

RILEVAZIONE DI DNA DI PLASMODIUM FALCIPARUM: METODICHE A CONFRONTO

E. Pomari¹, C. Piubelli¹, G. La Marca¹, F. Perandin¹

¹*Centro per le Malattie Tropicali, IRCCS Ospedale Sacro Cuore Don Calabria, Negrar*

INTRODUZIONE

La malaria è una parassitosi provocata da protozoi del genere *Plasmodium* (cinque le specie di interesse medico-umano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*). La microscopia rimane la metodica gold standard per la diagnosi di malaria, ma è poco sensibile alle basse parassitemie e soggetta alle abilità del microscopista. Recentemente sono state sviluppate varie metodiche molecolari con lo scopo di implementare accuratezza e sensibilità nella ricerca del DNA di *Plasmodium*. L'obiettivo del presente studio è valutare tre diverse metodiche molecolari per rilevare il DNA di *P. falciparum*: loop mediated isothermal amplification (LAMP), Real-Time PCR (Rt-PCR) e digital PCR (dPCR). La LAMP è un metodo che dà informazioni di tipo qualitativo mentre Rt-PCR e dPCR forniscono un dato quantitativo.

METODI

Lo studio è stato condotto su 23 campioni di sangue intero (EDTA) di pazienti risultati positivi alla microscopia per *P. falciparum*, con un range di parassitemia (% di eritrociti RBC infetti) da 9,5% a 0,0003%. Per l'analisi LAMP, sono stati usati 50µl di sangue e analizzati mediante kit commerciale Illumigene Malaria plus (Meridian Biosc.), secondo manuale. Per le analisi di Rt-PCR e dPCR, sono stati usati 200µl di sangue e sottoposti a estrazione del DNA genomico usando la piattaforma MagnaPureLC.2 instrument e DNA isolation kit I (Roche). La regione target amplificata è una sequenza non codificante mitocondriale per *Plasmodium* sp. con LAMP e il gene 18S rRNA *P. falciparum* con Rt-PCR e dPCR. Il protocollo utilizzato per la Rt-PCR è pubblicato nell'articolo Perandin et al. (2004), mentre il protocollo per la dPCR è stato sviluppato in questo studio.

RISULTATI

Tutte e tre le metodiche hanno rilevato la presenza del DNA target in tutti i 23 campioni analizzati.

I valori di Ct ottenuti in Rt-PCR sono stati normalizzati rispetto al valore ottenuto con l'amplificazione del gene β -actina e poi elaborati con metodo $2^{-\Delta Ct}$. E' stato osservato che i 7 campioni con range di parassitemia 9,5-1,15% hanno dato un valore medio di 6,48 ($\pm 3,63$) e i 16 campioni aventi range di parassitemia 0,85-0,0003% hanno dato un valore medio di 1,47 ($\pm 2,92$). I risultati ottenuti con dPCR, calcolati come ratio con il reference gene RPP30 ed elaborati secondo distribuzione di Poisson, hanno fornito i seguenti risultati: 7,38 ($\pm 5,76$) copie/µl e 1,75 ($\pm 3,48$) copie/µl, rispettivamente per range di parassitemia 9,5-1,15% e 0,85-0,0003%.

CONCLUSIONI

I nostri dati dimostrano che tutte e tre le metodiche mostrano ottima sensibilità rilevando il DNA di *P. falciparum* anche per campioni a bassa parassitemia (0,0003%). In particolare, solo la dPCR può sostituire totalmente la parassitemia in quanto è l'unico sistema in grado di dare una quantificazione assoluta, mentre la Rt-PCR necessita l'impiego di una curva standard e ha range dinamico meno ampio. Inoltre, con la LAMP è possibile rilevare il DNA di tutte e cinque le specie in una unica reazione, mentre Rt-PCR e dPCR identificano *P. falciparum*.