

n.11
2021

Working Paper of Public Health

La serie di Working Paper of Public Health (WP) dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria è una serie di pubblicazioni online ed Open Access, progressiva e multi disciplinare in Public Health (ISSN: 2279-9761). Vi rientrano pertanto sia contributi di medicina ed epidemiologia, sia contributi di economia sanitaria e management, etica e diritto. Rientra nella politica aziendale tutto quello che può proteggere e migliorare la salute della comunità attraverso l'educazione e la promozione di stili di vita, così come la prevenzione di malattie ed infezioni, nonché il miglioramento dell'assistenza (sia medica sia infermieristica) e della cura del paziente. Si prefigge quindi l'obiettivo scientifico di migliorare lo stato di salute degli individui e/o pazienti, sia attraverso la prevenzione di quanto potrebbe condizionarla sia mediante l'assistenza medica e/o infermieristica finalizzata al ripristino della stessa.

Gli articoli pubblicati impegnano esclusivamente gli autori, le opinioni espresse non implicano alcuna responsabilità da parte dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria.

La pubblicazione è presente in: Directory of Open Access Journals (DOAJ); Google Scholar; Academic Journals Database;

Comitato Scientifico:

Prof. Roberto Barbato

Dott.ssa Manuela Ceccarelli

Dott. Diego Gazzolo

Dott.ssa Federica Grosso

Prof. Marco Krengli

Prof.ssa Roberta Lombardi

Prof. Leonardo Marchese

Prof. Vito Rubino

Dott. Gioel Gabrio Secco

Dott. Paolo Tofanini

Dott. Giacomo Centini

Dott. Gianfranco Ghiazza

Dott.ssa Daniela Kozel

Dott. Marco Ladetto

Dott. Antonio Maconi

Dott. Alessio Pini Prato

Dott.ssa Mara Scagni

Dott.ssa Maria Elena Terlizzi

Dott.ssa Roberta Volpini

Comitato editoriale:

Dott. Antonio Maconi

Dott. Alfredo Muni

Dott.ssa Marinella Bertolotti

Responsabile:

Dott. Antonio Maconi

telefono: +39.0131.206818

email: amaconi@ospedale.al.it

Segreteria:

Mariateresa Dacquino, Marta Betti,

Mariasilvia Como, Laura Gatti

telefono: +39.0131.206192

email: mdacquino@ospedale.al.it; lgatti@ospedale.al.it

Norme editoriali:

Le pubblicazioni potranno essere sia in lingua italiana sia in lingua inglese, a discrezione dell'autore. Sarà garantita la sottomissione di manoscritti a tutti coloro che desiderano pubblicare un proprio lavoro scientifico nella serie di WP dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria, purché rientrino nelle linee guida editoriali. Il Comitato editoriale verificherà che gli articoli sottomessi rispondano ai criteri editoriali richiesti. Nel caso in cui lo si ritenga necessario, lo stesso Comitato editoriale valuterà l'opportunità o meno di una revisione a studiosi o ad altri esperti, che potrebbero o meno aver già espresso la loro disponibilità ad essere revisori per

il WP (i.e. peer review). L'utilizzo del peer review costringerà gli autori ad adeguarsi ai migliori standard di qualità della loro disciplina, così come ai requisiti specifici del WP. Con questo approccio, si sottopone il lavoro o le idee di un autore allo scrutinio di uno o più esperti del medesimo settore. Ognuno di questi esperti fornirà una propria valutazione, includendo anche suggerimenti per l'eventuale miglioramento, all'autore, così come una raccomandazione esplicita al Comitato editoriale su cosa fare del manoscritto (i.e. accepted o rejected).

Al fine di rispettare criteri di scientificità nel lavoro proposto, la revisione sarà anonima, così come l'articolo revisionato (i.e. double blinded).

Diritto di critica:

Eventuali osservazioni e suggerimenti a quanto pubblicato, dopo opportuna valutazione di attinenza, sarà trasmessa agli autori e pubblicata on line in apposita sezione ad essa dedicata.

Questa iniziativa assume importanza nel confronto scientifico poiché stimola la dialettica e arricchisce il dibattito su temi d'interesse. Ciascun professionista avrà il diritto di sostenere, con argomentazioni, la validità delle proprie osservazioni rispetto ai lavori pubblicati sui Working Paper of Public Health.

Nel dettaglio, le norme a cui gli autori devono attenersi sono le seguenti:

- I manoscritti devono essere inviati alla Segreteria esclusivamente in formato elettronico all'indirizzo e-mail dedicato
- A discrezione degli autori, gli articoli possono essere in lingua italiana o inglese. Nel caso in cui il manoscritto è in lingua italiana, è possibile accompagnare il testo con due riassunti: uno in inglese ed uno in italiano, così come il titolo;
- Ogni articolo deve indicare, le Keywords, nonché il tipo di articolo (i.e. Original Articles, Brief Reports oppure Research Reviews);
- L'abstract è il riassunto dell'articolo proposto, pertanto dovrà indicare chiaramente: Obiettivi; Metodologia;
- Risultati; Conclusioni;
- Gli articoli dovrebbero rispettare i seguenti formati: Original Articles (4000 parole max., abstract 180 parole max., 40 references max.); Brief Reports (2000 parole max., abstract 120 parole max., 20 references max., 2 tabelle o figure) oppure Research Reviews (3500-5000 parole, fino a 60 references e 6 tabelle e figure);
- I testi vanno inviati in formato Word (Times New Roman, 12, interlinea 1.5). Le note, che vanno battute in apice, non possono contenere esclusivamente riferimenti bibliografici. Inoltre, la numerazione deve essere progressiva;
- I riferimenti bibliografici vanno inseriti nel testo riportando il cognome dell'Autore e l'anno di pubblicazione (e.g. Calabresi, 1969). Nel caso di più Autori, indicare nel testo il cognome del primo aggiungendo et al; tutti gli altri Autori verranno citati nei riferimenti bibliografici alla fine del testo.
- I riferimenti bibliografici vanno elencati alla fine del testo in ordine alfabetico (e cronologico per più opere dello stesso Autore).

Nel sottomettere un manoscritto alla segreteria di redazione, l'autore accetta tutte le norme qui indicate.

n.11
2021

titolo

**IL TRAPIANTO FECALE DI MICROBIOTA:
LA DIAGNOSI RAPIDA DI PARASSITI IN
PCR MULTIPLEX**

title

**FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION:
FAST PARASITES DIAGNOSIS BY
MULTIPLEX PCR**

autori

Mura Omar¹, Gamalero Elisa¹, Di Matteo Luigi², Rocchetti Andrea²

¹Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Alessandria, Italy

²SC Microbiologia e Virologia, AO "SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo", Alessandria, Italy

tipologia

Original Articles

keywords

Trapianto fecale, Microbiota, PCR, Parassiti

Abstract

- **Obiettivi:** Valutazione delle performance analitiche del saggio biomolecolare Novodiag® Stool Parasites per la rilevazione di parassiti intestinali da investigare nelle feci del donatore di trapianto fecale di microbiota
- **Metodologia:** Confronto tra la microscopia ottica, gold standard per la diagnosi delle parassitosi intestinali, e il saggio biomolecolare Novodiag® Stool Parasites attraverso l'utilizzo di 22 campioni fecali.
- **Risultati:** Sul totale dei campioni i positivi all'esame microscopico sono stati 12 ed i negativi 10. Per verificare la concordanza tra esame parassitologico e tecnica molecolare tutti i campioni sono stati sottoposti al saggio Novodiag® Stool Parasites. I campioni positivi al saggio biomolecolare per la presenza di parassiti sono stati 11 ed i negativi 11.
- **Conclusioni:** La valutazione preliminare delle performance analitiche del kit Novodiag® Stool Parasites si può considerare promettente. Il kit Novodiag® Stool Parasites può essere utilizzato efficacemente come strumento nella diagnosi rapida delle parassitosi intestinali sulle feci di donatore destinate al trapianto fecale di microbiota.

Abstract

- **Objectives:** Evaluation of the analytical performance of the Novodiag® Stool Parasites biomolecular assay for the detection of intestinal parasites in faeces of the faecal microbiota transplant donor.
- **Methodology:** Comparison between the gold standard for the diagnosis of intestinal parasites, light microscopy, and the Novodiag® Stool Parasites biomolecular assay through the use of 22 fecal samples.
- **Results:** Twelve out of 22 samples were positive on microscopic examination. In order to assess the overlapping between the results obtained through parasitological examination and the molecular methodology, all samples were tested to the Novodiag® Stool Parasites assay. Positive samples detected by biomolecular assay were 11 out of 22.
- **Conclusion:** The preliminary evaluation of the analytical performance of the Novodiag® Stool Parasites kit can be considered promising. The Novodiag® Stool Parasites kit can be effectively used as a tool in the fast diagnosis of intestinal parasitoses on the faecal microbiota transplant donor faeces.

INTRODUZIONE

Per “microbiota” si intende una comunità ecologica di **microrganismi commensali**, simbiotici e patogeni presenti in un dato ecosistema (Marchesi et al., 2016). Il microbiota umano è l'insieme di tutti i microrganismi che colonizzano il corpo umano. Queste comunità sono costituite da eucarioti, archea, batteri e virus. La composizione e i ruoli dei batteri che fanno parte di queste comunità sono stati studiati intensamente mentre i ruoli di virus, archea e eucarioti unicellulari rimangono meno conosciuti. Si stima che il microbiota umano contenga fino a 10^{14} cellule batteriche, un numero che è 10 volte maggiore del numero di cellule eucariotiche umane. Il microbiota colonizza praticamente ogni superficie del corpo esposta all'ambiente esterno e in parte quella dell'ambiente interno. I batteri prosperano sulla pelle, nel tratto genito-urinario, gastrointestinale e respiratorio. L'organo più fortemente colonizzato è il tratto gastrointestinale. (Sekirov et al., 2010). La comunità di batteri che colonizzano il tratto gastrointestinale viene definita “microbiota intestinale”. Per lungo tempo la mancanza di tecniche di laboratorio adeguate ha condizionato lo studio del **microbiota intestinale** essendo gli approcci basati sulle colture inadeguati per la crescita di gran parte della comunità microbica costituita da batteri anaerobi (Moore e Holdeman, 1974; Biedermann e Rogler, 2015). Lo sviluppo di approcci coltura indipendenti come le tecniche basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale batterico e lo Shotgun metagenomic sequencing hanno facilitato l'identificazione, la classificazione dei batteri e lo studio dei geni dell'intera comunità microbica, il cosiddetto microbioma (Poretsky et al. 2014; Mizrahi et al., 2013). I batteri intestinali sono i regolatori chiave della digestione lungo il tratto gastrointestinale, svolgono un ruolo importante nell'estrazione, sintesi e assorbimento di molti nutrienti e metaboliti compresi gli acidi biliari, i lipidi, gli amminoacidi, le vitamine e gli acidi grassi a catena corta. Il microbiota intestinale possiede una funzione immunitaria cruciale contro la colonizzazione di batteri patogeni inibendone la crescita, consumando i nutrienti disponibili e/o attraverso la produzione di batteriocine. Inoltre il microbiota intestinale previene l'invasione batterica attraverso il mantenimento dell'integrità dell'epitelio intestinale (Khosravi e Mazmanian, 2013). I microrganismi del microbiota prevengono la colonizzazione da parte di microrganismi patogeni attraverso diversi processi di competizione: metabolismo dei nutrienti, modificazione del pH, secrezione di peptidi antimicrobici ed effetti sulle vie di segnalazione cellulare. Studi recenti hanno identificato un ruolo critico dei batteri commensali e dei loro prodotti nella regolazione dello sviluppo, nel mantenimento dell'omeostasi e nella funzione delle cellule immunitarie innate e adattative (Brestoff e Artis, 2013). Le funzioni del microbiota intestinale sono altamente conservate tra gli individui, mentre la composizione del microbiota intestinale di ogni individuo è caratterizzata da specifiche combinazioni di specie batteriche a causa

di variazioni inter-individuali e intra-individuali nel corso della vita. La colonizzazione dell'intestino umano inizia alla nascita con una rapida espansione della diversità batterica caratterizzata da un successivo cambiamento della composizione microbica che alla fine diventa relativamente stabile nell'età adulta (Yatsunenکو et al., 2012). La composizione del microbiota intestinale umano nell'adulto è rappresentata principalmente dai phylum Bacteroidetes e Firmicutes, seguiti da Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia come filum minoritari (Arumugam et al., 2012). Il microbiota intestinale umano varia dal punto di vista tassonomico e funzionale in ciascuna parte del tratto gastrointestinale subendo variazioni nello stesso individuo a causa delle transizioni infantili, dell'età e dei fattori ambientali come l'uso di antibiotici (Flint et al., 2012). Nello stato di salute il microbiota intestinale gioca un ruolo rilevante all'interno del nostro corpo, essendo principalmente coinvolto nello sviluppo e crescita dell'immunità e nella regolazione di diverse vie metaboliche (Purchiaroni et al., 2013; Sekirov et al., 2010; Rajilic-Stojanovic, 2013). Alterazioni quantitative e/o qualitative del microbiota intestinale, note con il termine "disbiosi" possono portare alla compromissione di questa omeostasi, mediando lo sviluppo di diverse malattie legate al microbiota intestinale (Viggiano et al., 2015; Lopetuso et al., 2015). Attualmente, la strategia terapeutica utilizzata più efficacemente per correggere la disbiosi intestinali risulta essere il trapianto fecale del microbiota (FMT).

Ruolo del microbiota nell'infezione da *Clostridium difficile*.

Il *Clostridium difficile* (Figura 2) è un bacillo gram-positivo anaerobio sporigeno. L'espressione di tossine da parte dei ceppi virulenti di *C. difficile* provoca malattie gastrointestinali con un ampio spettro di gravità, che vanno dalla diarrea lieve alla colite pseudomembranosa, megacolon tossico, sepsi e morte. *C. difficile* è considerato un membro della normale microflora intestinale, tuttavia la sua crescita è soppressa dalla presenza dominante di altre specie batteriche anaerobiche. La suscettibilità dell'ospite all'infezione da *C. difficile* (CDI) e le recidive derivano in parte dall'incapacità del microbiota intestinale di resistere alla colonizzazione di *C. difficile* (Bien et al., 2013). Al centro della patogenesi della CDI c'è la distruzione del microbiota. Un microbiota intestinale sano è necessario per la protezione contro la colonizzazione dei patogeni, fenomeno definito resistenza alla colonizzazione (Vollaard e Clasener, 1994). Un microbiota non perturbato è in grado di resistere alla colonizzazione da parte di agenti patogeni per questo motivo uno stato di disbiosi del microbiota porta alla perdita della resistenza alla colonizzazione inclusa la competizione per i nutrienti e la competizione ecologica (Britton e Young, 2012). Sebbene molti fattori di rischio associati alla CDI

possono causare cambiamenti nel microbiota, il fattore più comunemente associato è l'utilizzo di **antibiotici**. Gli antibiotici provocano cambiamenti sia a breve, sia a lungo termine nella composizione del microbiota intestinale (Lagier et al., 2012). Una delle principali conseguenze è una diminuzione della diversità del microbiota intestinale (Dethlefsen et al., 2008; Dubourg et al., 2014).

Il trapianto fecale di microbiota

Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è il trasferimento di feci da un **donatore "sano"** a un ricevente che si ritiene possa ospitare un microbiota intestinale alterato (andato incontro a disbiosi) con conseguente malattia. L'obiettivo è ripristinare l'eubiosi o un microbiota "sano". Il FMT è un trattamento consolidato per le infezioni ricorrenti da *C. difficile* (rCDI) (riclassificato come *Clostridioides difficile*) (Debast et al., 2014; McDonald et al., 2018) con tassi di guarigione dell'80-90% (Quraishi et al., 2017). L'infezione da *C. difficile* si può manifestare con un quadro di colite grave soprattutto in pazienti anziani e ospedalizzati, potendo dar luogo a complicanze severe come megacolon, perforazione intestinale, shock. La patologia, tipicamente associata a uno stato di alterazione del microbiota intestinale, molto spesso causato dall'assunzione di antibiotici, è legata alla produzione di tossine che danneggiano la mucosa intestinale e determinano infiammazione e diarrea. Il trattamento standard dell'infezione da *C. difficile* prevede l'utilizzo di vancomicina o fidaxomicina come terapia di prima linea, ma si assiste in molti casi alla ricorrenza dell'infezione con ricomparsa dei sintomi e di positività delle tossine nelle feci. Il fenomeno sembra essere correlato al persistere dello stato di alterazione del microbiota intestinale causata dall'uso degli antibiotici stessi. La comparsa di ceppi nosocomiali resistenti a certi antibiotici e dotati di maggiore virulenza ha recentemente aumentato la numerosità dei casi e la loro severità. Il tasso di incidenza e la mortalità delle infezioni da *C. difficile* è notevolmente aumentato negli ultimi decenni soprattutto in ambiente ospedaliero e comunitario. Alla luce dell'elevato tasso di efficacia nella cura dell'infezione ricorrente da *C. difficile* (92-94%) e di un numero molto basso di effetti collaterali (la maggioranza di lieve entità) il FMT risulta essere un'arma terapeutica molto efficace per il trattamento di pazienti affetti da infezione ricorrente da *C. difficile* refrattari alla antibioticotera standard (rCDI). Linee guida americane ed europee raccomandano il FMT quale opzione terapeutica consolidata per il trattamento della forma ricorrente dell'infezione. Negli ultimi anni, il FMT è diventato una pratica in forte espansione dove i protocolli più pubblicati e le raccomandazioni riguardo alla metodologia del FMT si basano su opinioni, buon senso ed esperienze aneddotiche. Quindi, per quanto riguarda la selezione del donatore, la preparazione dei campioni fecali e la somministrazione della soluzione

al ricevente, esistono ancora grandi differenze tra i centri di tutto il mondo nei metodi di FMT. Secondo il Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale pubblicato nel 2018 è importante vagliare attentamente i potenziali donatori di feci (non inferiori ai 18 anni) per agenti patogeni al fine di prevenire la trasmissione di malattie al ricevente. Questionari strutturati possono essere utilizzati per stimare il rischio di patogeni acquisiti di recente. Tali questionari dovrebbero almeno contenere domande riguardanti la storia di viaggio, il comportamento sessuale, la storia medica, l'uso di farmaci, l'uso di droghe e fattori di rischio per malattie trasmissibili come tatuaggi recenti o piercing. Donatori esposti agli antibiotici negli ultimi 3-6 mesi, con malattie gastrointestinali, con diarrea o sotto terapia farmacologica dovrebbero essere esclusi. Le linee guida presenti nel **Programma Nazionale sul Trapianto di Microbiota Fecale** prevedono lo screening del donatore attraverso analisi microbiologiche del sangue e delle feci per le varie malattie infettive entro 4 settimane prima della donazione e il giorno stesso della donazione attraverso test rapidi microbiologici effettuati sulle feci del donatore. (Bakker e Niewdorp, 2017; Cammarota et al., 2017; Paramsothy et al., 2015; Vindigni e Surawicz, 2017). Il metodo ottimale di preparazione del materiale è ancora in fase di discussione. Generalmente il materiale fecale fresco deve essere processato entro 6 ore dalla produzione del donatore e può essere conservato a temperatura ambiente fino ad ulteriore elaborazione (per proteggere i batteri anaerobi, il materiale deve essere lavorato il più velocemente possibile). Circa 50 g (per un minimo di 30 g) di materiale fecale viene mescolato con circa 150 mL di cloruro di sodio normale sterile da un miscelatore. La miscela viene filtrata con un filtro o una garza per eliminare il particolato di grandi dimensioni che potrebbe ostruire il canale dell'endoscopio. Infine, il filtrato viene infuso in siringhe da 60 ml ed infuso nel tratto gastrointestinale del ricevente (Cammarota et al., 2017; Vindigni e Surawicz, 2017; Sokol et al., 2016).

MATERIALI E METODI

Esame microscopico delle feci mediante concentrazione del campione fecale attraverso il sistema Para-Pak Macro-CON.

Para-Pak Macro-CON è un sistema per la **concentrazione di parassiti** provenienti da campioni fecali conservati. L'unità di filtraggio è progettata per essere utilizzata direttamente con la fiala di raccolta dei campioni Para-Pak SAF, un fissativo / conservante multiuso per il trasporto delle feci contenente sodio acetato di formalina per esame diretto, concentrazione e colorazione permanente dallo stesso campione. In questo modo si ottiene un sistema completamente chiuso, riducendo al minimo l'esposizione dell'operatore ad agenti potenzialmente infetti. Macro-CON utilizza l'intero contenuto della fiala di raccolta dei campioni Para-Pak, riducendo le variazioni dovute al campionamento. Ciò risulta particolarmente utile al parassitologo quando in una quantità elevata di feci è presente un numero di organismi ridotto. L'unità di filtraggio è composta da una provetta da centrifuga conica da 50 mL chiusa con un adattatore bordato contenente una protezione retiforme di plastica. Le feci conservate vengono dapprima addizionate di un surfattante, che consente di ridurre la forza adesiva e rompe gli aggregati fecali, liberando così i parassiti. Il filtraggio del campione attraverso il filtro Macro-CON rimuove grossi frammenti e detriti. L'emulsificazione del campione con etilacetato consente di estrarre gran parte dei lipidi fecali. Dopo la centrifuga il tappo lipidico e l'etilacetato in eccesso vengono travasati lasciando un sedimento compatto arricchito di uova di parassiti, larve, trofozoiti e cisti. Si raccolgono i campioni come indicato dal relativo foglietto illustrativo Para-Pak fornito con il sistema di raccolta. Per ottenere una fissazione appropriata, si deve mescolare il campione adeguatamente al fissativo. La miscela di fissativo e feci deve essere lasciata a riposo per un minimo di 30 minuti a temperatura ambiente nel periodo compreso fra la raccolta e l'elaborazione dei campioni. Si procede rimuovendo il tappo dalla fiala contenente il campione del paziente aggiungendo 10 gocce di surfattante alla fiala del campione. Si richiude bene la fiala con il tappo. Lo si agita bene per 60 secondi. Per facilitare lo scioglimento di alcuni campioni compatti o altamente mucoidi è possibile ricorrere ad un agitatore vortex. Si verifica che la provetta da centrifuga conica da 50 mL sia bene avvitata all'unità di filtraggio. Successivamente, si rimuove il tappo dalla fiala del campione del paziente e inserendo l'estremità aperta dell'unità di filtraggio Macro-CON nella fiala del campione, con una leggera pressione verso il basso fino al completo inserimento. Afferrando il colletto dentellato, si allenta senza rimuovere l'unità di filtraggio dalla provetta da centrifuga conica. Si lascia il sistema Macro-CON a riposo per 60 secondi liberando la pressione nel sistema e ottenendo un drenaggio migliore del filtro. Si richiude nuovamente l'unità di filtraggio alla provetta da centrifuga conica e picchiettando due o tre volte per forzare l'eventuale liquido residuo nella provetta da centrifuga conica. Si inclina il sistema Macro-CON di circa 30 gradi

dalla posizione orizzontale e svitare completamente l'unità di filtraggio dalla provetta da centrifuga conica. Si getta l'unità di filtraggio/fiala Para-Pak del campione seguendo le procedure adottate dal laboratorio per lo smaltimento dei campioni fecali. Si aggiungono 5 mL di etilacetato alla provetta da centrifuga conica. Si colloca fermamente sulla provetta da centrifuga uno dei cappucci a vite forniti e si agita bene per 60 secondi. Successivamente la sospensione viene centrifugata per 15 minuti a 2000 rpm e il fluido supernatante insieme allo strato di detriti vengono eliminati. È necessario pulire le pareti interne con uno o due applicatori a bastoncino con punta cotonata per rimuovere i residui di detriti e l'etilacetato. Infine si aggiungono alcune gocce di formalina al 10% o di soluzione salina fisiologica e si mescola il sedimento indurito. Dopo concentrazione, il campione da analizzare deve essere prelevato con una pipetta capillare dalla metà superiore del materiale sottoposto nuovamente a sospensione. Questa parte contiene il maggior numero di parassiti ed evita le particelle più grandi e dense che possono interferire con il preparato del vetrino bagnato. Infine, 1 -2 gocce dalla pipetta capillare vengono depositate sul vetrino del microscopio sul quale verrà adagiato un vetrino copri oggetto.

Metodo Automatizzato per la diagnosi di laboratorio delle parassitosi intestinali

Il saggio **Novodiag® Stool Parasites** eseguito con la piattaforma Novodiag® è una analisi diagnostica qualitativa in-vitro per la rapida identificazione di protozoi, elminti e microsporidi da campioni fecali. Il test si basa sull'estrazione automatizzata degli acidi nucleici, amplificazione e analisi attraverso due tecnologie: real-time PCR (sonde fluorescenti) e microarray (rilevamento basato sulla fluorescenza a riflessione interna totale (TIRF)). Il test copre le varianti attualmente note di *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides / suum*, *Balantidium coli*, *Blastocystis* spp., *Clonorchis sinensis / Opisthorchis* spp. / *Metorchis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, *Diphyllobothrium latum / nihonkaiense*, *Encephalitozoon* spp., *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Fasciola* spp., *Fasciolopsis buski*, *Giardia intestinalis*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis nana*, *Necator americanus*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma* spp., *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata / asiatica*, *Taenia solium* e *Trichuris* spp. Il campione fecale viene prima trasferito in una provetta eSwab da 1 ml con un FLOQSwab (tampone) per la fase di lisi. È necessario ruotare il tampone nelle feci, assicurandosi che l'intera punta del tampone sia a contatto e ricoperta di feci. Si crea un campione rappresentativo immergendo il tampone in almeno cinque punti diversi. Il tampone viene quindi trasferito in una provetta eSwab da 1 ml, con la quantità adeguata di feci. Si schiaccia e si mescola il campione fecale strofinando il tampone contro il lato della provetta e sospendere completamente il campione nella soluzione eSwab. Si rompe il tampone nella provetta. Si getta la parte dell'impugnatura del tampone. In caso di campione fecale acquoso, si aggiungono 200 µl di

campione liquido nella stessa provetta eSwab oltre al materiale del campione prelevato con il tampone. Si mescola bene la provetta eSwab agitando su vortex per 5 secondi. Si procede trasferendo l'intero contenuto del campione nella provetta eSwab in una provetta contenente microsfere inclusa nel kit. Si posizionano le provette con microsfere contenenti il campione all'interno dei rotori dell'agitatore MagNA Lyser e si avvia lo strumento a 7000 rpm per 90 secondi. Si aggiungono 600 µl di campione dal tubo di microsfere al serbatoio del campione della cartuccia. Si deve evitare di pipettare schiuma o microsfere nel serbatoio del campione. Se si forma una quantità eccessiva di schiuma, il tubo delle microsfere può essere ruotato molto brevemente. Si prende il tappo dal blister della cartuccia e lo si posiziona saldamente sul serbatoio del campione ruotando e spingendo il tappo. Ci si assicura di chiudere completamente il serbatoio del campione della cartuccia. Attraverso il software Novodiag® sarà possibile creare il test eseguendo la scansione della cartuccia. Infine, la cartuccia viene inserita in uno dei 4 moduli disponibili presenti nello strumento Novodiag® dando così inizio al test.

Campioni fecali

Per il confronto tra entrambe le metodiche sono stati utilizzati: un pannello di 10 controlli di qualità Neqas Fecal Parasitology; 2 campioni fecali provenienti da animali; 10 campioni fecali provenienti dal laboratorio di Microbiologia.

RISULTATI

Su 22 campioni fecali i positivi all'esame microscopico sono stati 12 ed i negativi 10. Tutti i campioni sono stati sottoposti al saggio biomolecolare Novodiag® Stool Parasites per verificare la **concordanza tra esame parassitologico e tecnica molecolare**. I campioni positivi al saggio biomolecolare per la presenza di parassiti sono stati 11 ed i negativi 11. La Tabella 1 ricostruisce gli esiti di positività e negatività di entrambe le metodiche.

Tabella 1: Controlli positivi e negativi per la presenza di parassiti all'Esame Microscopico e al saggio Novodiag® Stool Parasites.

Controlli	Esame Microscopico	Novodiag® Stool Parasites
<i>Ascaris lumbricoides</i>	+	+
<i>Hymenolepis nana</i>	+	+
<i>Ancylostoma duodenale</i>	+	+
<i>Schistosoma mansoni</i>	+	+
<i>Diphyllobothrium latum</i>	+	+
<i>Fasciola hepatica</i>	+	+
<i>Giardia intestinalis</i>	+	+
<i>Entamoeba histolytica</i>	+	+
<i>Cryptosporidium spp</i>	+	+
<i>Blastocystis spp</i>	+	+
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	+	+
<i>Toxocara canis</i>	+	-
<i>Ancylostoma duodenale</i>	+	+
<i>Isoospora felis</i>	+	-
Controllo negativo in feci diarroiche	-	-
Controllo negativo in feci diarroiche	-	-
Controllo negativo in feci diarroiche	-	-
Controllo negativo in feci diarroiche	-	-
Controllo negativo in feci diarroiche	-	-
Controllo negativo in feci compatte	-	-
Controllo negativo in feci compatte	-	-
Controllo negativo in feci compatte	-	-
Controllo negativo in feci compatte	-	-
Controllo negativo in feci compatte	-	-

Caso N° 1

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Ascaris lumbricoides* sia all'esame microscopico (Figura 31) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.

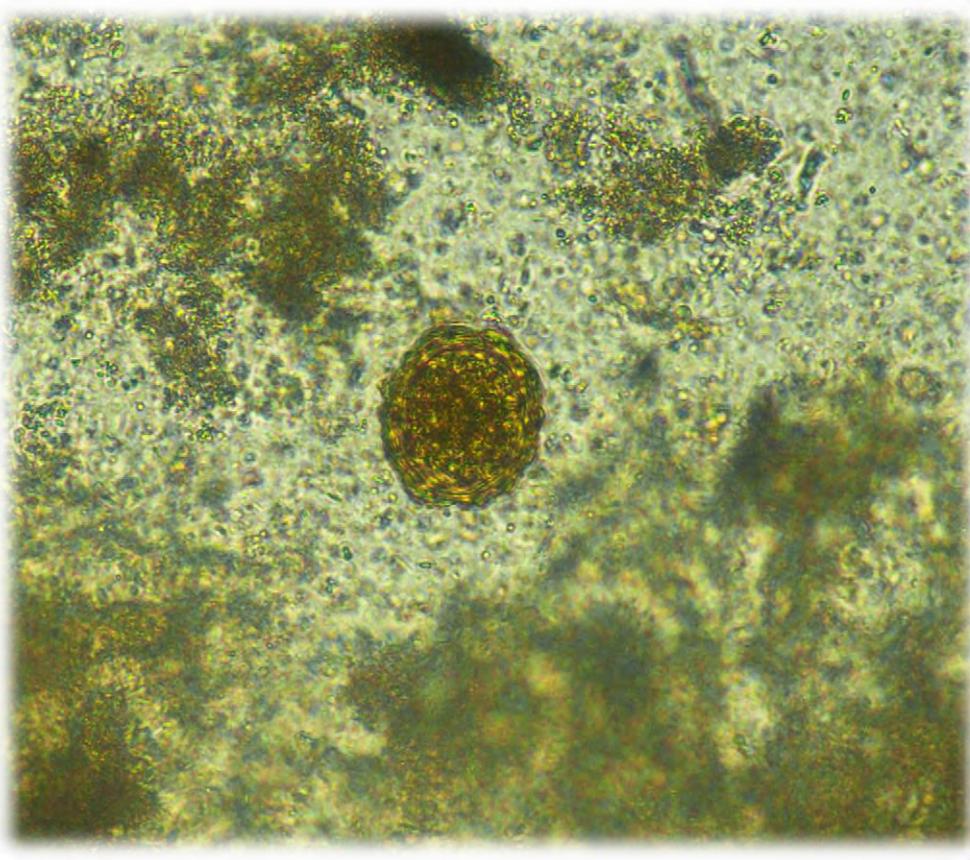


Figura 31: uovo di *Ascaris lumbricoides*

Caso N° 2

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Hymenolepis nana* sia all'esame microscopico (Figura 32) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.



Figura 32: uovo di *Hymenolepis nana*

Caso N° 3

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per Ancilostomatide (Figura 33) all'esame microscopico e positivo per *Ancylostoma duodenale* per il saggio Novodiag® Stool Parasites.

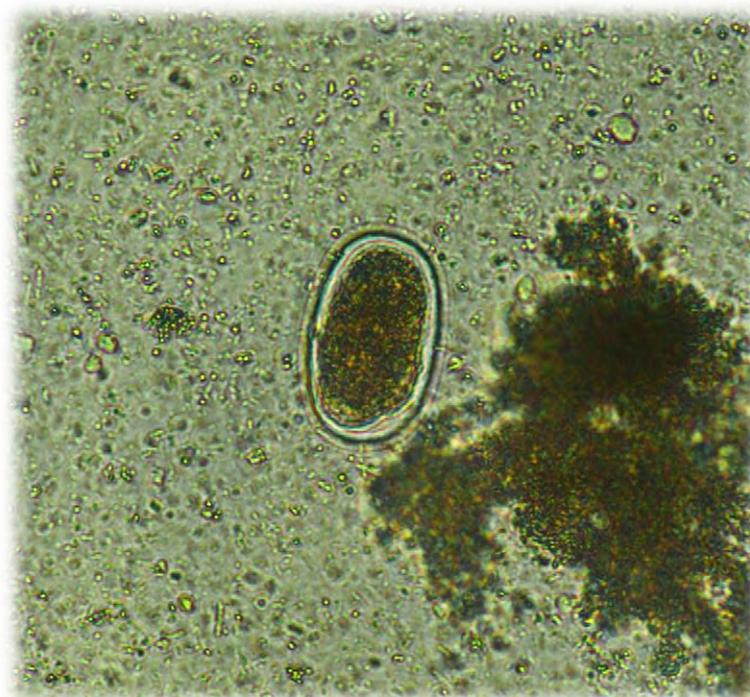


Figura 33: uovo di Ancilostomatide

Caso N° 4

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Schistosoma mansoni* sia all'esame microscopico (Figura 34) che al saggio Novodiag® Stool Parasites.

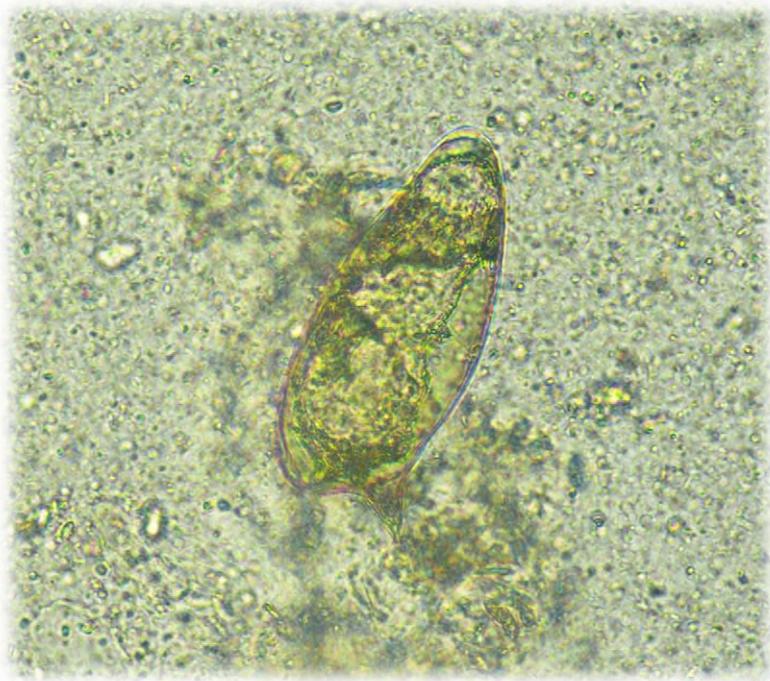


Figura 34: uovo di *Schistosoma mansoni*.

Caso N° 5

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Diphyllobothrium latum* sia all'esame microscopico (Figura 35) che al saggio Novodiag® Stool Parasites.



Figura 35: uovo di *Diphyllobothrium latum*

Caso N° 6

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Fasciola hepatica* sia all'esame microscopico (Figura 36) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.

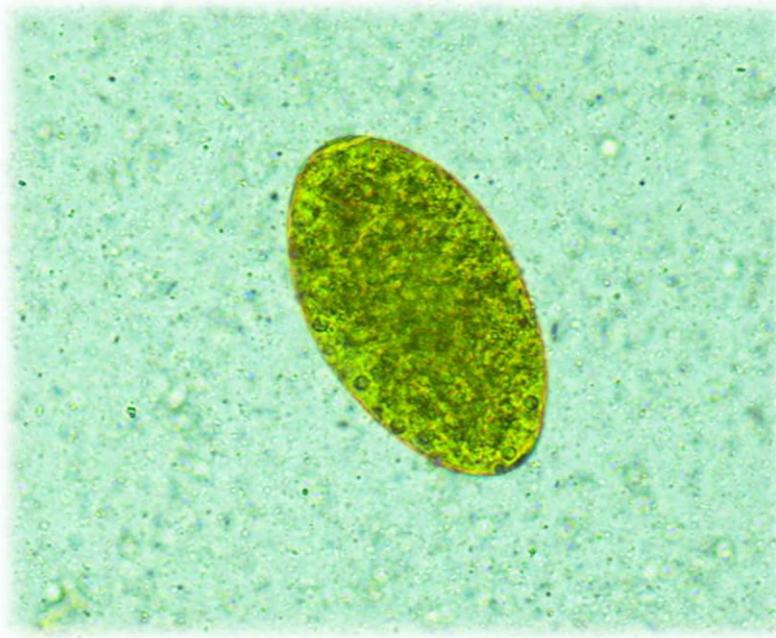


Figura 36: uovo di *Fasciola hepatica*

Caso N° 7

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Giardia intestinalis* sia all'esame microscopico (Figura 37) che al saggio Novodiag® Stool Parasites.

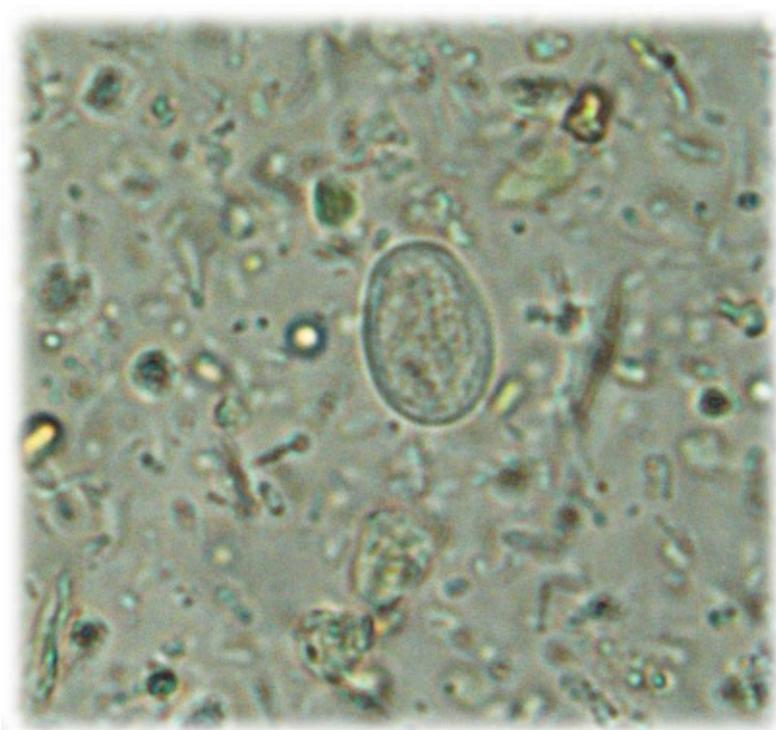


Figura 37: ciste di *Giardia intestinalis*

Caso N° 8

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Entamoeba histolytica* sia all'esame microscopico (Figura 38) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.

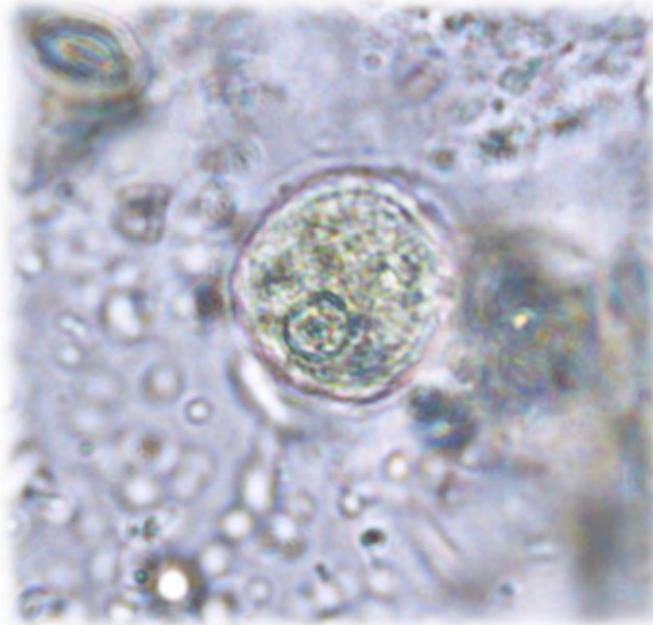


Figura 38: ciste di *Entamoeba histolytica/dispar*

Caso N° 9

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Cryptosporidium spp* sia all'esame microscopico (Figura 39) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.

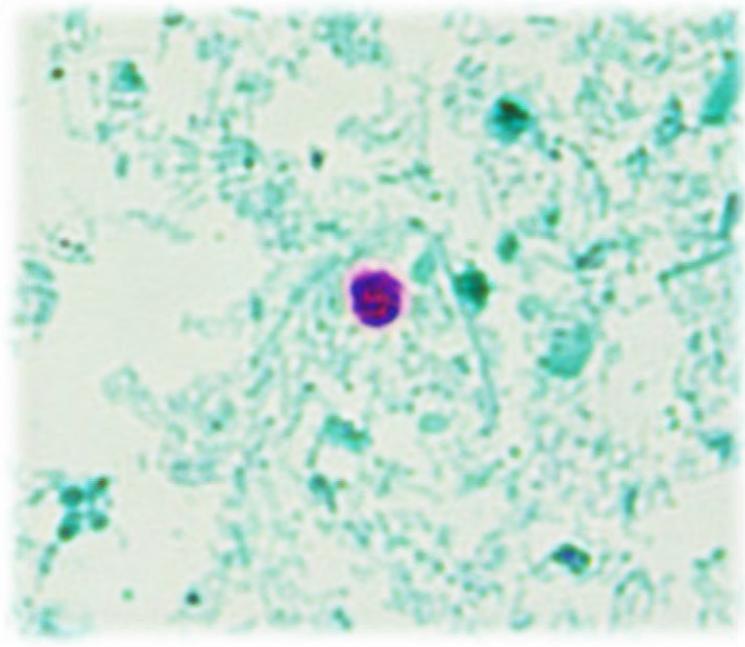


Figura 39: Oocisti di *Cryptosporidium spp* positivi alla colorazione di Ziehl-Neelsen

Caso N° 10

Controllo di qualità Neqas Fecal Parasitology positivo per *Blastocystis spp* sia all'esame microscopico (Figura 40) sia al saggio Novodiag® Stool Parasites.

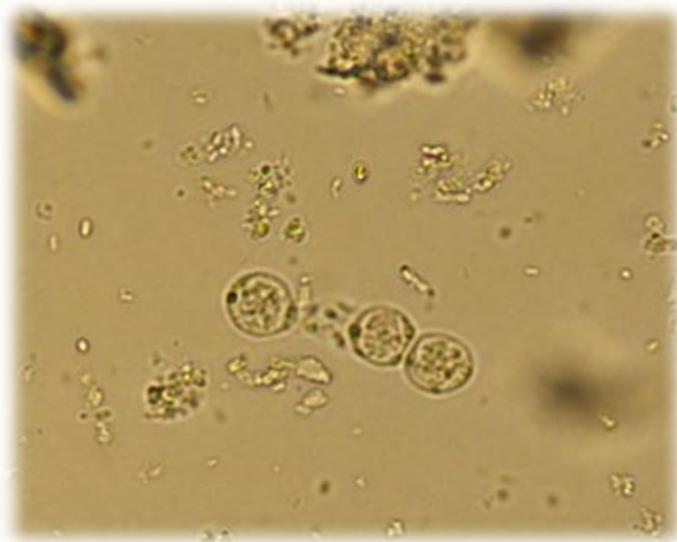


Figura 40: forma vacuolare singola (a sinistra) e in mitosi (a destra) di *Blastocystis spp*

Caso N° 11

Controllo fecale animale (cane) positivo all'esame microscopico per *Toxocara canis* (Figura 41) e Ancilostomatidi (Figura 42) ed *Enterocytozoon bieneusi* (Figura 43). Il saggio biomolecolare Novodiag® Stool Parasites è risultato positivo per *Ancylostoma duodenale* e *Enterocytozoon bieneusi*.

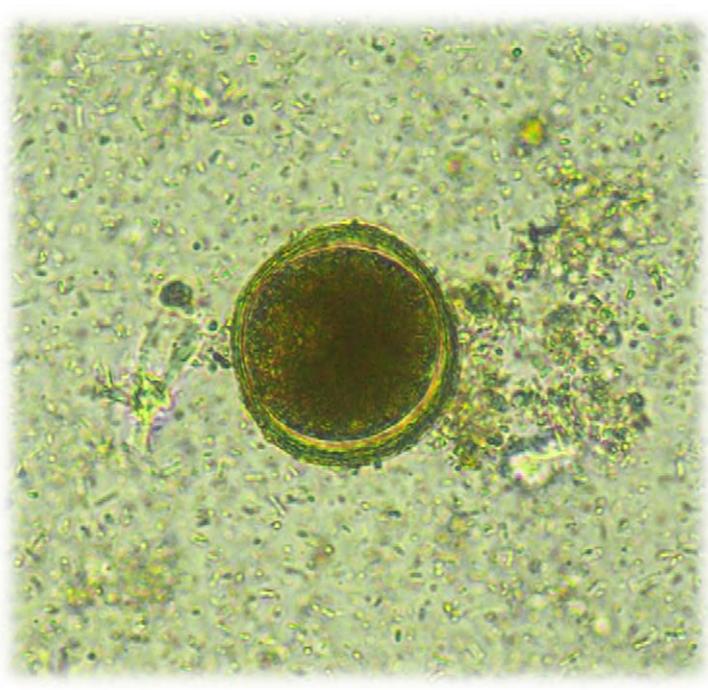


Figura 41: uovo di *Toxocara canis*

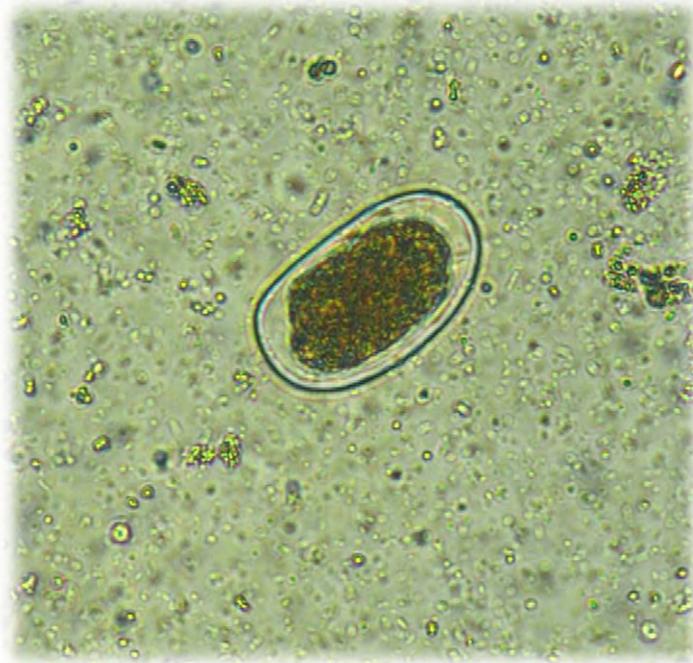


Figura 42: uovo di Ancilostomatide

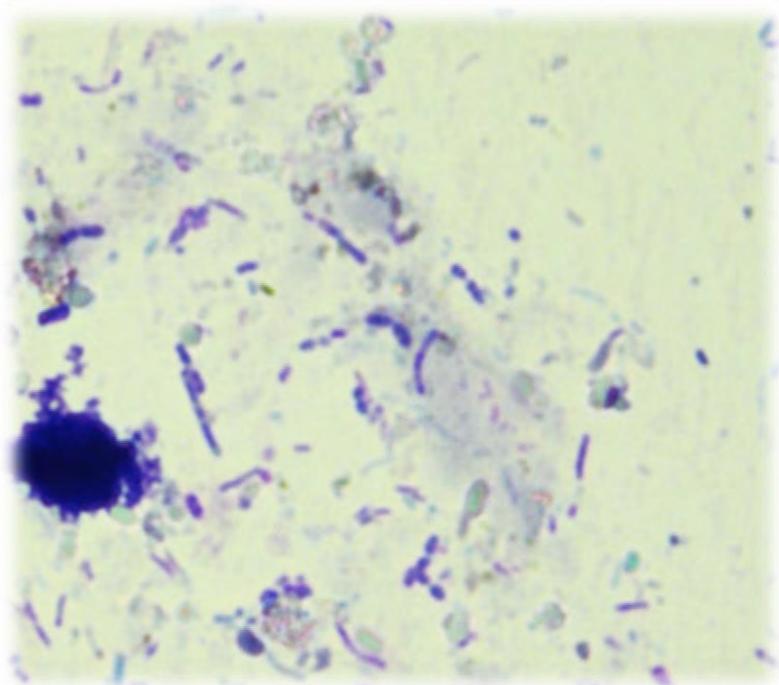


Figura 43: Microsporidi positivi alla colorazione Giemsa

Caso N° 12

Controllo fecale animale (gatto) positivo all'esame microscopico per *Isoospora felis* (Figura 44). Il saggio biomolecolare Novodiag® Stool Parasites è risultato negativo.

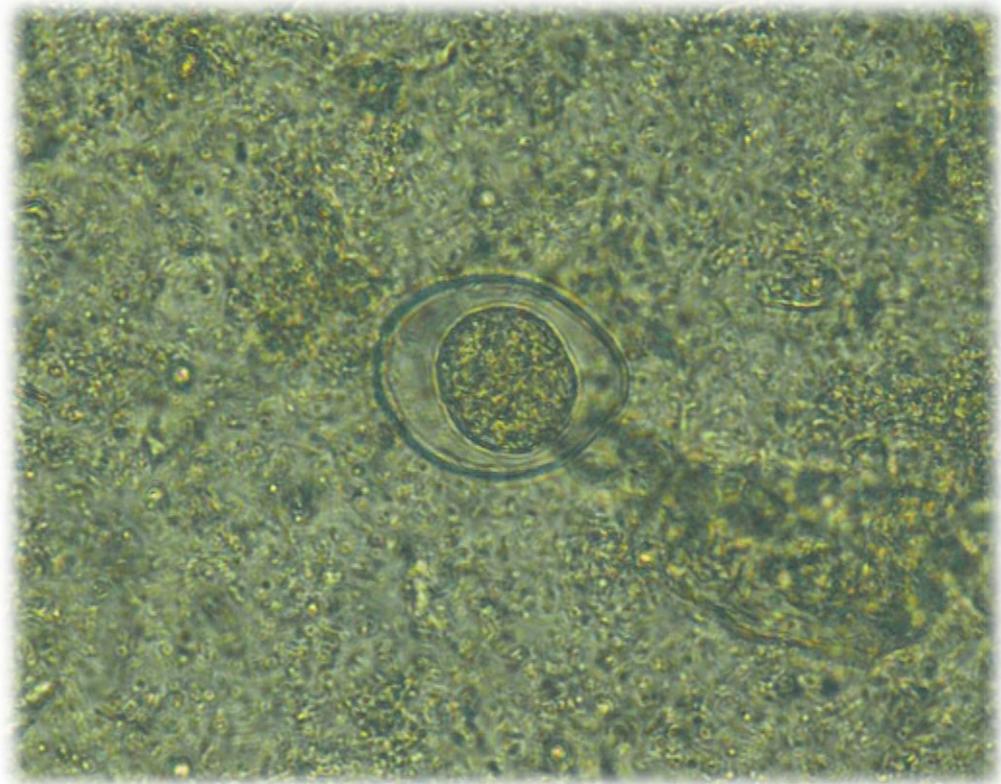


Figura 44: Oociste di *Isoospora felis*

CONCLUSIONI

Le parassitosi intestinali contribuiscono significativamente al peso delle **malattie infettive** in tutto il mondo e gli attuali metodi diagnostici come la microscopia sono laboriosi e richiedono un alto livello di esperienza e competenze. L'alternativa, la diagnostica rapida delle principali parassitosi era fino a pochi anni fa difficile da realizzare. Il test di nuova generazione Novodiag® Stool Parasites combina la PCR in tempo reale e le tecnologie microarray per consentire la rilevazione rapida e completa del >95% di parassiti intestinali anche di difficile identificazione come i Microsporidi. Questo test sindromico è progettato per essere eseguito su richiesta utilizzando il sistema automatizzato Novodiag®, in grado di rilevare la presenza di marcatori di acido nucleico corrispondenti a specifici protozoi ed elminti potenzialmente presenti nei campioni fecali. Il test fornisce risultati completi in circa 90 minuti con meno di cinque minuti di tempo attivo da parte di un operatore. Un laboratorio di microbiologia clinica che deve gestire diverse linee produttive con personale tecnico che ruota su più settori deve orientarsi su una strumentazione di semplice utilizzo, con scarsa operatività manuale, sicuro per l'operatore e possibilmente ad accesso h24. Il laboratorio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria si è orientato su una strumentazione PCR multiplex in grado di identificare più patogeni contemporaneamente in maniera semplice e rapida. I risultati ottenuti da campioni noti provenienti da Controlli di Qualità certificati rivelano una sensibilità e specificità molto alte, sebbene ulteriori studi debbano essere effettuati. *Toxocara canis* e *Isoospora felis* non sono compresi nel pannello di parassiti identificabili dallo strumento Novodiag® Stool Parasites, per questo il saggio biomolecolare è risultato negativo per entrambi i parassiti. I test molecolari hanno tutti il medesimo limite; vedere solo ciò per cui sono stati costruiti. Per questo motivo questo tipo di approccio non sostituisce ma supporta la **parassitologia tradizionale**. Secondo i criteri metodologici definiti per il trattamento dei pazienti affetti da infezioni da *Clostridium difficile* ricorrenti (rCDI) e refrattarie al trattamento antibiotico standard, il trapianto fecale di microbiota richiede un lungo elenco di esami per lo studio del donatore. Il giorno stesso della donazione del materiale fecale devono essere eseguiti i test molecolari rapidi sul campione per i principali patogeni enterici tra cui i parassiti intestinali. Il Laboratorio di Microbiologia deve provvedere all'effettuazione dei test rapidi microbiologici che se negativi determinano l'inizio della lavorazione del materiale fecale da trapiantare. La scelta di un test rapido idoneo per lo screening delle feci di donatore è caduta sul test Novodiag® Stool Parasites, capace di identificare entro 2 ore tutti i parassiti richiesti dalle linee guida descritte dal "Programma Nazionale Trapianto di Microbiota Fecale".

BIBLIOGRAFIA

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>

Bakker, G. J., & Nieuwdorp, M. (2017). Fecal Microbiota Transplantation: Therapeutic Potential for a Multitude of Diseases beyond *Clostridium difficile*. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0008-2017>

Biedermann, L., & Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics*, 174(2), 151–167. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>

Bien, J., Palagani, V., & Bozko, P. (2013). The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 53–68. <https://doi.org/10.1177/1756283X12454590>

Brestoff, J. R., & Artis, D. (2013). Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology*, 14(7), 676–684. <https://doi.org/10.1038/ni.2640>

Britton, R. A., & Young, V. B. (2012). Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends in Microbiology*, 20(7), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.001>

Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., European FMT Working Group. (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569–580. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>

Debast, S. B., Bauer, M. P., Kuijper, E. J., & European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20 Suppl 2, 1–26. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12418>

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11), e280. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060280>

Dubourg, G., Lagier, J. C., Robert, C., Armougom, F., Hugon, P., Metidji, S., Dione, N., Dangui, N. P. M., Pfeleiderer, A., Abrahao, J., Musso, D., Papazian, L., Brouqui, P., Bibi, F., Yasir, M., Vialettes, B., & Raoult, D. (2014). Culturomics and pyrosequencing evidence of the reduction in gut microbiota diversity in

patients with broad-spectrum antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(2), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.020>

Khosravi, A., & Mazmanian, S. K. (2013). Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.009>

Lagier, J.-C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., & Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 136. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00136>

Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Bruno, G., Petito, V., Franceschi, F., & Gasbarrini, A. (2015). The therapeutic management of gut barrier leaking: the emerging role for mucosal barrier protectors. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(6), 1068–1076.

Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K. M., Thomas, L. V., Zoetendal, E. G., & Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>

McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(7), e1–e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>

Mizrahi-Man, O., Davenport, E. R., & Gilad, Y. (2013). Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PloS One*, 8(1), e53608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053608>

Moore, W. E., & Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27(5), 961–979. <https://doi.org/10.1128/am.27.5.961-979.1974>

Paramsothy, S., Borody, T. J., Lin, E., Finlayson, S., Walsh, A. J., Samuel, D., van den Bogaerde, J., Leong, R. W. L., Connor, S., Ng, W., Mitchell, H. M., Kaakoush, N., & Kamm, M. A. (2015). Donor Recruitment for Fecal Microbiota Transplantation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(7), 1600–1606. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000405>

Poretzky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PloS One*, 9(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>

Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E., & Gasbarrini, A. (2013). The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(3), 323–333.

Quraishi, M. N., Widlak, M., Bhala, N., Moore, D., Price, M., Sharma, N., & Iqbal, T. H. (2017). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46(5), 479–493. <https://doi.org/10.1111/apt.14201>

Rajilić-Stojanović, M. (2013). Function of the microbiota. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 27(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.006>

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

Sokol, H., Galperine, T., Kapel, N., Bourlioux, P., Seksik, P., Barbut, F., Scanzi, J., Chast, F., Batista, R., Joly, F., Joly, A.-C., Collignon, A., Guery, B., Beaugerie, L., & French Group of Faecal microbiota Transplantation (FGFT). (2016). Faecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: Recommendations from the French Group of Faecal microbiota Transplantation. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 48(3), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.08.017>

Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbò, S., Bruno, G., Simeone, G., & Mele, G. (2015). Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(6), 1077–1085.

Vindigni, S. M., & Surawicz, C. M. (2017). Fecal Microbiota Transplantation. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.012>

Vollaard, E. J., & Clasener, H. A. (1994). Colonization resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(3), 409–414. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.3.409>

Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>

 **irfi** | infrastruttura ricerca
formazione innovazione
Azienda Ospedaliera di Alessandria

pubblicazione
revisionata e
approvata
giugno 2021

disponibile online
[www.ospedale.al.it/
working-papers-wp](http://www.ospedale.al.it/working-papers-wp)