P144

Parassitologia

DIENTAMOEBA FRAGILIS: ABBANDONIAMO IL MICROSCOPIO?

S. Porcellato [1], M.A. Biasolo [1], L. Rossi [2], V. Besutti [2]
[1]*Dipartimento Medicina Molecolare Università di Padova*
[2]*UOC Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera Padova*

INTRODUZIONE

Dientamoeba fragilis è un protozoo parassita dell'intestino umano, le cui caratteristiche, come patogenicità e ciclo vitale, sono ancora poco conosciute. La ricerca viene eseguita mediante microscopia, a volte affiancata da biologia molecolare. Lo scopo di questo lavoro è quello di sviluppare una metodica di Real Time PCR specifica per la ricerca di D. fragilis in campioni fecali, confrontandone sensibilità e specificità con i metodi tradizionali.

METODI

Sono stati utilizzati campioni fecali provenienti da 130 pazienti, di età compresa tra 2 e 76 anni, risultati positivi per D. fragilis al microscopio, senza colorazioni. La ricerca dei parassiti intestinali è stata eseguita su tre campioni fissati, raccolti a giorni alterni, in contenitori Para-Pak ® ULTRA SAF, e su un quarto campione fresco. I campioni fissati sono stati processati con arricchimento secondo Ritchie. Sul pool dei tre campioni è stata eseguita la colorazione tricromica, mentre il corrispettivo campione fresco è stato sottoposto a colorazione di Giemsa.
La metodica di RT PCR, eseguita su campioni fissati e freschi, è stata messa a punto e validata in laboratorio.

RISULTATI

I campioni fissati e freschi vengono testati con metodo molecolare, per mettere a punto il sistema. La RT PCR si è rivelata più sensibile e specifica rispetto alla microscopia: i campioni risultati positivi in microscopia mostrano un valore medio di Ct di 21,85, mentre i campioni risultati negativi mostrano un valore medio di 28,03. La microscopia migliora se il preparato viene colorato con tricromica, ma D. fragilis viene rilevata di rado in campioni freschi colorati al Giemsa.

CONCLUSIONI

L'emissione del parassita è discontinua, per cui è raccomandata la raccolta di tre campioni con liquido fissativo. Questo permette di conservare i trofozoiti che, altrimenti, non verrebbero rilevati al microscopio se il campione non fosse fissato. Le colorazioni aiutano l'operatore poco esperto ad identificare il parassita "fragile".
Il metodo molecolare offre risultati migliori quando vengono analizzati estratti di DNA di campioni fissati piuttosto che di campioni freschi. Inoltre, è possibile condurre l'analisi molecolare su un campione anziché su tre, in quanto si è dimostrato che non si perde in sensibilità. Alla luce di quanto emerso, adottare il metodo molecolare con campione fissato agevola il flusso di lavoro che già utilizza il medesimo campione per la diagnostica microscopica tradizionale.