

**UTILIZZO DELLE ANALISI MOLECOLARI SU POOL DI CAMPIONI PER LA RICERCA DEI PROTOZOI INTESTINALI: RIDUZIONE DEI COSTI E ALTE PERFORMANCE QUALITATIVE**

D. Landolfi<sup>1</sup>, L. Collini<sup>1</sup>, C. Bezzi<sup>1</sup>, C. Nuzzo<sup>1</sup>, P. Lanzaforme<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Microbiologia e Virologia, APSS. Ospedale Santa Chiara, Largo Medaglie d'Oro 9, 38123 Trento

**INTRODUZIONE**

La diagnosi di laboratorio delle infezioni protozoarie avviene mediante esame microscopico del campione. La microscopia prevede una metodica di concentrazione con il successivo esame microscopico a fresco e con colorazioni dedicate. Nel caso delle amebe l'esame microscopico può evidenziare la presenza delle diverse specie, ma in alcuni casi può essere difficile distinguere quelle patogene, morfologicamente molto simili ad altre specie. Per questo le tecniche immunoenzimatiche e cromatografiche sono state da anni utilizzate come un importante supporto diagnostico all'esame microscopico tradizionale.

L'evoluzione della biologia molecolare ha oggi messo a disposizione anche tecniche geniche per la rilevazione di questi parassiti. Queste tecniche sono sensibili e specifiche, ma richiedono un laboratorio dedicato ed hanno costi piuttosto elevati. È stato condotto uno studio per verificare la possibilità di utilizzare tecniche molecolari nella diagnosi delle infezioni protozoarie e, nello stesso tempo, abbattere i costi utilizzando uno screening su pool di campioni.

**METODI**

Dopo l'indagine al microscopio, sono stati preparati i pool mescolando campioni di 5 diversi pazienti; dopo l'estrazione del DNA, l'eluato è stato amplificato con il kit RIDA®GENE Parasitic Stool Panel della R-Biopharm, una multiplex Real Time PCR progettata per differenziare *G.lamblia*, *D.fragilis*, *Cryptosporidium* spp e *H.histolytica*. I pazienti inseriti in pool risultati positivi sono stati analizzati in singolo.

**RISULTATI**

Sono stati esaminati 800 campioni divisi in 160 pool da 5 campioni ciascuno. L'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di 94 pool negativi, 65 positivi e 1 non amplificato. Dopo l'analisi in singolo, 84 campioni sono risultati positivi per *D. fragilis*, 2 per *G. lamblia* e 2 per *Cryptosporidium*. Non sono stati rilevati casi di coinfezione.

Spesso i test molecolari sono stati eseguiti dopo alcuni giorni dalla raccolta dei campioni, per cui non è stato possibile ripetere un esame microscopico di verifica per i positivi a causa della rapida lisi cui vanno incontro le *Dientamoeba*, mentre le positività per *Cryptosporidium* sono state riconfermate con colorazione specifica. I campioni risultati positivi per *G. lamblia*, invece, non erano stati individuati con la microscopia. Inoltre, per confermare la sensibilità del test su pool, 55 campioni sono stati analizzati prima in singolo e successivamente inseriti nei pool (1 campione positivo con 4 negativi). Anche gli 11 pool così formati sono risultati positivi.

**CONCLUSIONI**

L'analisi su pool ha presentato il vantaggio di poter analizzare gruppi di campioni, avvalendosi delle performance della tecnologia molecolare. Riducendo il numero di analisi si ha una diminuzione dei costi, a favore dell'utilizzo dei test molecolari su tutti i campioni (totale 485 amplificazioni eseguite rispetto alle 800 teoriche per l'analisi dei singoli campioni), senza alterare le caratteristiche di sensibilità.