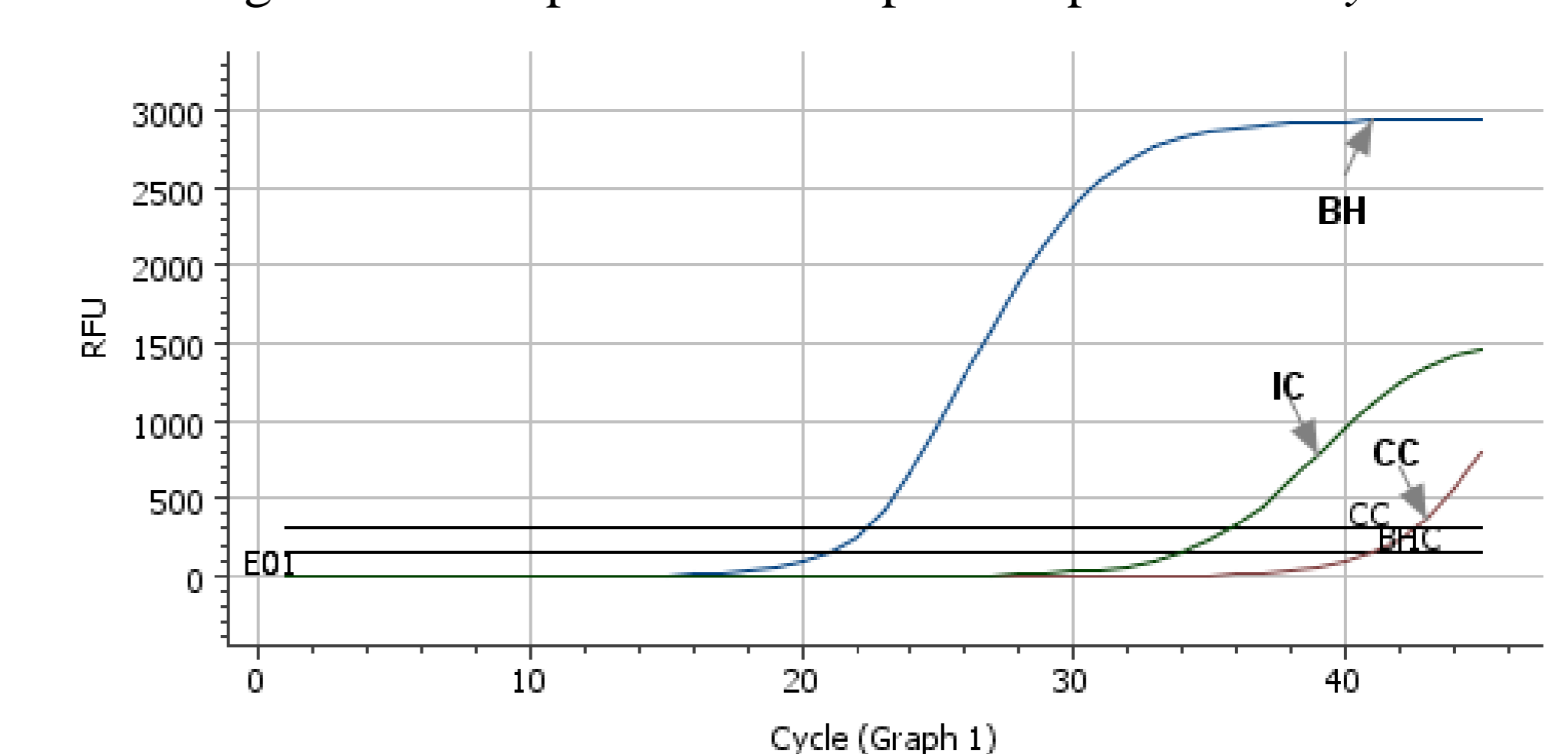


Figura 7: Esempio di risultato falso positivo per *C. cayetanensis*

**Conclusioni:** RT-PCR ha rilevato 6 *D. fragilis*, 1 *C. parvum* e 1 *E. histolytica* non diagnosticate con le tecniche tradizionali. RT-PCR ha, inoltre, confermato 13 falsi positivi per *D. fragilis* dovuti ad errata interpretazione microscopica, giustificando *B. hominis* nel pannello Allplex e 1 falso positivo di *C. cayetanensis*. L'impossibilità di rilettura di 3 vetrini non ha permesso una migliore valutazione della sensibilità. È importante la rilevazione di *E. histolytica* in paziente con sola sierologia positiva. La tecnologia RT-PCR potrebbe migliorare quindi i limiti della diagnosi delle infezioni intestinali protozoi intestinali con risoluzione dei tempi.