



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Valutazione di un nuovo metodo diagnostico utilizzando lo
strumento automatico e associato a intelligenza artificiale FA-280
di Orienter per la ricerca di protozoi ed elminti intestinali in
campioni di feci

Relatore:

Prof. Michele Castelli

Correlatore:

Dott. Edoardo Carretto

Dott.ssa Marina Cuntrò

Tesi Sperimentale di
Giulia Facchetti

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

I.	Introduzione	1
1.	Parassitologia storica e storia della parassitologia	2
2.	Le principali parassitosi intestinali umane e la loro epidemiologia	5
2.1	<i>Giardia duodenalis</i>	5
2.2	<i>Entamoeba histolytica</i>	7
2.3	<i>Taenia</i> spp.	9
2.4	<i>Enterobius vermicularis</i>	11
2.5	<i>Strongyloides stercoralis</i>	13
2.6	<i>Ascaris lumbricoides</i>	15
3.	Diagnosi tradizionale di parassiti fecali	17
3.1	Fase preanalitica.....	18
3.2	Tecniche diagnostiche dirette.....	19
3.3	Tecniche diagnostiche indirette.....	25
4.	Utilizzo dell'intelligenza artificiale in ambito medico-sanitario	26
5.	Utilizzo dell'intelligenza artificiale in ambito microbiologico.....	28
6.	Utilizzo dell'intelligenza artificiale in parassitologia.....	29
6.1	Identificazione parassiti ematici	29
6.2	Identificazione di parassiti fecali.....	30
II.	Scopo del lavoro.....	34
III.	Materiali e metodi.....	38
1.	Percorso diagnostico ASST Papa Giovanni XXIII	38
1.1	Ricerca microscopica.....	38
1.2	Esame colturale <i>Strongyloides stercoralis</i>	39
1.3	Indagine antigenica	40
2.	Materiali.....	41
3.	Metodi.....	42
IV.	Risultati e discussione	47
V.	Conclusioni	59
VI.	Bibliografia	63

I. Introduzione

Il parassitismo è un'interazione biologica in cui un organismo, il parassita, vive a spese di un altro individuo, l'ospite, causandogli spesso danni dovuti ad una diminuzione dei nutrienti, alla produzione di tossine, all'attivazione di una risposta immunitaria infiammatoria o provocando dei veri e propri danni fisico-meccanici.

I parassiti possono essere suddivisi in tre categorie: i protozoi sono organismi unicellulari microscopici; gli elminti sono vermi multicellulari, ulteriormente suddivisibili in Nematodi (vermi cilindrici), Cestodi (vermi piatti) e Trematodi (vermi piatti a forma di "foglia"); gli artropodi parassiti, che vivono frequentemente all'esterno dell'ospite sulla sua cute (ectoparassiti), come acari e pidocchi.

Inoltre, posso essere raggruppati in base alle 6 strategie parassitiche proposte da Poulin [1]:

- Parassitoidi: compiono il ciclo di vita all'interno di un singolo ospite, hanno un'elevata virulenza ma con un'intensità di infezione bassa (circa 1 parassita per ospite). Sono di grandi dimensioni, crescono all'interno dell'ospite e quasi sempre ne causano la morte quando hanno completato il loro sviluppo (es. nematomorfi, nematodi mermitidi, ma anche funghi come *Cordyceps*);
- Parassiti castratori: come i parassitoidi hanno un ciclo vitale in un singolo ospite, con elevata virulenza ma con un'intensità di infezione bassa. Si differenziano dai parassitoidi, per la loro capacità, all'inizio dell'infezione, di inibire totalmente o quasi la riproduzione dell'ospite per poter sfruttare le risorse destinate a questo processo biologico (es. alcuni stadi giovanili degli elminti, ascotoracidi e rhizocephali);
- Parassiti a trasmissione diretta: è stata probabilmente la prima strategia parassitica a essere stata adottata. Il ciclo vitale avviene all'interno di un singolo ospite ma la virulenza è dipendente dalla intensità di infezione (es. molti nematodi, *Giardia* spp., molti virus e batteri);
- Parassiti trasmessi per via trofica: il ciclo vitale richiede almeno due ospiti di specie diverse, hanno generalmente una virulenza maggiore nell'ospite intermedio ma minore nell'ospite definitivo, spesso dipendente dall'intensità di infezione. La trasmissione avviene principalmente per la predazione dell'ospite intermedio dall'ospite definitivo, spesso dovuta all'alterazione del comportamento

dell'intermedio da parte del parassita stesso (es. tutti i trematodi -eccezione degli Schistosomi-, cestodi e diversi nematodi);

- Micropredatori: sfruttano un numero indeterminato di ospiti, anche della stessa specie, per completare la loro riproduzione, ma generalmente non provocano danni importanti agli ospiti. Ogni interazione con ciascun ospite dura relativamente poco ed è seguita da un periodo al di fuori dell'ospite per effettuare la muta o la ovodeposizione (es. ditteri ematofagi, sanguisughe, pulci e pidocchi);
- Parassiti trasmessi attraverso un vettore: anche in questo caso il ciclo vitale richiede almeno due ospiti di specie diverse, un vertebrato che funge da ospite e in cui hanno una virulenza maggiore, e un micropredatore che funge da vettore e per cui hanno una virulenza minore (es. protisti come *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp., ma anche funghi, batteri e virus).

L'uomo è stato da sempre un ospite ideale per i parassiti, grazie alla sua diffusione in tutto il globo, in diverse condizioni climatiche e a contatto con molte altre specie.

Si conoscono circa 300 elminti e 70 protozoi in grado di infettare l'uomo, ma di questi solo una ventina sono anche agenti eziologici di malattie di rilievo.

I sintomi delle parassitosi intestinali vanno dalla diarrea a dolori addominali, ma anche affaticamento e riduzione delle difese immunitarie.

Oggi si stima che circa 3,5 miliardi di persone siano affette da infestazioni parassitiche, e, di queste, 450 milioni manifestino sintomi clinici [2].

1. Parassitologia storica e storia della parassitologia

Grazie alla paleoparassitologia, ovvero lo studio dei parassiti in reperti paleontologici di scheletri, alimenti e coproliti (feci essiccate o fossilizzate), è stato possibile ricostruire la storia dell'uomo in associazione ad alcuni dei principali parassiti che ancora oggi fanno parte della nostra vita quotidiana.

Le testimonianze scritte hanno fornito importanti informazioni sull'andamento delle parassitosi nella storia dell'uomo. I primi scritti riguardanti casi di infestazioni da parte di organismi parassitici risalgono all'Antico Egitto (4000-3000 a.C): nel papiro di *Ebers* sono menzionati e descritti per la prima volta *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* e *Dracunculus medinensis*; in molti papiri medici viene anche spesso

rappresentato il geroglifico “aaa”, che sembrerebbe indicare individui con ematuria associabile, come unico sintomo, a *Schistosoma haematobium* [3].

Il rinvenimento di Ötzi, la mummia del Similaun (Alpi Italiane) vissuta circa nel 3300 a.C, ha permesso un'altra importante scoperta nell'ambito della paleoparassitologia da parte del Dott. Cox. Analizzando infatti i suoi resti sono state trovate numerose uova di *Trichuris trichiura* ben conservate all'interno dell'intestino.

Il documento sanscrito *Bhrihu Samhita* (1000 a.C) presenta probabilmente i primi casi di amebiasi, descrivendo soggetti che manifestano diarrea grave con sangue e muco che, secondo gli storici della medicina, sarebbe dovuta all'ulcerazione e alla penetrazione della parete intestinale da parte di *Entamoeba histolytica* [3].

Anche nell'antica Grecia, illustri studiosi quali Ippocrate (460-370 a.C) e Aristotele (384-322 a.C), hanno trattato delle forme larvali di *Taenia solium* e altri parassiti vermiformi.

Nel Medioevo, con l'aumento delle tratte commerciali e la costruzione di complessi abitativi in ambienti malsani e malarici, si è assistito ad una diffusione notevole di malattie parassitiche che ha portato le migliori scuole di medicina europee a focalizzarsi sullo studio principalmente della malaria e della sua diffusione.

Jehan de Brie (1379), invece, riconosce e descrive il primo elminta (*Fasciola hepatica*) responsabile di malattie epatiche che colpiscono il bestiame. In particolare, si tratta di un parassita che colpisce le pecore, ma che è in grado di infestare anche altre specie, tra cui l'uomo.

Se da un lato è evidente l'abbondanza di casi di parassitosi in Europa e in oriente, è invece interessante notare che nella popolazione del Nuovo Mondo vi erano delle differenze sostanziali nell'incidenza e nelle specie parassitarie prima del contatto transoceanico. Storicamente si è ritenuto che la struttura sociale dei nativi americani, basata su piccoli gruppi nomadi di “cacciatori-raccoglitori”, abbia limitato la diffusione degli elminti, a causa della bassa densità abitativa e della mobilità che impediva il completamento dei cicli biologici di molti parassiti legati alla contaminazione del suolo.

Tuttavia, l'idea che gli Europei abbiano introdotto *ex novo* l'intero spettro parassitario è stata smentita dalle evidenze paleoparassitologiche: sebbene l'arrivo dei colonizzatori e la successiva introduzione degli schiavi dall'Africa abbiano drasticamente modificato l'assetto epidemiologico -attraverso la sedentarietà, lo sfruttamento del suolo e l'importazione di

nuovi ceppi e di patogeni come *Plasmodium falciparum*- molti agenti eziologici erano già presenti nel continente americano. Il ritrovamento in Nord e Sud America di resti ossei antecedenti al 1492 con segni di patologie come tubercolosi [4], unitamente al ritrovamento in Brasile di uova di *Ancylostoma duodenale* in coproliti datati al 3350 a.C [3], dimostra che alcuni parassiti del “Vecchio Mondo” avevano già colonizzato le Americhe millenni prima di Colombo, probabilmente seguendo rotte migratorie preistoriche transpacifiche o terrestri.

Fino alla fine dell’800 l’interesse per i parassiti era limitato alla zoologia, per poi infine estendersi alla medicina: il XIX secolo è considerato il “Secolo d’oro” della parassitologia, poiché finalmente fu riconosciuta l’importanza della materia, e molti scienziati si dedicarono allo studio dei cicli vitali dei parassiti e all’integrazione delle informazioni che nei secoli erano state raccontate e descritte, per ottenere un insieme coerente.

Un esempio è l’hookworm (*A. duodenale*), nematode ritrovato per la prima volta nel 1838 dall’italiano Angelo Dubini in un paziente; la connessione tra il parassita e la malattia è stata individuata nel 1852 da Theodor Bilharz, ma solo nel 1879 il veterinario Edoardo Perroncito è riuscito a stabilire un vero e proprio collegamento: egli aveva osservato che i lavoratori della galleria del San Gottardo manifestavano anemia e cachessia dovuta probabilmente all’infezione da parte di questo “verme a uncino”, il quale ha causato numerosi morti tra i minatori.

Nel XX secolo molti altri parassiti sono stati scoperti e/o associati alla patologia da essi causata, come *Toxoplasma gondii*, protista ritrovato in molti mammiferi e uccelli in tutto il mondo: provoca spesso un’infezione asintomatica ma in pazienti immunodepressi e in feti può essere letale. Nel 1937 si è capito che *T. gondii* è in grado di passare la barriera placentare e nel 1970 si è stati capaci di comprendere il ciclo vitale completo che presenta una fase nell’intestino del gatto (ospite definitivo), informazione fondamentale per ridurre il rischio di infezione.

La parassitologia del XXI secolo, più che dedicarsi alla scoperta di nuovi parassiti o ai loro cicli vitali, si è interessata a sviluppare farmaci e vaccini economici ed efficaci per trattare/prevenire le parassitosi e a comprendere come il miglioramento delle condizioni socio-economiche delle popolazioni più esposte sia essenziale per eliminare o ridurre sensibilmente l’esposizione dell’uomo agli ospiti intermedi o al parassita stesso.

Nonostante le nostre conoscenze della parassitologia siano decisamente più complete e corrette rispetto al passato, il numero di casi è tutt’oggi molto elevato a causa

dell'urbanizzazione, dell'inquinamento e dello sfruttamento eccessivo delle risorse naturali, unito ai conflitti armati, alla povertà e ai cambiamenti climatici che hanno dimostrato essere fattori favorevoli alla diffusione delle parassitosi [5].

2. Le principali parassitosi intestinali umane e la loro epidemiologia

2.1 *Giardia duodenalis*

Definita anche come *Giardia lamblia*, si tratta di un protozoo flagellato monoxeno (necessita di un unico ospite) appartenente ai Diplomonadida, molto diffuso soprattutto in luoghi temperati-caldi e umidi.

Durante il suo ciclo vitale può assumere due forme, quella di trofozoita (forma flagellata) e quella di cisti di resistenza (Fig. 1).

L'uomo generalmente si infetta ingerendo acqua o cibi contaminati dalle cisti. Essendo forme di resistenza, le cisti sono in grado di sopravvivere all'ambiente acido dello stomaco e, una volta arrivate nell'intestino tenue, liberano i trofozoiti, che vanno ad aderire alla mucosa per ricavare i nutrienti necessari direttamente dalle cellule intestinali.

Man mano che discendono lungo il tratto intestinale, i trofozoiti percepiscono la graduale disidratazione, formando nuovamente le cisti che poi verranno espulse con le feci, pronte a infettare un nuovo ospite.

L'infezione è normalmente asintomatica poiché non vi è un danno diretto ai tessuti, sebbene in alcuni casi si possono presentare sintomi come diarrea, dolori addominali e diminuzione di peso dovuta alla perdita di nutrienti.

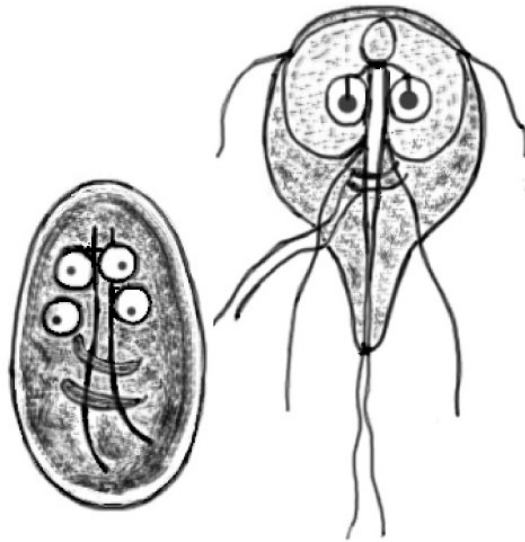


Fig. 1-rappresentazione grafica di *Giardia duodenalis* sia in forma di ciste che in forma di trofozoita (fonte: CDC Public Health Image Library (PHIL), Alexander J. da Silva, PhD; Melanie Moser, 2002. Immagine di pubblico dominio [6]).

Secondo un report europeo del 2022, i casi confermati di giardiasi in Europa sono stati quasi 11 000, ovvero circa 4 casi ogni 100 000 abitanti (Fig.2). I casi registrati sono stati principalmente in Spagna e Germania. I maschi sono generalmente i più colpiti, in particolare nella fascia tra gli 0 e i 4 anni [7].

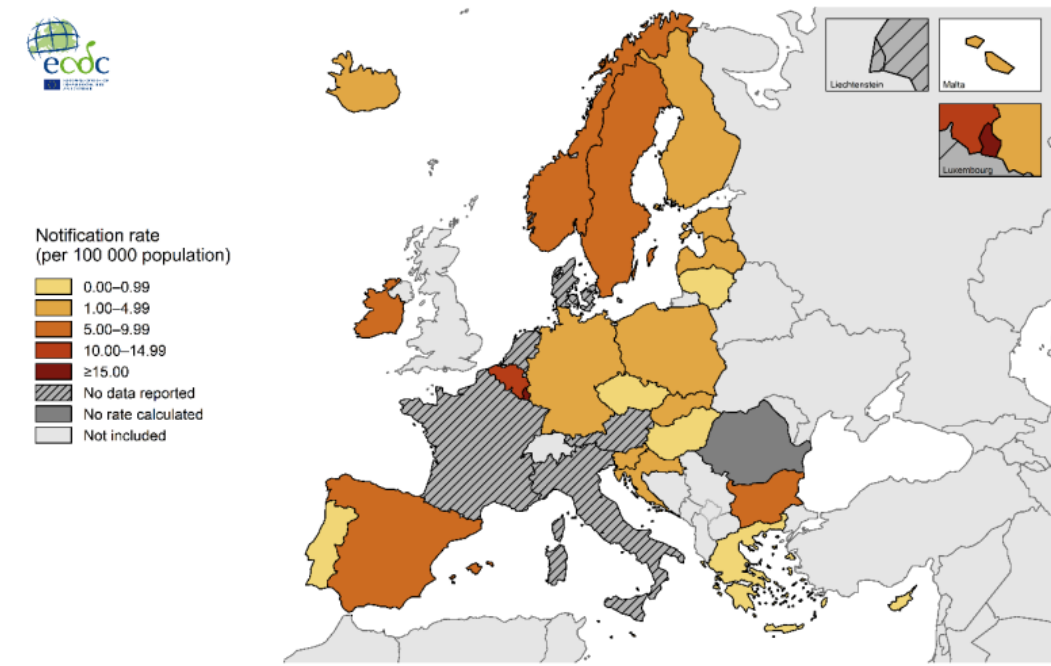


Fig. 2-distribuzione di giardiasi in Europa nel 2022 (fonte: ECDC, *Giardiasis – Annual Epidemiological Report for 2022 (2024)*. © ECDC 2024, riproduzione autorizzata con citazione della fonte [7]).

2.2 *Entamoeba histolytica*

Come in molti altri casi, il ciclo comincia con l'ingestione di alimenti o acque contaminati dalle cisti di questo protista.

Una volta raggiunto l'intestino, dalle cisti (Fig. 3) vengono liberate le amoebe metacistiche, che vanno incontro ad una serie di divisioni citoplasmatiche. Man mano che discendono verso l'intestino crasso, come in *G. duodenalis*, i trofozoi percepiscono l'aumento della disidratazione e iniziano a formare le cisti di resistenza, che possono essere liberate nell'ambiente esterno con le feci. In alcuni casi i trofozoi possono virare ad una forma magna o istolitica causando danni seri all'ospite: il parassita inizia a produrre delle proteasi ad attività istolitica e si diffonde attraverso il flusso sanguigno a diversi organi, primo tra tutti il fegato.

L'amebiasi rappresenta la terza malattia parassitaria per distribuzione, dopo malaria e schistosomiasi, colpendo circa 500 milioni di persone ogni anno. Di questi solo il 10% è infettato da *E. histolytica*, la quale causa circa 100 000 decessi annui.

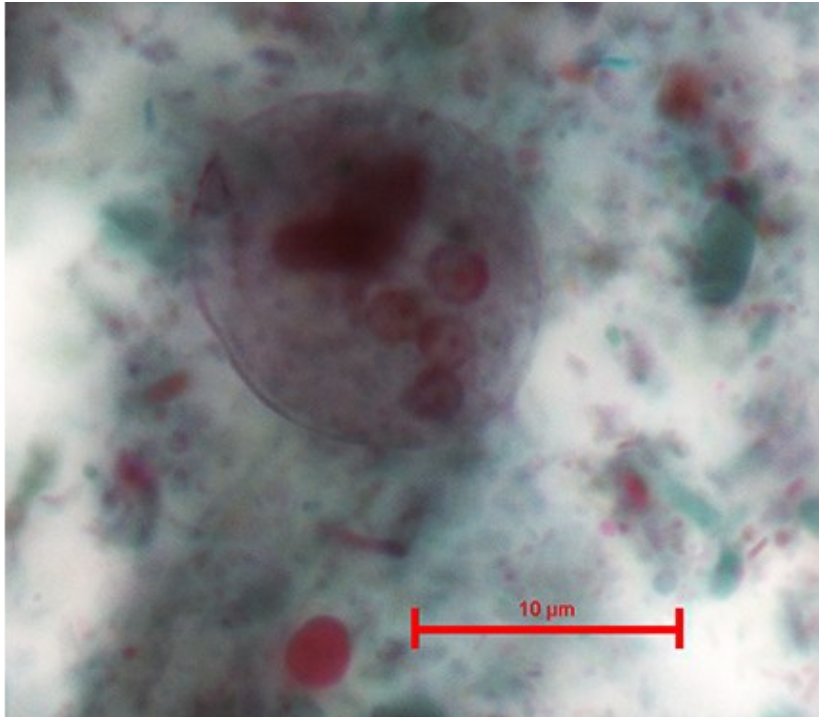


Fig. 3-immagine al microscopio ottico di *Entamoeba histolytica* caratterizzata dalla presenza di 4 nuclei (fonte: *Stefan Walkowski, Wikimedia Commons, 2021, licenza CC BY-SA 4.0* [8]).

Si tratta di una specie endemica della fascia tropicale e subtropicale, prevalentemente in India, Brasile, Colombia, Messico e Cina (Fig. 4). Gli individui più soggetti a contrarre l'amebiasi sono i viaggiatori e gli immigrati da queste regioni, ma anche gli omosessuali e i carcerati [9].

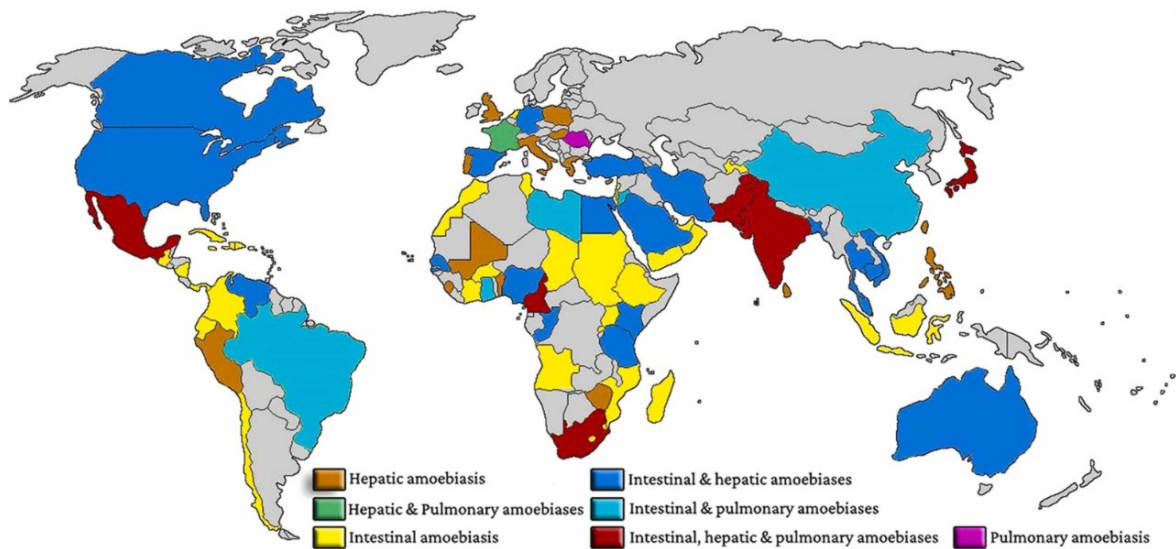


Fig. 4-distribuzione di amebiasi mondiale nel 2022 (tratto da *Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review, 2022* [9]).

2.3 *Taenia* spp.

Questi parassiti appartenenti alla classe dei Cestoda presentano uno strobilo (corpo segmentato) composto da una testa più piccola (scolice) con una struttura per l'ancoraggio alla parete intestinale, e dal collo da cui poi dipartono le proglottidi (elementi segmentali convolti nella riproduzione sessuata).

Si tratta di un endoparassita dixeno.

Le due principali specie di interesse sono *T. solium* e *T. saginata*.

T. solium è caratterizzata da uno scolice con quattro ventose e un rostellolo uncinato; può raggiungere dimensioni fino a 3 metri. Di solito è presente un solo individuo per ospite, motivo per cui è anche chiamato "verme solitario", e vi può permanere fino a 10 anni. È molto diffusa in America Latina e in Asia.

Il ciclo vitale prevede l'emissione con le feci umane delle proglottidi, dopo di che queste si rompono e liberano le uova, le quali saranno fin da subito in grado di infestare un nuovo ospite. Il maiale (ospite intermedio) si contamina ingerendo le uova embrionate e nei suoi muscoli si sviluppano i cisticerchi, ovvero forme larvali incistate, diventando il mezzo di trasmissione per l'uomo.

La manifestazione clinica più pericolosa per l'uomo si ha quando quest'ultimo diventa l'ospite intermedio e sviluppa la cisticercosi: le uova si schiudono all'interno dell'intestino e i cisticerchi si fissano nei tessuti dove, una volta morti, provocano una forte risposta immunitaria che induce un danno patologico.

T. saginata, invece, non presenta il rostellolo uncinato, ma solo quattro ventose e ha come ospite intermedio i bovini. Il ciclo vitale è paragonabile a quello di *T. solium*. La sua diffusione è maggiore ma i danni provocati sono trascurabili in soggetti sani e immunosufficienti, in quanto i cisticerchi non sono in grado di svilupparsi nel corpo umano.

Le due specie sono distinguibili, all'esame microscopico, andando a valutare il numero di ramificazioni uterine: *T. saginata* ne ha almeno 12 (Fig. 5).



Fig. 5-immagine al microscopio di uovo di *Taenia saginata* con embrione visibile (oncosfera)
(fonte: *Stafan Walkowski, Wikimedia Commons, licenza: CC BY-SA 3.0. [10]*).

La diffusione di *T. solium* rappresenta un importante problema di salute pubblica, ed economica, principalmente nei paesi in via di sviluppo del Sud America, Africa e Asia, dove l'allevamento intensivo di maiali, unito allo stretto contatto di quest'ultimi con la popolazione e le scarse condizioni igienico-sanitarie, è responsabile di 2,56 milioni di casi di teniosi umana e di oltre 8 milioni di casi di cisticercosi (Fig. 6).

Anche la prevalenza di *T. saginata* costituisce un problema di salute pubblica mondiale, ma l'incapacità delle uova di questa specie di *Taenia* di causare cisticercosi la rendono meno pericolosa [11].

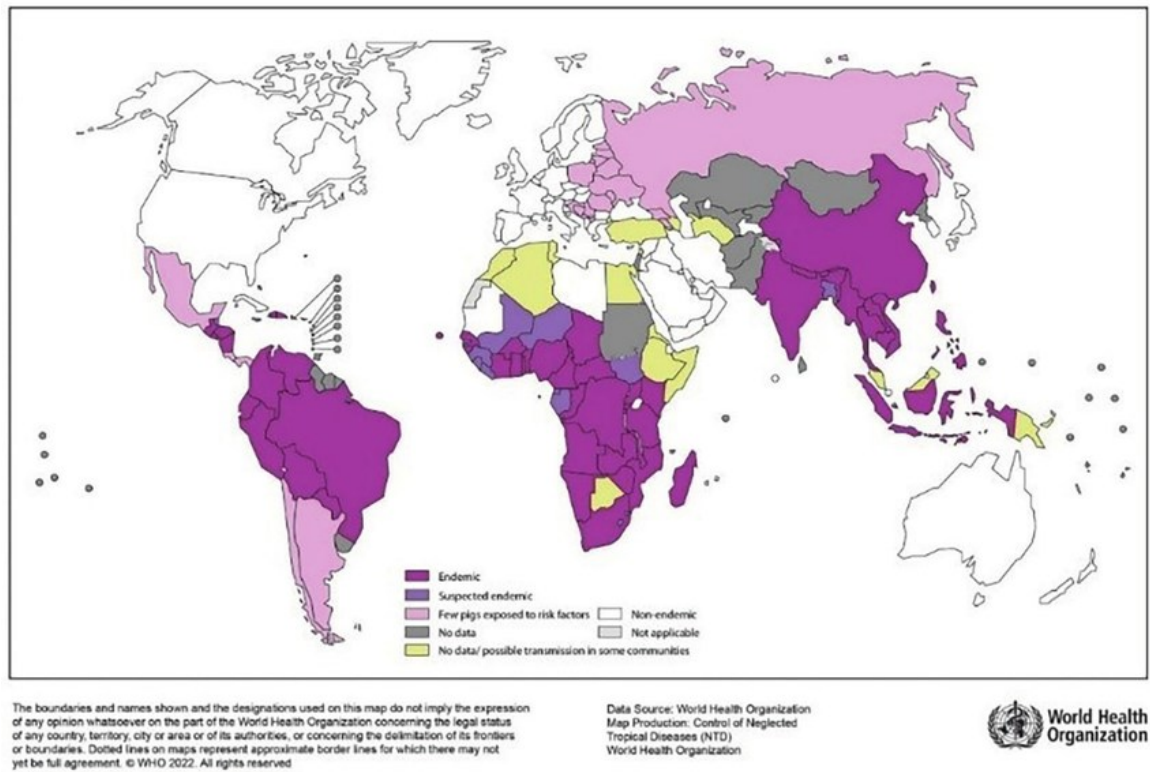


Fig. 6-distribuzione mondiale di *T. solium* nel 2022 (tratto da *Epidemiology of Taeniosis/Cysticercosis in Humans and Animals*, 2023 [11]).

2.4 *Enterobius vermicularis*

È un nematode monoxeno di piccole dimensioni con elevato dimorfismo sessuale, chiamato comunemente “ossiuro” (Fig. 7).

L’infestazione ha inizio con l’assunzione di cibo contaminato dalle uova di questo parassita. Una volta raggiunto l’intestino, le uova si schiudono liberando le larve, che migrano nell’intestino cieco e diventano adulti. Gli adulti aderiscono alla mucosa del cieco e si accoppiano: le femmine gravide di notte sforzano lo sfintere anale, provocando prurito, e rilasciano le uova: non essendo le uova immesse direttamente all’esterno attraverso le feci, il valore della ricerca nel campione fecale è da considerarsi limitato.



Fig. 7-immagine al microscopio ottico di uova di *Enterobius vermicularis* (fonte: *Courtesy, CDC Public Health Image Library (PHIL), 2019 [12]*).

È tra le parassitosi più comuni, e colpisce maggiormente soggetti in età pediatrica e adolescenziale. Spesso è asintomatica, ma il forte prurito anale è spesso un indice di infestazione.

Si stima che la media globale di bambini infettati da *E. vermicularis* si aggiri attorno al 13%; in particolare le aree geografiche in cui è maggiormente diffusa sono la Cina (55%), il Myanmar (47.2%) e il Cile (35%) [13] (Fig. 8).

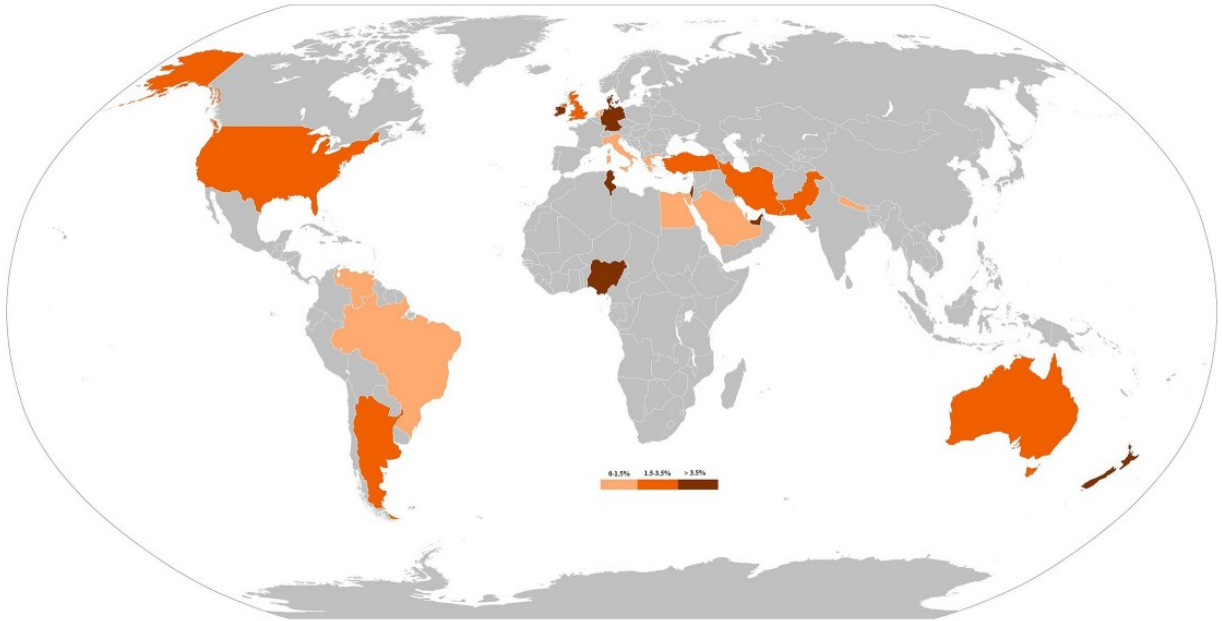


Fig. 8-distribuzione mondiale di *Enterobius vermicularis* nel 2020 (tratto da *The neglected role of Enterobius vermicularis in appendicitis: A systematic review and metaanalysis, 2020* [14]).

2.5 *Strongyloides stercoralis*

Si tratta di un geelminta (Nematode) con un ciclo vitale molto complesso, il quale dipende dalla temperatura ambientale (Fig. 9).

Il parassita è in grado di infestare l'ospite penetrando la cute sana e da qui entrare nel circolo sanguigno per raggiungere cuore e polmoni. Una volta raggiunti i polmoni, causa la rottura dei capillari, arriva agli alveoli polmonari per poi risalire la trachea e infine ridiscendere lungo il tubo digerente fino ad insediarsi nella mucosa del duodeno. A questo punto, le femmine producono le uova e le larve L1, che raggiungono il lume intestinale e vengono liberate all'esterno con le feci, pronte a infestare un nuovo ospite.

I sintomi dell'infestazione variano molto da individuo a individuo e in base al sito in cui il parassita si trova: a livello cutaneo si ha una reazione eritemato-pruriginosa; nel polmone causa infiammazione, tosse e piccole perdite ematiche, raramente si ha febbre o polmonite; a livello intestinale provoca dolore e diarrea.

In caso di soggetti immunodepressi e positivi a HIV, l'infestazione è molto più impattante sullo stato di salute, in quanto può comportare anche infezioni batteriche secondarie, meningiti, setticemia ed encefaliti.



Fig. 9-immagine al microscopio di *Strongyloides stercoralis* (fonte: *Ajay Kumar Chaurasiya, Wikimedia Commons, licenza CC BY-SA 4.0, 2017 [15]*).

La strongiloidosi è una patologia tropicale negletta, che nel 2017 ha colpito circa 615 milioni di persone nel Mondo, con un'incidenza maggiore nei Paesi tropicali e subtropicali (76.1%) [16] (Fig. 10).

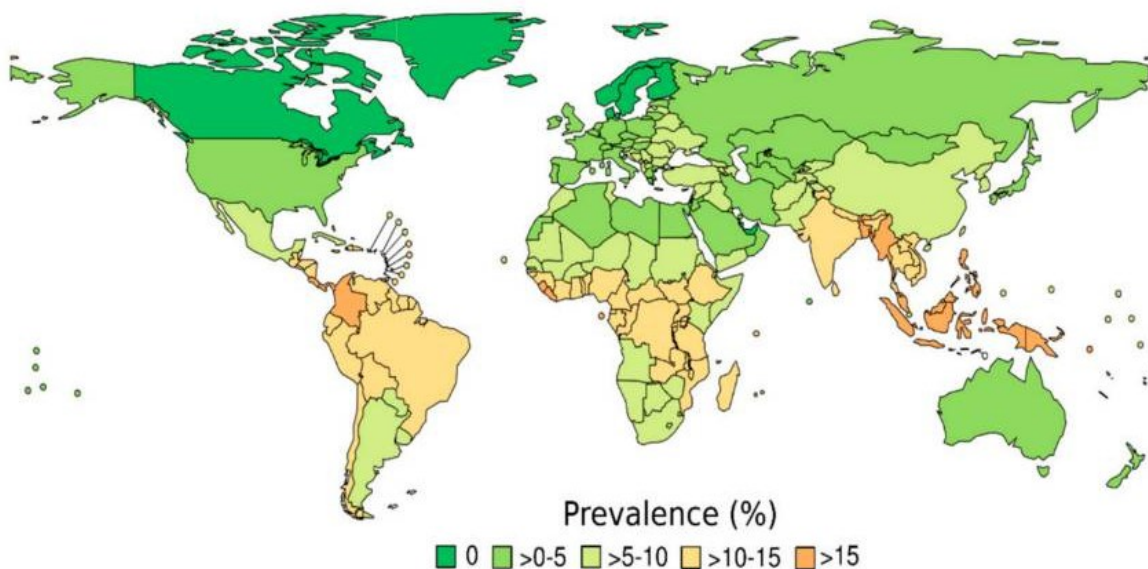


Fig. 10-distribuzione mondiale di strongiloidosi nel 2017 (tratto da *The Global Prevalence of Strongyloides stercoralis Infection, 2017 [16]*).

2.6 *Ascaris lumbricoides*

È un grosso nematode (fino a 35 cm) appartenente alla famiglia degli Ascarididae (Fig. 11).

Si può facilmente riconoscere dall'apparato buccale composto da tre labbra sviluppate per l'adesione alla parete intestinale dell'ospite.

Il suo ciclo vitale complesso incomincia spesso con l'ingestione di verdure contaminate da feci contenenti le uova (Fig. 12). Raggiunto l'intestino, le larve vengono liberate e penetrano la parete intestinale per arrivare al fegato e quindi entrare nel torrente circolatorio fino ai polmoni. Dopo circa 10 giorni nelle vie respiratorie, le forme adulte vengono in buona parte deglutite e si ancorano nell'intestino, dove si accoppiano e liberano le uova.

I sintomi polmonari sono generalmente assenti quando si tratta di infestazioni di lieve-media entità. Gli adulti di *A. lumbricoides* producono neurotossine che provocano crampi diffusi, insonnia e convulsioni.



Fig. 11-rappresentazione di *Ascaris lumbricoides* (fonte: *Delorieux for Johann Gottfried Bremser, Wikimedia Commons, Pubblico Dominio*, 1831 [17]).



Fig. 12-immagine al microscopio di uovo non fecondato (A) e fecondato (B) di *Ascaris lumbricoides* (fonte: (A) *Graham Colm, Wikimedia Commons, CC BY-SA 3.0, 2010* [18] e (B) *SuSanA Secretariat, Wikimedia Commons, licenza CC BY 2.0, 2015* [19]).

Una revisione sistematica associata a una meta-analisi ha raccolto i dati di infestazioni da *Ascaris* dal 2011 al 2021 con lo scopo di osservare l'epidemiologia di ascaridiosi a livello globale. Questo lavoro ha concluso che circa 732 milioni di persone ne fosse affetto, con una maggior prevalenza in America Latina e nella regione caraibica, nelle popolazioni rurali a basso indice di reddito e nei bambini [20].

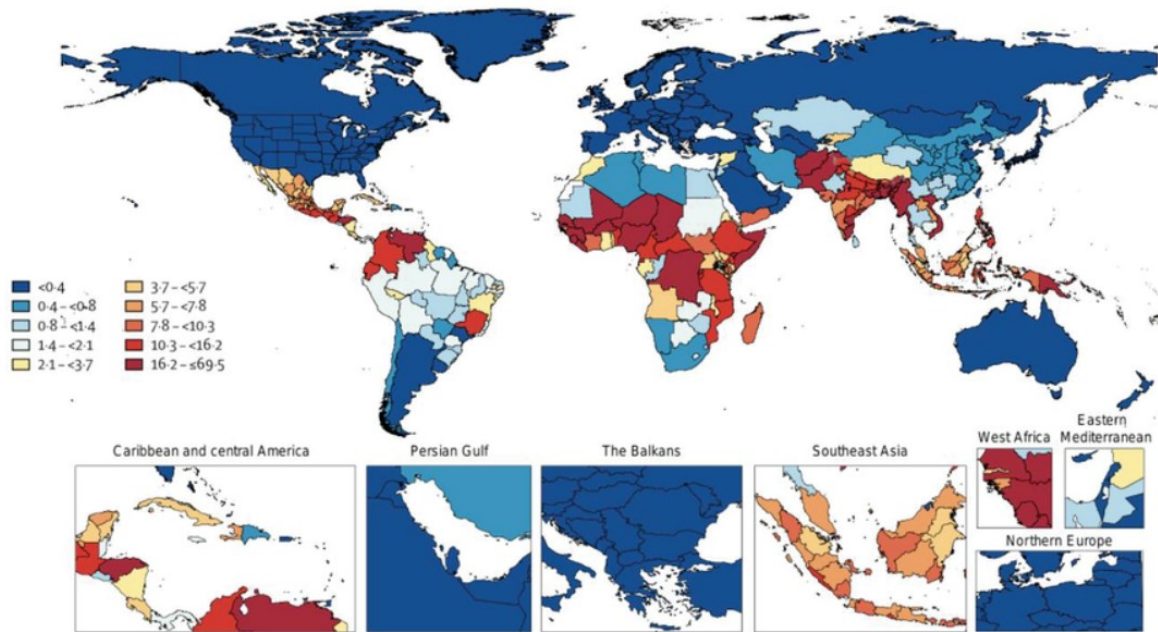


Fig. 13-distribuzione globale dei DALY associati ad *Ascaris* nel 2019 (tratto da *A historical and systematic overview of Ascaris vaccine development, 2021* [21]).

3. Diagnosi tradizionale di parassiti fecali

Per secoli l'osservazione di parassiti intestinali è stata eseguita solo al microscopio ottico. Con il progredire delle conoscenze scientifiche, anche le metodiche utilizzate per l'osservazione e la diagnostica si sono evolute, ma ad oggi la microscopia ottica, associata a tecniche di concentrazione e a metodiche complementari secondo il sospetto clinico, rappresenta ancora un riferimento fondamentale nella diagnosi dei parassiti fecali, pur essendo fortemente dipendente dall'esperienza dell'operatore. Inoltre, l'individuazione di parassiti in campioni fecali attraverso l'utilizzo del microscopio è molto complessa e richiede particolari attenzioni in tutte le fasi.

Le principali criticità, oltre alla capacità dell'operatore, sono attribuibili alla natura della matrice biologica e al limitato numero di campioni positivi: la disponibilità esigua di campioni veri positivi di controllo riduce la possibilità di formare gli operatori sul riconoscimento, attraverso la visione al microscopio, delle strutture parassitiche da ricercare. Unitamente, la matrice fecale è molto eterogenea, ricca di componenti con morfologie e dimensioni paragonabili a quelle di uova e cisti di parassiti intestinali (falsi positivi) ma al tempo stesso l'elevato numero di interferenti può "mascherare" la presenza, portando l'operatore a considerare erroneamente il campione negativo.

In considerazione delle problematiche associate all'individuazione dei parassiti intestinali, negli ultimi decenni si è cercato costantemente di trovare nuovi metodi per la diagnosi, in modo da migliorare sempre più la sensibilità e la specificità: ad esempio la ricerca di antigeni e anticorpi specifici, l'esame colturale e la ricerca biomolecolare permettono di rendere il percorso diagnostico più completo e multi-parametrico. In alcuni casi, i nuovi metodi sono riusciti perfino a soppiantare l'analisi al microscopio diventando test di conferma, come ad esempio la ricerca di antigeni specifici di *Giardia duodenalis* tramite saggio immunoenzimatico (EIA).

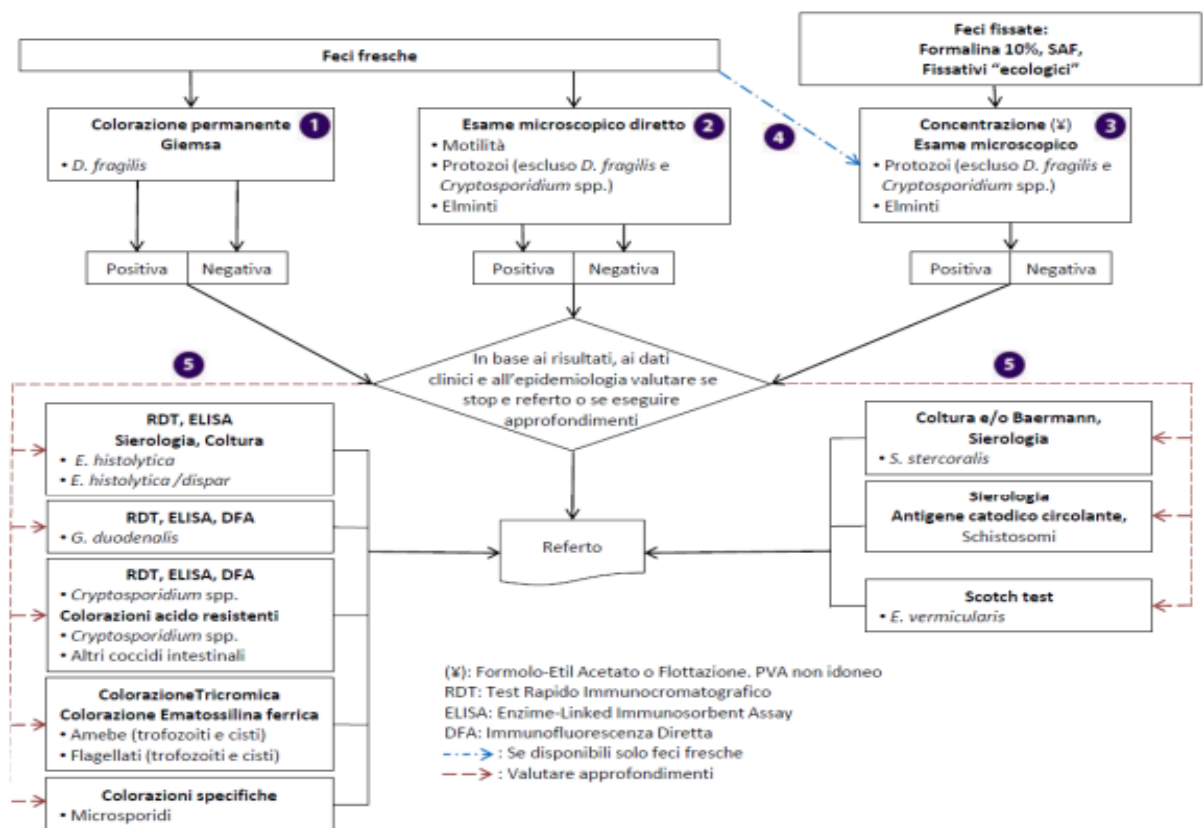


Fig. 14-algoritmo diagnostico tecniche tradizionali (fonte: AMCLI -Associazione Microbiologi Clinici Italiani-, Linee Guida Istituzionali, 2022 [22]).

3.1 Fase preanalitica

La raccolta del campione fecale rappresenta una fase cruciale, in quanto comportamenti o azioni scorrette potrebbero inficiare il buon esito dell'analisi. È per questo che deve essere svolta seguendo alcune accortezze, quali: evitare l'assunzione di farmaci antimicrobici,

lassativi o antidiarroici; le feci devono essere raccolte defecando su una superficie asciutta e non devono essere contaminate da acqua e urine; bisogna prelevare porzioni diverse delle feci evacuate e trasferirle in un contenitore sterile con tappo a vite, evitando di riempirlo completamente. Esistono delle schede con le istruzioni per la raccolta che possono essere fornite direttamente al paziente.

Il campione può essere processato tal quale oppure posto in una sostanza fissativa in base anche al sospetto clinico in essere: se è necessario valutare la presenza di protozoi è fondamentale che l'analisi avvenga su campione fresco e non fissato, in quanto sostanze fissative come la formalina potrebbero ledere la struttura del microrganismo; in presenza di protozoi, le feci presentano un aspetto liquido o semiliquido, ed è fondamentale eseguire il prima possibile l'analisi- Quando questo non è fattibile, si può trasferire il campione in un conservante per mantenere la morfologia dei parassiti, pur perdendo la possibilità di verificarne la mobilità.

I fissativi/conservanti devono essere aggiunti, miscelati col campione rispettando il rapporto di tre parti di fissativo per uno di campione e lasciati agire per almeno 30 minuti.

Esistono diversi tipi di fissativi in commercio, come formalina al 5 o al 10%, SAF (acido acetico sodico formalina) e MIF (Mercurio, iodio e formalina), ed altri di più recente sviluppo, denominati "One-vial/Single-vial", creati per risolvere problematiche di smaltimento o di presenza di sostanze nocive come il mercurio.

3.2 Tecniche diagnostiche dirette

Esame macroscopico

Una prima osservazione del campione di feci può essere utile per escludere la presenza di una classe di parassiti a favore di un'altra: in feci liquide è più probabile riscontrare protozoi, mentre in feci più consistenti è più difficile che vi siano. Un'eventuale presenza di muco e/o sangue è invece di solito sintomo di un'amebiasi.

Inoltre, a livello macroscopico è anche possibile trovare forme adulte di elminti o loro porzioni, in quanto hanno dimensioni maggiori.

Esame microscopico

L'esame microscopico diretto è consigliato in caso di feci fresche, soprattutto se liquide o molli, per poter rilevare la mobilità dei trofozoiti e delle larve di nematodi.

È una tecnica molto semplice, che prevede di stemperare una piccola quantità di campione con soluzione fisiologica, per poi effettuare lo striscio su un vetrino e al quale si possono anche aggiungere dei coloranti per evidenziare le strutture principali: la colorazione di Wright permette di distinguere i nuclei color porpora dal citoplasma blu-violetto; la colorazione con Lugol, colorante a base di iodio, evidenzia le componenti a base di carboidrati presenti nelle cisti ma anche trofozoiti, flagellati e amoebe.

Poiché lo striscio diretto fresco non è molto sensibile, necessita di un elevato livello di lettura e interpretazione da parte dell'operatore, oltre che rappresentare una porzione limitata di campione osservato. Generalmente, quindi, si procede anche con un esame diretto microscopico per arricchimento, con lo scopo di concentrare il campione fresco.

Nella pratica di laboratorio l'arricchimento è fatto generalmente per:

- Flottazione: si basa sul principio della diversa densità delle particelle dei parassiti rispetto alla soluzione ad elevato peso molecolare del solvente in cui viene posto il campione; l'obiettivo è che il parassita, avendo un minor peso molecolare, galleggi sulla superficie della soluzione.
Le soluzioni di flottazione più usate sono soluzioni sature di cloruro di sodio o con zinco solfato. In seguito alla centrifugazione si ottiene un materiale "più pulito" rispetto alla sedimentazione, ma si ha il rischio che le uova di elminti, avendo elevato peso molecolare, precipitino e si ritrovino nella porzione di detriti.
- Concentrazione con formalina-etil acetato (FECT): è una tecnica che si basa sulla sedimentazione. Il campione viene miscelato alla formalina che preserva la morfologia dei parassiti, e all'etil-acetato che permette di rimuovere i detriti. Successivamente il campione viene centrifugato e i parassiti si ritrovano sul fondo della provetta come sedimento, che può quindi essere prelevato e analizzato al microscopio (Fig. 15).

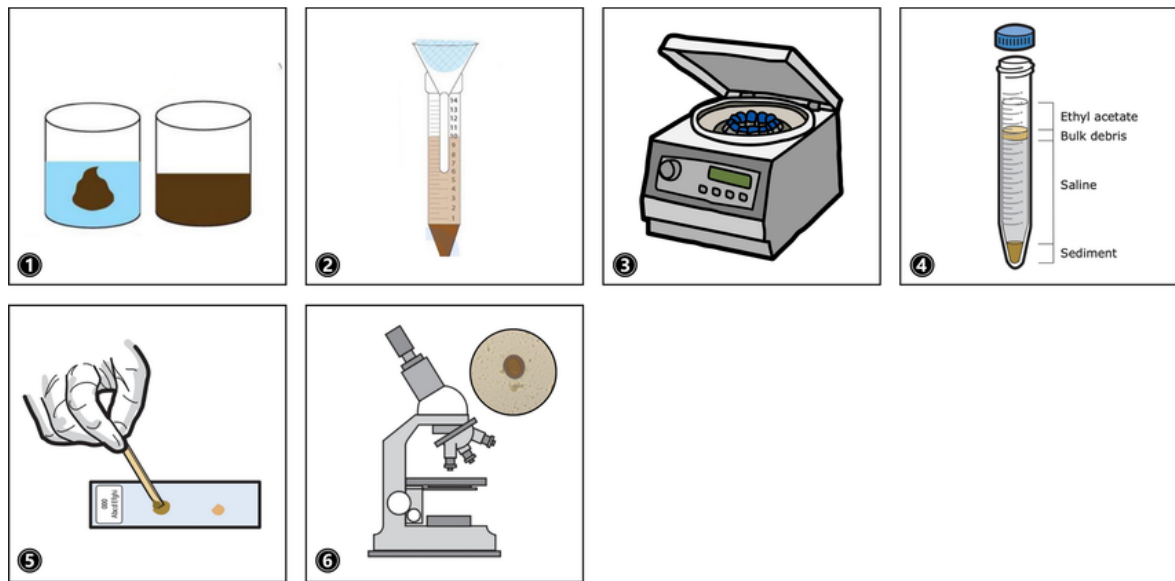


Fig. 15-protocollo metodica FECT (tratto da *Performance validation of deep-learning-based approach in stool examination, 2025* [23]).

Il vetrino viene osservato prima con ingrandimento 10x e successivamente al 40x, passando ogni campo visivo con andamento “serpentino”.

Le uova delle diverse specie parassitiche riscontrabili nel campione fecale possiedono caratteristiche specifiche, che possono essere sfruttate per la corretta identificazione, come il range di dimensione misurato, lo spessore delle pareti, il colore, la presenza di particolari strutture (ad esempio opercoli o mammellonature) e lo stadio di sviluppo (Fig. 16).

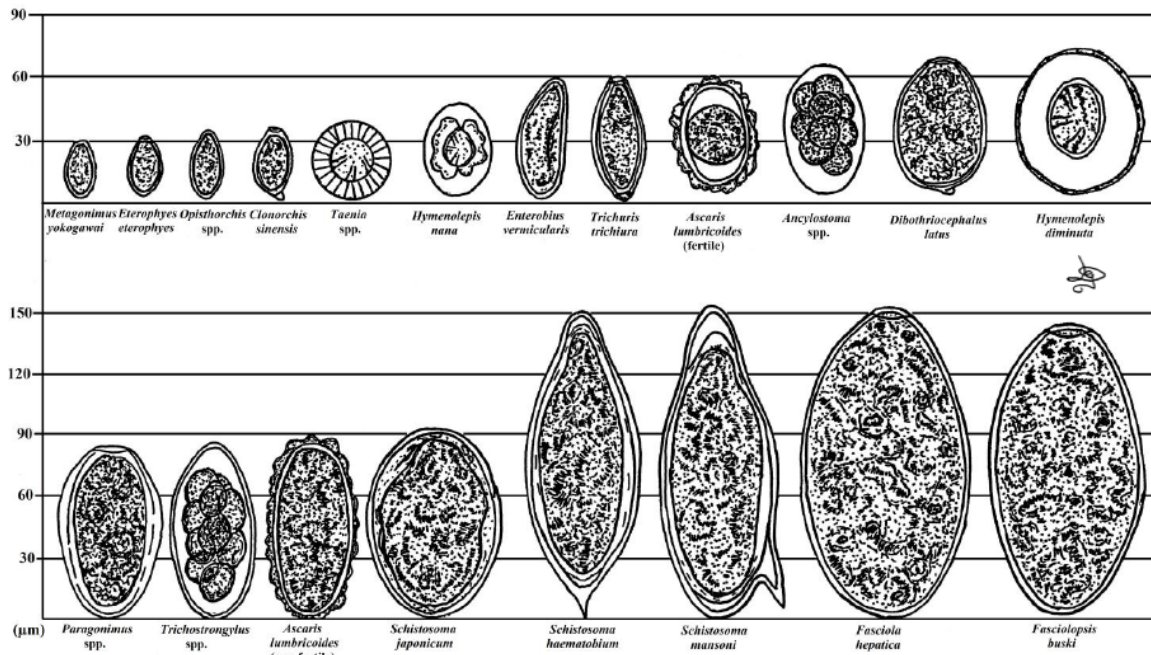


Fig. 16-dimensioni e caratteristiche morfologiche di uova di elminti (tratto da *Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica*, 2001 [24]).

Bisogna però sottolineare che alcune specie appartenenti allo stesso genere spesso sono indistinguibili tramite l'osservazione al microscopio, ad esempio *Entamoeba dispar*, *E. moshkovskii* ed *E. bangladeshi* sono morfologicamente non distinguibili da *E. histolytica*.

Scotch test

Viene utilizzato in caso di sospetta infestazione da "ossiuri" (*E. vermicularis*) poiché le femmine di questi elminti, di notte, migrano fino all'apertura anale per rilasciare le uova, le quali andranno ad aderire alla mucosa e alla cute perianale.

Questa tecnica permette la rilevazione anche di uova di *Taenia* spp.

Generalmente viene richiesta la ricerca nei bambini (soggetti maggiormente affetti) ed è consigliato raccogliere i campioni di tre mattine consecutive.

Il campionamento (Fig. 17) viene eseguito il mattino presto, prima che il paziente defechi o si lavi, andando a toccare le pliche perianali con del nastro adesivo fissato ad un supporto; dopodiché questo viene adagiato sul vetrino e fatto recapitare al laboratorio che procederà con l'analisi al microscopio.



Fig. 17-dimostrazione per la raccolta del campione per l'esame scotch test (fonte: *WHO -Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites, Second Edition-*, 2019 [25]).

Metodi colturali

Per alcune forme e alcune specie è possibile anche eseguire un esame colturale con specifici terreni ma, essendo poco sensibile come metodo, bisogna sempre eseguire la ricerca anche utilizzando un altro tipo di esame.

Per quanto riguarda la ricerca di larve di *S. stercoralis* è possibile utilizzare un agar nutriente non selettivo, su cui si vanno a inoculare 6-7 grammi di feci fresche non refrigerate. Il terreno viene posto in incubatore a 25-30° per 2-5 giorni: la presenza del verme è dimostrata dall'osservazione macroscopica di "tunnel" nell'agar provocati dal passaggio del parassita stesso (Fig. 18). È opportuno allestire almeno tre piastre con lo stesso campione per aumentare la sensibilità del test.

È fondamentale operare con tutte le precauzioni di sicurezza, poiché in un eventuale campione positivo possono essere presenti anche larve filariformi L3 trasmissibili al contatto con la cute dell'operatore.



Fig. 18-*Strongyloides stercoralis* Agar (fonte: McGill University - J.D. MacLean Centre for Tropical & Geographic Medicine-, 2015 [26]).

Tecniche immunologiche dirette

Sono disponibili in commercio diversi kit per la ricerca di antigeni tipici espressi dai diversi parassiti. La rilevazione può essere effettuata grazie alla presenza di anticorpi coniugati con un enzima che funge da substrato per una reazione cromogena (test ELISA), con isotopi radioattivi (RIA) -ormai in disuso a causa dei rischi di salute e ambientali- o con fluorocromi (FIA).

Le specie principali che si possono testare sono generalmente protozoi, quali *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. ed *E. histolytica*; è disponibile anche un kit per la ricerca di *Schistosoma* spp. da campioni di urine.

Biologia molecolare

L'avvento della biologia molecolare ha permesso di poter avere una sensibilità e una specificità maggiore, processando allo stesso tempo un numero più elevato di campioni.

Si basa sulla PCR (Polymerase Chain Reaction, ovvero Reazione a Catena della Polimerasi), la quale permette l'amplificazione di uno specifico frammento di DNA del parassita utilizzando come innesco delle corte sequenze nucleotidiche (primers) coniugate con fluorocromi o enzimi che ne permettono la rilevazione e la lettura.

Nonostante questi vantaggi evidenti, è solo dal 2010 che sono disponibili pannelli per la diagnosi di parassiti intestinali, e per ora non si hanno dei dati così validati per la ricerca degli elminti ad eccezione dei geelminti. La principale problematica risiede nella fase di estrazione degli acidi nucleici dal materiale fecale, poiché sono presenti numerosi interferenti o sostanze inibitorie per la reazione di amplificazione.

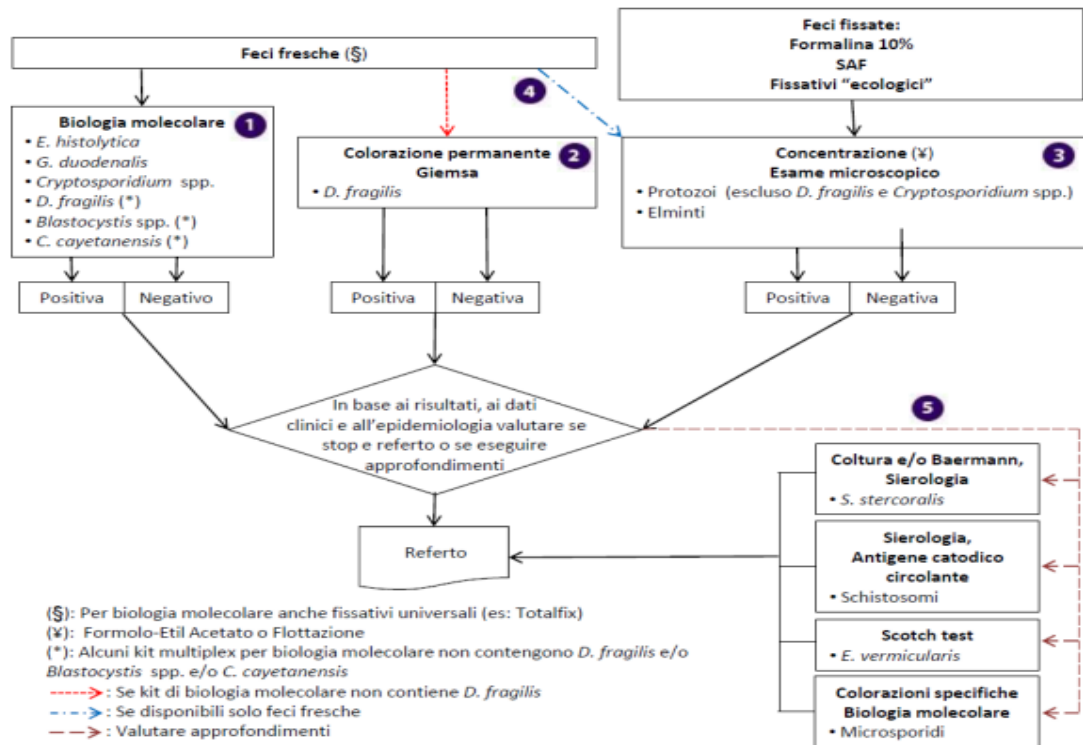


Fig. 19-algoritmo diagnostico Biologia molecolare (fonte: AMCLI -Associazione Microbiologi Clinici Italiani-, Linee Guida Istituzionali, 2022 [22])

3.3 Tecniche diagnostiche indirette

In questo caso si va a ricercare all'interno del campione di siero del paziente la presenza di anticorpi diretti contro specifici componenti del parassita (antigeni). Sono tecniche che mostrano una sensibilità e specificità variabile di kit in kit, ma comunque minore rispetto a quelle dirette.

Possono essere utilizzate per la ricerca degli anticorpi di *S. stercoralis*, *Schistosoma mansoni* ed *E. histolytica* quando si trova localizzata a livello extraintestinale o intestinale invasiva.

4. Utilizzo dell'intelligenza artificiale in ambito medico-sanitario

Grazie allo sviluppo e al libero accesso di sempre più piattaforme di intelligenza artificiale (IA) create negli ultimi anni, anche il mondo della medicina ha iniziato a pensare a come l'IA potesse diventare un ulteriore strumento per migliorare le capacità diagnostiche.

L'intelligenza artificiale si basa sul *deep learning*, ovvero un sistema di apprendimento che imita quello delle reti neurali degli esseri umani: imparando nuove nozioni è in grado di ampliare le sue conoscenze e creare relazione tra di esse.

L'addestramento dell'IA spesso si basa su un sistema di apprendimento automatico supervisionato, che prevede l'utilizzo di un complesso algoritmo sviluppato a partire da un set di immagini attentamente annotate e utilizzate come standard di riferimento per l'apprendimento dell'IA stessa [27].

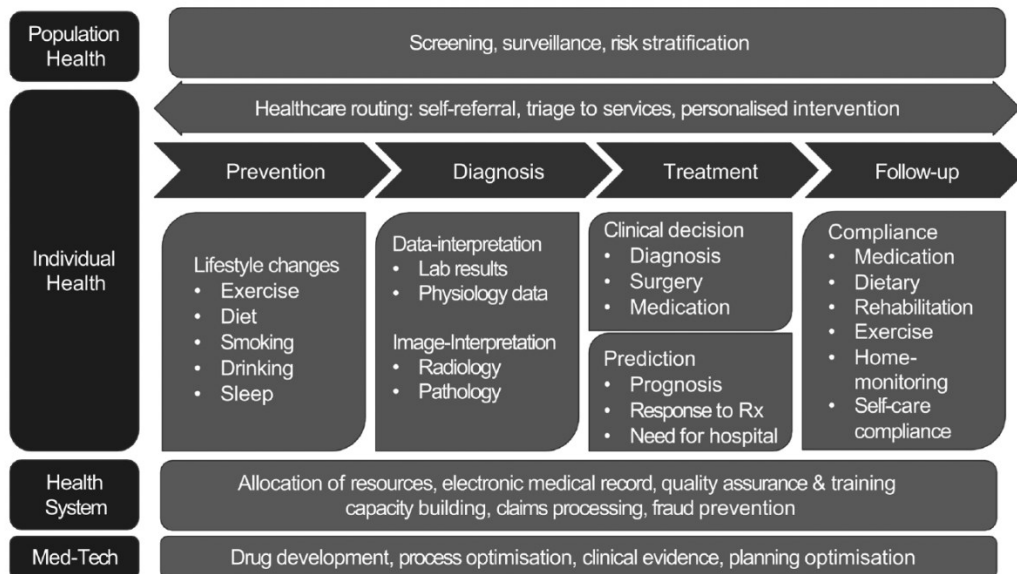


Fig. 20-campi di applicazione dell'intelligenza artificiale in medicina (tratto da *Artificial intelligence in medicine: Ethical, social and legal perspectives, 2023* [28]).

Nell'aprile del 2018, l'FDA (Food and Drug Administration) ha approvato il primo sistema di intelligenza artificiale autonomo per la diagnosi della retinopatia diabetica grazie ai dati ottenuti da un trial condotto dal Dott. Abramoff e colleghi: lo strumento ha dimostrato una sensibilità dell'87,12% e una specificità del 90,7% [29].

Da allora il numero di studi interessati all'applicazione dell'IA in ambito sanitario è notevolmente aumentato: da 11 269 articoli su Pubmed nel 2018, si è passati a 78 696 articoli nel 2025, viste anche le buone premesse e il possibile margine di miglioramento nella diagnosi preventiva di molte malattie, soprattutto di quelle più difficili e insidiose da individuare.

Un esempio è il FxMammo™ (FathomX Pte Ltd., Singapore), un macchinario che sfrutta l'intelligenza artificiale per la diagnosi del carcinoma mammario bilaterale metacrono. Uno studio condotto in Giappone ha messo a confronto la capacità dei radiologi di individuare masse cancerogene rispetto alla capacità dell'intelligenza artificiale: quest'ultima è stata in grado di identificare il 60% di casi positivi contro il 50% di quelli individuati dagli specialisti. Inoltre, ha riscontrato la presenza di tumori maligni con un anno di anticipo rispetto alla diagnostica tradizionale [30].

Non sempre però l'intelligenza artificiale si è dimostrata in linea con le aspettative: nel 2025 si è provato a utilizzare ChatGPT 4.0, un large language model (sistema di intelligenza artificiale addestrato su un ampio numero di dati di testo), per verificare la sua capacità di diagnosticare correttamente l'epilessia: i dati ottenuti sono insoddisfacenti e al momento la diagnosi da parte di epilettologi rimane la più affidabile [31].

Questo non esclude che, continuando ad ampliare le informazioni possedute dall'IA e ponendole un gran numero di quesiti diagnostici, in futuro questa non raggiungerà livelli accettabili, se non addirittura migliori di quelli umani.

La continua esigenza di spingersi sempre un po' oltre le proprie conoscenze e capacità ha permesso nei millenni di arrivare allo sviluppo tecnico-scientifico odierno. Se da un lato il progredire delle nostre competenze ha permesso di migliorare la qualità della vita, dall'altro lato bisogna prestare ben attenzione a cosa questo implica da un punto di vista morale.

La creazione dell'intelligenza artificiale è forse una delle invenzioni umane più dibattute in ambito etico-filosofico. In quanto impatta molto sulle attività umane, dalle più semplici alle più complesse. Molti studiosi si stanno ponendo domande sugli aspetti positivi e negativi che questa innovazione comporta: nella valutazione dei rischi e benefici, la rapidità di analisi associata alla possibilità di interpolare un vasto numero di conoscenze, giustificherebbe le problematiche legate alla responsabilità decisionale e al rischio di una diminuzione delle nozioni umane in ambito medico-sanitario?

5. Utilizzo dell'intelligenza artificiale in ambito microbiologico

L'applicazione dell'IA si sta rilevando molto utile anche nei reparti di microbiologia clinica, in quanto comporta una serie di vantaggi importanti, come il supporto nella lettura di un vasto numero di campioni, la tracciabilità, la possibilità di standardizzare e velocizzare il metodo di osservazione riducendo quindi le variabilità e il carico di lavoro umano.

Ovviamente si tratta ancora di una tecnologia in via di sviluppo e, prima di poterla introdurre di una struttura sanitaria, bisogna essere sicuri che i risultati siano affidabili. Al momento la problematica più rilevante da considerare è la percentuale di falsi negativi che gli strumenti con IA incorporata stanno riportando, ma che, in un futuro anche prossimo, ci si attende di poter mitigare grazie ad un costante training dell'intelligenza artificiale stessa.

L'intelligenza artificiale in quest'ambito può essere utilizzata per rilevare eventi rari o per effettuare una classificazione basata su punteggi o categorie.

Nel caso del rilevamento di eventi rari, questa capacità dell'IA può essere sfruttata a scopo di screening o direttamente per l'identificazione dei microbi.

Un esempio è il rilevamento di *Mycobacterium* nei campioni primari che è stato eseguito nel laboratorio del Dott. Pantanowitz: il loro sistema di intelligenza artificiale acquisisce diverse immagini, non sovrapponibili, di tutto il vetrino con il tessuto da testare e per ciascuna immagine l'IA restituisce un valore qualitativo. Questo meccanismo è stato svolto due volte, una prima volta utilizzando un approccio più sensibile, il quale ha dimostrato il 95% di efficienza, e la seconda volta con un approccio più specifico, con un risultato del 92% di efficienza. Combinando i due sistemi si arriva ad un'efficienza del 96%, dimostrandosi inoltre più rapida e più semplice da utilizzare rispetto alla microscopia manuale [32].

L'altra applicazione dell'intelligenza artificiale in microbiologia clinica è quella della classificazione basata sui punteggi o categorie. Un esempio è il lavoro di Wang et al. per la classificazione della vaginosi batterica.

Il modello CNN (rete neuronale convoluzionale) NugentNet del Dott. Wang è stato addestrato con oltre 25 000 immagini, e utilizza lo stesso sistema di attribuzione di punteggio normalmente utilizzato in clinica. La sensibilità dello strumento si è rilevata essere lievemente inferiore a quella di un operatore umano medio (89% contro 94,9%) ma è più specifico (85% contro 74,6%) [33].

6. Utilizzo dell'intelligenza artificiale in parassitologia

6.1 Identificazione parassiti ematici

Nonostante gli incredibili miglioramenti nel contrastare le malattie causate da batteri e virus, come l'eradicazione del vaiolo nel 1980, le malattie indotte da parassiti ematici sono ancora largamente diffuse e causano milioni di vittime ogni anno, soprattutto nei paesi tropicali in via di sviluppo.

La parassitosi più preoccupante rimane la malaria: secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), al 2024 sono circa 282 milioni i casi, un aumento del 3%. e circa 12 000 morti in più rispetto all'anno precedente [34].

La malattia ha come agente eziologico un protozoo appartenente al genere *Plasmodium*. Per compiere il suo ciclo vitale il parassita necessita di due ospiti: un insetto vettore del genere *Anopheles* (ospite definitivo) e un vertebrato (ospite intermedio); il passaggio nell'ospite intermedio avviene durante il pasto di sangue dell'insetto [35].

Il "Gold standard" per la diagnosi è da sempre l'analisi al microscopio dello striscio di sangue sottile. ma richiede molta esperienza da parte dell'operatore: l'identificazione della specie risulta complicata, poiché specie diverse presentano morfologie diverse, anche in base allo stadio vitale in cui si trovano all'interno dell'eritrocita.

Per questo un team in Cina, sotto la guida del Dott. Liu, ha sviluppato un algoritmo di deep learning (AIDMAN) (Fig. 21) in grado di rilevare la presenza di plasmodii in strisci di sangue sottili con un'accuratezza del 95% [36].

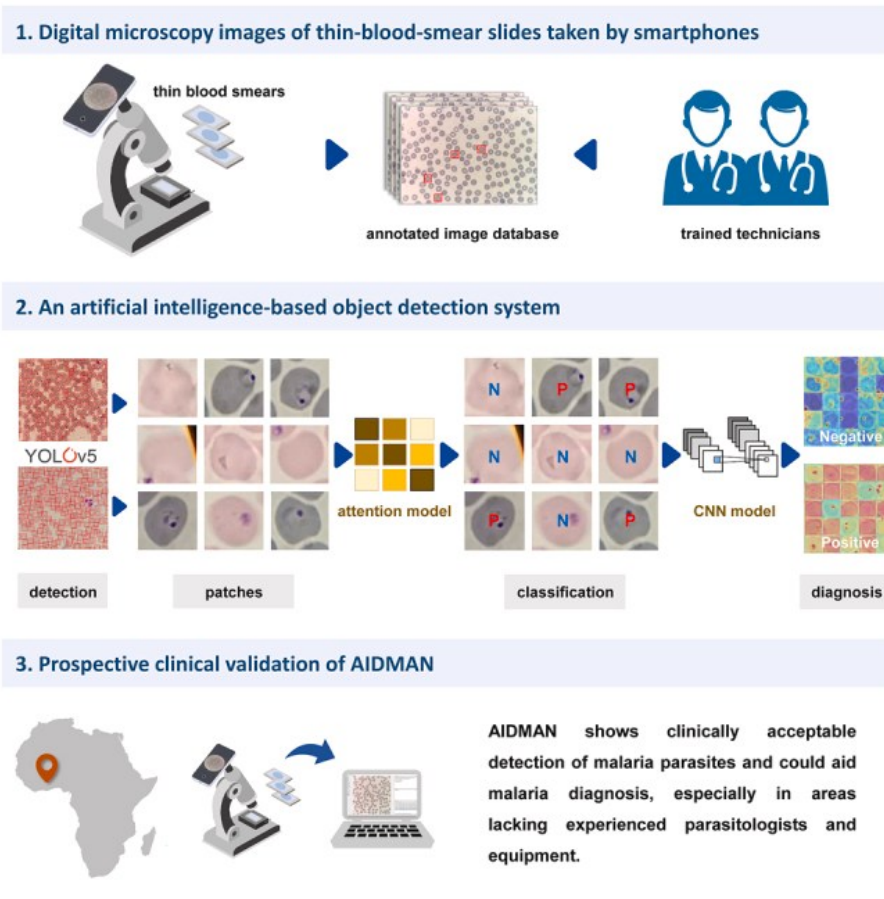


Fig. 21-schema riassuntivo sviluppo di AIDMAN (tratto da *AIDMAN: An AI-based object detection system for malaria diagnosis from smartphone thin-blood-smear images*, 2023 [36]).

Tuttavia, il sistema presenta delle limitazioni come un set di immagini con poche cellule sovrapposte, poche morfologie di parassiti e poche interferenze che normalmente si osservano al microscopio, sottolineando ancora una volta l'importanza di raccogliere il maggior numero di immagini e dati per addestrare sempre meglio la rete neurale a riconoscere tutte le possibili casistiche.

6.2 Identificazione di parassiti fecali

Per secoli, e in parte ancora oggi, l'analisi manuale al microscopio ha rappresentato il Gold standard per la diagnosi di parassiti intestinali, nonostante le limitazioni. Grazie alla biologia molecolare è stato fatto un passo in avanti, migliorando significativamente la sensibilità e la specificità, ma purtroppo essa spesso rappresenta metodo economicamente non accessibile.

Negli ultimi due decenni, l'automatizzazione per l'analisi di parassitosi ematologiche si è sempre più diffusa, mentre quella per i parassiti fecali ha trovato più difficoltà a causa della natura stessa della matrice biologica: il campione di feci è molto variabile, labile e con molte particelle interferenti che complicano l'identificazione dei parassiti.

Contestualmente, la capacità degli operatori impiegati nei laboratori di microbiologia clinica di riconoscere correttamente la presenza di parassiti all'interno dei campioni è diminuita. Una possibile causa può essere ricercata nell'elevato numero di campioni negativi e un bassissimo tasso di positivi, inficiando sull'acquisizione e sul mantenimento delle competenze degli operatori stessi nell'identificazione dei parassiti; al contempo ciò genera stress ergonomico ed emotivo, che sfociano in insoddisfazione professionale [37].

La necessità di creare uno strumento che fosse di sostegno all'attività svolta in laboratorio e che permettesse di migliorare la qualità lavorativa ed eventualmente anche quella diagnostica, era evidenziata da diversi decenni.

Tutto questo fino al 2014 quando, un gruppo di ricercatori italiani capeggiati dal Dott. Intra, ha testato il sediMAX (®), uno strumento automatizzato nato per l'analisi delle urine, per valutare la sua capacità di identificazione i parassiti in campioni fecali.

Lo strumento è composto da un microscopio ad alta risoluzione, che acquisisce da 15 a 60 immagini per campione, e da un software per il processamento, che è in grado di distinguere le diverse componenti presenti nella matrice biologica (es. cellule epiteliali, lieviti, cellule ematiche, batteri ecc.), riducendo sia il tempo di esecuzione che il tasso di errore umano.

Applicato a campioni di feci si è dimostrato estremamente efficiente ed efficace, con un tasso di specificità e di sensibilità del 100% quando effettua l'analisi su 60 immagini [2].

Per quanto il sediMAX (®) si sia dimostrato un ottimo strumento per l'identificazione, rappresentata "soltanto" uno strumento automatizzato, e non è integrato con un'intelligenza artificiale in deep learning.

Un team americano diretto dal Dott. Mathison è riuscito a sviluppare un modello basato su CNN e deep learning per rilevare protozoi in campioni di feci colorati con tecniche tricromatiche. In genere gli algoritmi non sono in grado di rilevare parassiti all'interno campioni fecali colorati poiché faticano a distinguerli dagli interferenti presenti nella matrice biologica. Il cervello umano, invece, è capace di effettuare, osservando il campione al

microscopio, una distinzione morfologica dei corpuscoli presenti nel campione in maniera rapida e simultanea.

Lo studio ha previsto prima la raccolta e la scansione digitale dei campioni colorati contenenti diverse specie di parassiti in diversi stadi morfologici, poi i dati sono stati utilizzati per formare il modello CNN e infine vi è stata la fase di validazione clinica.

Nello specifico le immagini di 127 campioni risultati positivi in precedenza al microscopio, insieme a immagini di possibili interferenti come lieviti e globuli bianchi, sono state utilizzate per addestrare l'intelligenza artificiale; successivamente questa è stata testata per verificare il suo grado di apprendimento, dimostrando un tasso di concordanza positiva del 98,8% (IC al 95%: 93,8% - 99,9%), mentre la concordanza negativa è stata del 98,1% (IC al 95%: 93,4% - 99,8%).

L'esito fornito dell'IA viene controllato sempre da un operatore, il quale stabilisce se quanto indicato dal modello è corretto, dubbio o errato.

Anche in questo caso, come in altri studi inerenti all'applicazione dell'intelligenza artificiale, sono state riscontrate delle limitazioni come, ad esempio, la difficoltà nel reperire campioni positivi di alcune classi di parassiti, che non consente di implementare le conoscenze del modello CNN e le sue capacità di identificazione in situazioni rare ma pur sempre possibili [37].

Un altro strumento progettato per questo ambito è il KU-F40, un sistema completamente automatizzato con intelligenza artificiale integrata e nato espressamente per l'analisi di parassiti fecali. I primi studi condotti hanno evidenziato che lo strumento possiede una sensibilità circa tre volte superiore rispetto a quella che normalmente si ha con la microscopia manuale; inoltre, il KU-F40 è stato capace di identificare nove tipi di parassiti (*Clonorchis sinensis* -uova-, *A. duodenale/Necator*, *Blastocystis hominis*, *Taenia* spp. -uova-, *S. stercoraris*, *E. vermicularis* -uova-, *T. trichiura* -uova-, *G. duodenalis* e amoebe) contro i cinque individuati manualmente all'interno dei campioni raccolti nell'ospedale in cui è stata condotta la ricerca (the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Cina).

Essendo comunque uno strumento con intelligenza artificiale in fase di sviluppo, vi sono alcune limitazioni: ad esempio in campioni fecali diarroici, e quindi molti liquidi, non è possibile bypassare lo step di diluizione che KU-F40 esegue per l'analisi, comportando una diminuzione dell'accuratezza. Un altro aspetto che bisogna migliorare è la capacità di

distinzione degli interferenti presenti nel campione, poiché spesso residui di cibo, pollini, granuli di amido e particelle con morfologie simili a quelle dei parassiti vengono erroneamente identificati, fornendo quindi dei falsi positivi.

Per risolvere queste problematiche si rende quindi necessario ampliare il database con immagini e falsi positivi comuni per implementare le conoscenze dell'intelligenza artificiale [38].

II. Scopo del lavoro

Il lavoro descritto in questa tesi è stato svolto presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII (Bergamo).

L'Ospedale riceve giornalmente in media dieci campioni fecali con la richiesta di ricerca parassiti, per i quali sono necessarie diverse ore di lavoro per poter processare e analizzare correttamente tutti i campioni, e, nonostante le accortezze e l'expertise degli operatori, si ha comunque un tasso di errore significativo.

Le motivazioni che portano alla prescrizione di questa prestazione da parte dei medici curanti sono basate sulla sintomatologia che il paziente manifesta: diarrea, dolori addominali, eruzioni cutanee, prurito anale e gonfiore, ma anche perdita di peso inspiegabile, nausea e/o vomito. Si tratta quindi di sintomi molto comuni, presenti anche in altre condizioni patologiche e non esclusivamente in presenza di parassiti intestinali. Uno studio condotto in Svizzera ha evidenziato come su 1855 richieste per pazienti in età pediatrica, solo 24 campioni sono risultati positivi (4,2%) e tutti esclusivamente per *Blastocystis* spp. [39], un parassita la cui infezione spesso risulta essere asintomatica e/o non clinicamente rilevante.

Per quanto riguarda l'ASST Papa Giovanni XXIII, di circa 3000 campioni annui con richiesta di ricerca parassitologica, solo 90 risultano essere positivi, ovvero il 3% del totale, e di questi nella maggior parte dei casi si tratta di infestazioni da *B. hominis* ed *E. vermicularis* (ossiuri).

La prescrizione dell'esame è ulteriormente supportata se i sintomi si presentano in seguito a viaggi in paesi tropicali o endemici per alcune specie parassitiche. Nei paesi sviluppati, nella maggior parte dei casi in cui viene richiesta la ricerca di parassiti nelle feci, l'esito risulta essere negativo: le condizioni socio-economiche, mediche e climatiche permettono di avere una bassa prevalenza di parassitosi nella popolazione; al contrario, in molte aree svantaggiate di Africa, Asia e Centro-Sud America, i tassi di incidenza sono molto più elevati, arrivando ad aggirarsi tra il 30 e il 50% [40].

Tuttavia, per quanto il tasso di infezione nel Mondo occidentale odierno sia basso, non significa che la presenza di parassiti intestinali sia completamente assente. L'epidemiologia analizzata dallo studio condotto dal Dott. Crotti e colleghi ha evidenziato che gli elminti predominanti nei paesi sviluppati risultano essere *E. vermicularis* e *S. stercoralis*; mentre i

protozoi più diffusi sono *G. duodenalis* e *Dientamoeba fragilis*. In particolare, in Italia si riscontra una percentuale maggiore di *G. duodenale*, *Blastocystis* spp. e *D. fragilis*, ed elminti quali *E. vermicularis*, *S. stercoralis* e *T. saginata* [41].

Questo studio ha quindi l'obiettivo di valutare l'affidabilità del sistema automatizzato integrato con intelligenza artificiale FA-280 (Orienter) e la sua possibile applicazione nella routine dell'Ospedale per poter alleggerire e velocizzare il processo, mantenendo però sempre un'elevata accuratezza diagnostica. In particolare, è di interesse per lo studio e per l'eventuale applicazione nella flowchart dell'ASST Papa Giovanni XXIII valutare l'attendibilità sui campioni veri negativi (VN) poiché rappresentano statisticamente la maggior parte dei campioni che devono essere processati giornalmente, pur mantenendo elevata l'affidabilità dello strumento per i campioni veri positivi (VP).

Un precedente studio condotto nel Laboratorio di Parassitologia dell'Università di Mahidol in Thailandia ha testato l'efficienza di questo stesso strumento andando a compararla a quella della tecnica FECT.

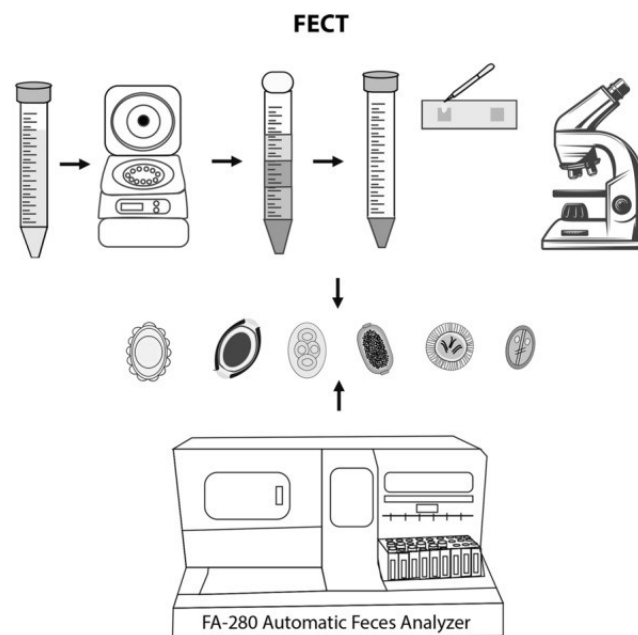


Fig. 22-schema esecuzione FECT vs FA-280 (tratto da *High-throughput detection of parasites and ova in stool using the fully automatic digital feces analyzer, orienter model fa280, 2024* [42]).

Il loro studio ha previsto la valutazione di due set di campioni: il primo, realizzato su 200 campioni freschi, ha riportato una differenza significativa tra gli esiti forniti dallo strumento senza la supervisione umana (“AI report”) e quanto osservato con la tecnica FECT, mentre la concordanza, nel momento in cui gli operatori sono intervenuti (“user audit”), è sovrapponibile (Tab. 1). Il tasso di falsi positivi è stato del 32,5%.

Method	Negative	Positive
microscopic detection (FECT)	178	22
FA-280 feces analyzer (AI report)	129	71
FA-280 feces analyzer (user audit)	178	22

Tab. 1-tabella risultati ottenuti dallo studio del Dott. Boonyong su 200 campioni freschi (tratto da *High-throughput detection of parasites and ova in stool using the fully automatic digital feces analyzer, orienter model fa280, 2024* [42]).

Per il secondo set sono stati analizzati 800 campioni posti in formalina al 10% e sono stati confrontati i risultati tra FECT e FA-280 direttamente con il supporto dell’operatore (Tab. 2).

Methods	Number of stool sample	
	Positive	Negative
Formalin ethyl acetate concentration (FECT)	468	332
FA280 feces analyzer (user audit)	440	360

Tab. 2- tabella risultati ottenuti dallo studio del Dott. Boonyong su 800 campioni posti in formalina 10% (tratto da *High-throughput detection of parasites and ova in stool using the fully automatic digital feces analyzer, orienter model fa280, 2024* [42]).

Complessivamente emerge che FA-280 ha una sensibilità minore e un costo per campione maggiore, con il vantaggio però di avere un'elevata automatizzazione, capacità di ridurre il tempo di rilevamento e migliorare l'ambiente lavorativo [42], tuttavia la presenza dell'operatore rimane d'obbligo.

Poiché si tratta di uno strumento che promette di modificare un processo diagnostico complesso, lento e operatore-dipendente, è stato di nostro interesse andare a verificare se le prestazioni di FA-280 fossero reali, applicabili al contesto dell'ASST Papa Giovanni XXIII e se i risultati fossero migliorati o rimasti invariati rispetto allo studio precedente.

III. Materiali e metodi

1. Percorso diagnostico ASST Papa Giovanni XXIII

La procedura operativa all'interno della struttura dell'ASST Papa Giovanni XXIII per la ricerca di parassiti in campioni fecali prevede l'analisi microscopica, alla quale è possibile aggiungere anche l'esame colturale per *S. stercoralis* e l'indagine antigenica per *Giardia* spp., *Entamoeba* spp. e *Cryptosporidium* spp.

Per poter eseguire tutte le analisi necessarie e avere un risultato più affidabile, si richiedono al paziente almeno tre campioni raccolti da meno di 24 ore e in giorni successivi.

1.1 Ricerca microscopica

Per poter svolgere l'esame è necessaria una quantità simile ad una noce o a tre cucchiaini da cucina se si tratta di feci liquide. Il campione deve essere posto in un contenitore pulito e conservato a temperatura ambiente. Per eseguire lo scotch test, una volta passato lo scotch sulle pieghe anali, questo deve essere montato sul vetrino da microscopio.

Il Microbiologo procede all'osservazione macroscopica prima di preparare i vetrini al fine di evidenziare la presenza di vermi o parti di essi, ad esempio il ritrovamento di filamenti bianchi simili a fili di cotone è indice di *E. vermicularis*. Successivamente, le feci vengono poste in un dispositivo di filtrazione (Mini Parasep, Apacor) con 2 ml di etile-acetato, vortexate e poste in centrifuga a 2000g per 5 minuti. Una volta terminata la preparazione del campione si può allestire il vetrino: il Mini Parasep viene aperto e si scarta il surnatante presente, si pongono due gocce separate di sedimento e in una di queste si stempera anche una goccia di colorante Lugol, si copre col vetrino coprioggetto da 22 x 22 o 24 x 24 mm e si passa alla lettura al microscopio. Il vetrino deve essere osservato immediatamente, prima guardando entrambe le gocce a ingrandimento 10x e poi al 40x.

Il vetrino per lo scotch test viene osservato direttamente tal quale al microscopio agli stessi ingrandimenti.

In base al quesito clinico, all'anamnesi fornita e a ciò che è stato osservato, il Microbiologo fornisce un commento diagnostico (Tab. 3).

NOTA	INDICAZIONE
PARN1	Da riservare ai campioni di feci nei quali sono state evidenziate cisti di possibile <i>Entamoeba histolytica</i>
PARN2	Da riservare ai campioni di feci nei quali si sospetta la presenza di <i>Dientamoeba fragilis</i> (es. la presenza di cisti di <i>Blastocystis hominis</i> , diarrea protratta sine causa)
PARN3	Da riservare ai campioni di feci negative per parassiti sicuramente patogeni in pazienti che riferiscono a prurito anale con eventuale eosinofilia
PARN4	Da riservare ai campioni di feci negative per parassiti sicuramente patogeni in pazienti che riferiscono eosinofilia, e si ritenga necessaria la coltura per <i>S. stercoralis</i>
PARN5	Da riservare in caso di forte dubbio per confermare <i>Entamoeba histolytica</i> o in caso di positività microscopica o dell'antigene e/o sierologica per <i>Entamoeba histolytica</i>
PARSS1	Da riservare ai campioni di feci negative per parassiti sicuramente patogeni in pazienti che riferiscono eosinofilia, e nascita o soggiorno in paesi in via di sviluppo
PARSS2	Da riservare ai campioni di feci negative per parassiti sicuramente patogeni in pazienti che riferiscono eosinofilia

Tab. 3-note per il commento diagnostico di parassitosi intestinali utilizzate nel laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII.

1.2 Esame colturale *Strongyloides stercoralis*

Questo esame è consigliato a pazienti con diarrea, infezione disseminata oppure con eosinofilia (>500 cellule/ml o >5% dei leucociti) e deve essere effettuato su campione di feci fresche raccolte da meno di due ore.

Una volta pervenuto il campione viene prelevata una piccola aliquota e disposta su due piastre di *S. stercoralis* Agar (10g di peptone, 5g di estratto di carne, 5g di sodio cloruro, 5g di agar e 1000ml di acqua purificata), queste vengono poi sigillate con scotch e incubate “a faccia in su” per 7 giorni a 30 °C.

Trascorso il periodo di incubazione, si osserva allo stereomicroscopio la coltura e in presenza del parassita è possibile apprezzare le “strie” nell'agar causate dal passaggio del verme. In questo caso bisogna poi proseguire con la rilevazione e l'identificazione delle larve andando a forare il coperchio della piastra di Petri, immettendo formalina al 10% in modo da ricoprire tutto l'agar, si aspira la soluzione, centrifugandola ed infine osservando il sedimento al microscopio con ingrandimento al 10x e al 40x.

1.3 Indagine antigenica

La ricerca di antigeni fecali di *Giardia*, *Entamoeba* e *Cryptosporidium* viene eseguita a supporto dell'esame microscopico. Viene eseguita partendo da un campione di feci fresche raccolte da meno di 72 ore e conservate a 2-8 °C.

Per poter effettuare l'analisi, si utilizza il kit Triage Parasite (Biosite) formato da:

- dispositivo d'analisi (n. 20);
- diluente del campione (2 flaconi da 47 ml);
- coniugato dell'enzima (3 ml);
- soluzione di lavaggio (12 ml);
- substrato (4 ml);
- controllo positivo (2 ml);
- controllo negativo (2 ml);
- materiali monouso (pipette, filtri, provette, cucchiari, puntali, tappi).

Tutti i reagenti sono conservati a 15-25 °C, mentre il controllo positivo deve essere posto a 2-8 °C.

Vengono sempre realizzati un controllo positivo e uno negativo, preparati come i campioni da testare.

Si procede agitando e aggiungendo il diluente nell'apposita provetta fino alla linea di riempimento, dopodiché si aggiunge 0.5 ml di campione con una pipetta graduata (feci liquide) oppure un cucchiaino di feci solide/semi-solide. Si chiude col tappo azzurro la provetta e la si vortexa per 10 secondi, la si riapre e si inserisce il dispositivo filtrante. Si richiude la provetta con un tappo non colorato e la si centrifuga a 1500-1800g per 5 minuti.

Terminata la centrifugazione bisogna proseguire la procedura entro 10 minuti: si aggiunge con una pipetta graduata 0.5 ml di filtrato al centro dell'area di rilevazione del dispositivo di analisi, si pongono 140 µl di coniugato e si lascia incubare per 3 minuti; si lava per due volte aggiungendo ogni volta 6 gocce di soluzione di lavaggio al centro dell'area. Infine, si aggiungono 4 gocce di substrato, si incuba per 5 minuti e si procede alla lettura.

Il test risulta valido se non compare nessuna banda colorata nell'area NEG CTRL e se compare una banda colorata nelle tre aree POS CTRL; il campione è considerato positivo se compare una banda colorata accanto al nome del parassita nell'area di rilevazione, anche per più parassiti contemporaneamente (Fig. 23).

Sono possibili campioni falsi negativi per *Entamoeba* se presente la sola forma cistica.

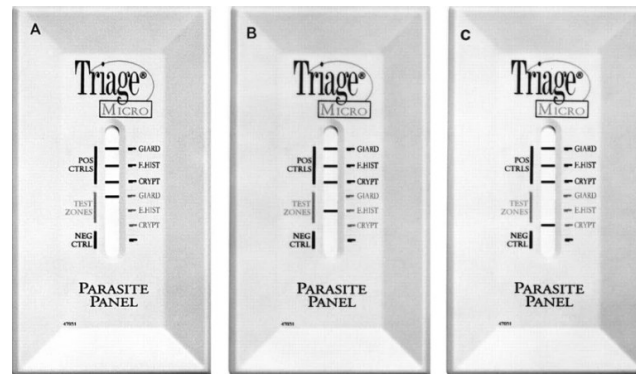


Fig. 23-pannello di Triage Parasite (BIOSITE) (A) Controlli positivi e negativi e zona di test positiva per *G. duodenalis* (GIARD); (B) controlli positivi e negativi e zona di test positiva per *E. histolytica*/*E. dispar* (E. HIST); (C) controlli positivi e negativi a destra e zona di test positiva per *C. parvum* (CRYPT), *Detection of Giardia lamblia, Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar, and Cryptosporidium parvum Antigens in Human Fecal Specimens Using the Triage Parasite Panel Enzyme Immunoassay, 2000* [43]).

2. Materiali

Lo studio è stato effettuato su 343 campioni di feci totali, di cui 34 erano feci fresche congelate a -80°C , 173 feci poste in formalina al 10% (MINI PARASEP®, Apacor) a temperatura ambiente, 84 feci fresche raccolte da meno di 48 ore e 52 tamponi fecali (FecalSwab™, Copan) e congelati a -80°C .

La maggior parte dei campioni utilizzati derivano da un precedente studio effettuato presso la struttura dell'ASST Papa Giovanni XXIII, il quale aveva come scopo quello di testare l'affidabilità di un kit per la ricerca molecolare di parassiti intestinali.

Si tratta di 102 campioni positivi al microscopio per diverse specie e otto campioni negativi di controllo, in particolare di questi tre sono stati forniti dall'ASST Valle-Olona -Presidio

ospedaliero di Busto Arsizio-, 20 dall’Ospedale di Bologna, 25 da parte di ULSS 2 Marca Trevigiana (Treviso) e 54 dall’ASST Papa Giovanni XXIII.

Inoltre, per ampliare il numero di campioni e garantire una buona attendibilità dei risultati, sono stati anche analizzati alcuni campioni pervenuti giornalmente dal 23 Gennaio al 23 Marzo 2026 all’ASST Papa Giovanni XXIII, per un totale di 206, e campioni per la qualità esterna UK-NEQAS (17) e VEQ della Regione Lombardia disponibili (14).

3. Metodi

Lo studio è incentrato sull’efficienza dello strumento FA-280 di Orienter (aggiornamento software 38) (Fig. 24).

Viene presentato dall’azienda come un sistema automatizzato e assistito da intelligenza artificiale per la ricerca di parassiti in campioni di feci.

È in grado di preparare, analizzare e interpretare i campioni grazie alla combinazione della microscopia ad alta risoluzione e ad un algoritmo di intelligenza artificiale, permettendo di ridurre allo stesso tempo l’esposizione degli operatori e la variabilità inter- e intra-operatore.

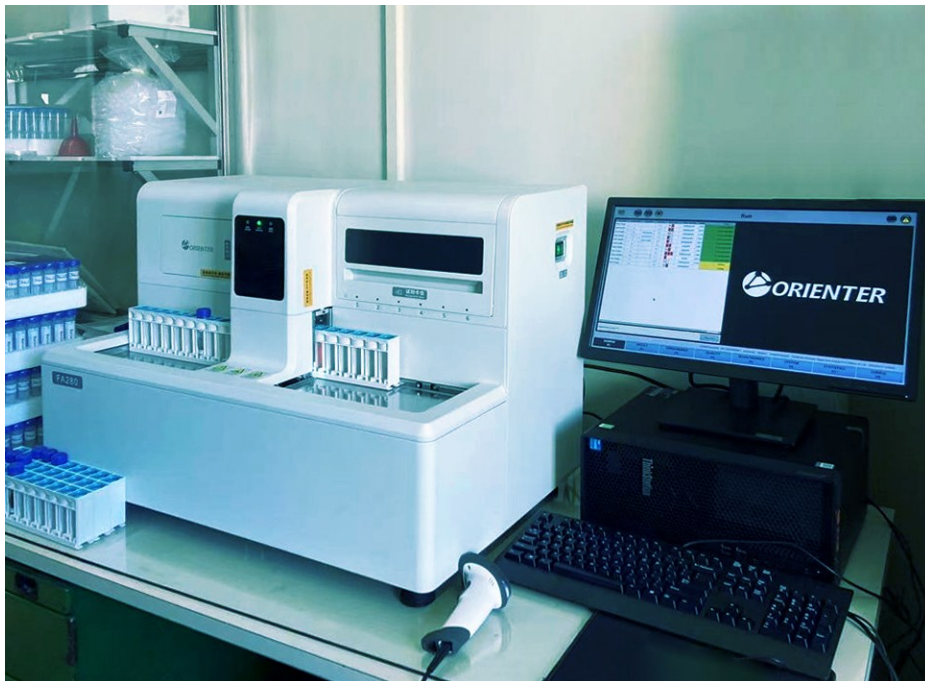


Fig. 24-strumento FA-280 di Orienter.

Lo strumento, oltre a presentare un modulo per l'immunocromatografia che può essere implementato per la ricerca di antigeni di virus e batteri intestinali, presenta un modulo centrale all'interno del quale avviene la pre-analisi automatizzata: FA-280 effettua la diluizione con una soluzione a bassa concentrazione di tensioattivi. La miscelazione avviene tramite una pompa idraulica che insuffla aria all'interno dell'ago e crea delle bolle in modo da disciogliere il campione nella soluzione senza causare la rottura degli eventuali parassiti adulti o delle loro uova, prosegue con la sedimentazione e l'arricchimento. Infine, vi è un modulo per la microscopia ad alta risoluzione.

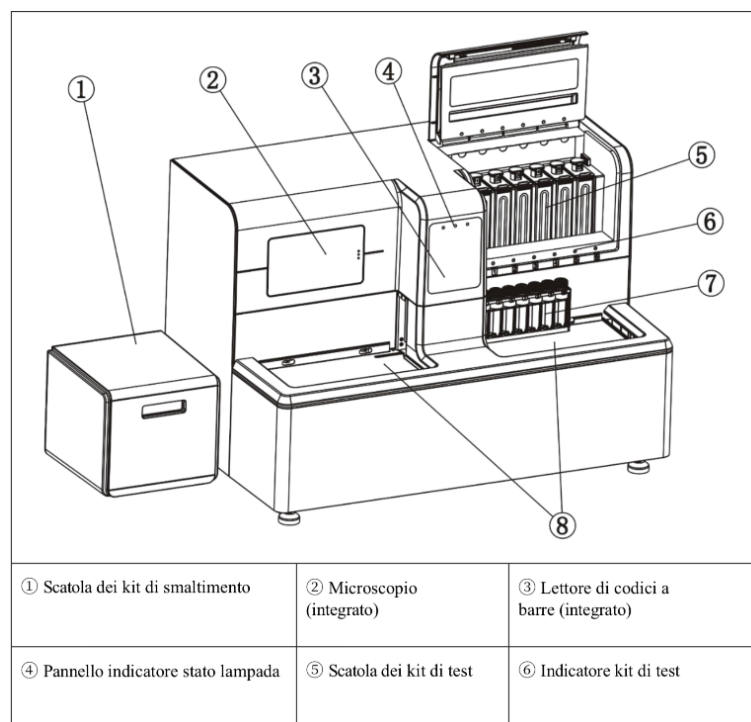


Fig. 25-rappresentazioni delle componenti dello strumento FA-280 di Orientier.

Si parte facendo il “check-in” il campione e preparando l'apposita cartuccia (Fig. 26) dello strumento con circa 0.5 grammi o millilitri di campione di feci fresche o conservate in formalina. È importante, però, che l'integrità morfologica sia mantenuta per permettere allo strumento di identificare correttamente l'eventuale parassita. La quantità da utilizzare varia di campione in campione e viene stabilita dall'operatore in base alla consistenza o alla concentrazione del campione stesso.

Il tubo per il campione presenta un tappo a chiusura ermetica, che garantisce una maggior sicurezza ed è presente una guaina, brevettata dall'azienda produttrice, che può essere forata più volte per poter ri-testare lo stesso campione, e una paletta per la raccolta del campione fresco. L'interno della paletta è cavo, per permettere l'ingresso dell'ago dello strumento che carica il diluente e insuffla l'aria per la miscelazione.

Vengono forniti cinque rack, ciascuno dei quali può contenere fino a 10 cartucce. Inoltre, essendo uno strumento a flusso continuo, possono essere analizzati anche un centinaio di campioni al giorno.



Fig. 26-tubi/cartucce per i campioni utilizzate dallo strumento FA-280.

Una volta caricato il rack, lo strumento procede a effettuare tutta la parte pre-analitica, aggiungendo il volume di diluente indicato dall'operatore, stabilito in base alle caratteristiche dei diversi campioni preparati, e successivamente esegue la lettura al microscopio. Lo strumento preleva dalla parte inferiore del tubo una quantità di circa 0,5 millilitri di preparato, in modo che questo passi attraverso il filtro d'acciaio con fori da 200 μm , e lo carica su un grande vetrino interno suddiviso in tre "canali". Una volta caricato uno dei canali, FA-280 analizza tutti i campi del vetrino e acquisisce 100 immagini a ingrandimento 100x e 40 immagini a ingrandimento 40x, effettuate su 10 piani di fuoco e uno Z-stack di 10 μm , impiegando circa 2 minuti per campione.

Mentre FA-280 procede alla preparazione e all'analisi del campione successivo, l'esito del campione finito di processare è già disponibile e l'operatore può iniziare a ispezionare le foto ottenute e verificare il risultato fornito dallo strumento.

Man mano che lo strumento scannerizza il vetrino e acquisisce le immagini a ingrandimento 100x va a verificare la presenza nel campione di strutture che possiedono contorno, colore e dimensione che potrebbero appartenere a un parassita, le confronta con le immagini in database e ricontrolla poi a ingrandimento 40x; se riscontra una corrispondenza maggiore o uguale al 60% con le immagini di "addestramento", segnala la struttura con il "tag" del parassita specifico.

Nel caso in cui le immagini siano poco chiare o si noti un'eccessiva concentrazione del campione, è possibile ripetere l'analisi utilizzando lo stesso tubo, evitando quindi lo spreco di un'altra cartuccia e di campione.

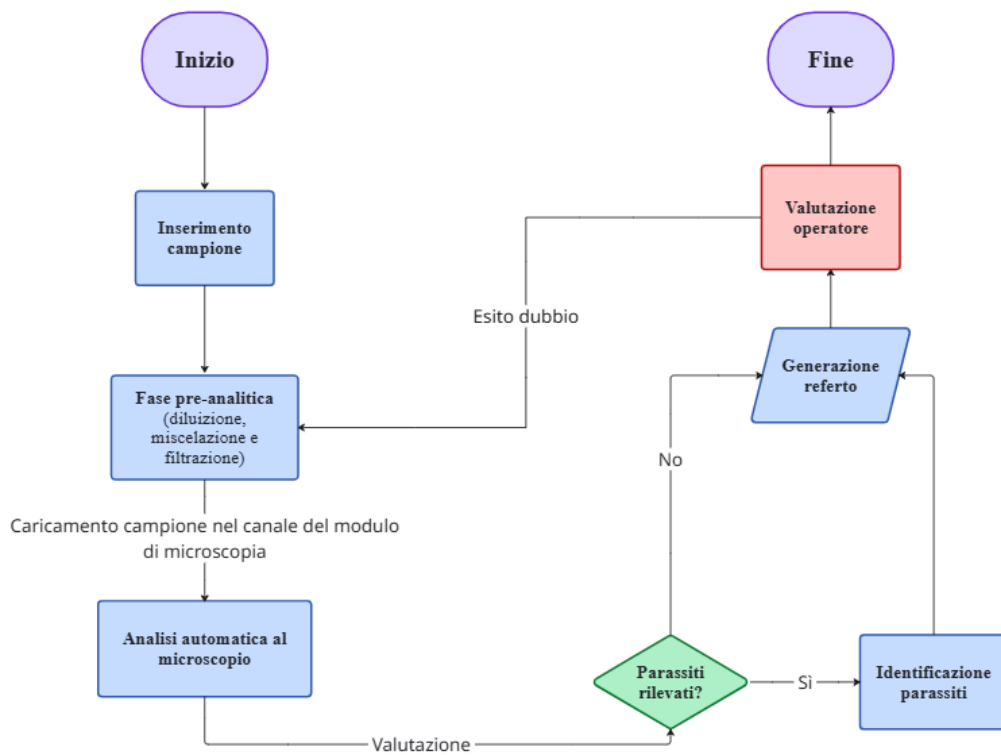


Fig. 27-flowchart impiegato dallo strumento FA-280 per l'analisi del campione.

Al momento FA-280 è in grado di riconoscere le uova di *A. lumbricoides* (uova sia fecondate che non), *A. duodenale/Necator* (hookworm), *Opisthorchis viverrini*, *T. trichiura*, *Taenia* spp., *E. vermicularis*, *Schistosoma japonicum*, *Hymenolepis nana*, la larva di *S. stercoralis*, *Giardia duodenalis* e *Chilomastix mesnili* sia in forma di cisti che di trofozoita; *B. hominis* in forma vacuolat, *Entamoeba coli* ed *E. histolytica*.

Inoltre, è in grado di discriminare i parassiti da eventuali interferenti come cellule ematiche, lieviti, globuli di grasso e cristalli di Charcot-Leyden.

Una volta terminata l'analisi, lo strumento esegue l'autolavaggio con una soluzione ad alta concentrazione di tensioattivi, limitando ulteriormente il rischio biologico per l'operatore.

Tutti i campioni sono stati prima osservati al microscopio Nikon Eclipse E600, effettuando un doppio spot e colorandone uno con Lugol, esaminandoli poi entrambi a ingrandimento 10x e 40x, per poter validare l'esito. Ai fini dell'analisi di accuratezza diagnostica, il risultato della microscopia convenzionale, eventualmente integrato con il dato disponibile da percorso diagnostico routinario o da controllo esterno, è stato considerato il reference standard operativo. FA-280 è stato quindi valutato rispetto a tale riferimento mediante matrice 2×2.

IV. Risultati e discussione

Durante lo studio sono stati esaminati complessivamente 343 campioni, tutti precedentemente osservati e valutati al microscopio (Gold standard), il quale risulta essere il nostro metodo di confronto per determinare l'efficienza diagnostica dello strumento automatizzato e integrato con intelligenza artificiale FA-280 di Orienter. Lo studio non è stato condotto con operatori in "cieco", in quanto erano già a conoscenza del risultato ottenuto al metodo di riferimento.

Al microscopio i campioni positivi erano 134 mentre quelli negativi 209.

Inoltre, dei 343 campioni analizzati, 76 erano stati testati anche con un kit di biologia molecolare (Allplex™ GI-Helminth(I) Assay (Seegene)) per la ricerca di elminti e protozoi: 44 erano risultati positivi alla PCR e i restanti 32 erano negativi; il risultato di 52 campioni osservati con FA-280 combaciava con quanto riscontrato durante la PCR, con una concordanza del 68,6% (IC al 95%: 58,2% - 79,0%).

Si è poi stabilito che i campioni totali venissero suddivisi in un "primary dataset" e un "exploratory dataset". Nel primo caso si sono considerati i campioni conservati in formalina al 10% e i campioni di feci fresche poiché rappresentano al meglio il tipo di campione che perviene e si utilizza quotidianamente per la ricerca parassitologia fecale all'interno dell'ASST Papa Giovanni XXIII. In questo primo dataset sono stati esclusi i campioni risultati positivi al metodo di riferimento per *E. Vermicularis*, in quanto si tratta di un parassita difficilmente riscontrabile in campioni di feci e il cui Gold standard rimane l'analisi al microscopio dello scotch test: il ciclo vitale del parassita stesso prevede che la femmina gravida, di notte, rilasci le uova, sforzando lo sfintere anale dell'ospite, per poterle immettere nell'ambiente; le uova rimangono perciò adese alla cute circostante delle pliche perianali e non vengono immesse all'esterno tramite le feci. Con le tecniche di concentrazione delle feci si ritrovano le uova rare volte (5-10% dei casi) e soprattutto quando la carica parassitica nell'ospite è elevata, dato che non vengono rilasciate direttamente all'interno dell'intestino.

Il "primary dataset" è il dataset scelto per la valutazione effettiva di FA-280.

L'analisi sul dataset primario ("primary dataset"), evidenzia che, su 253 campioni totali analizzati, 29 positivi (VP) e 196 negativi (VN), per un totale di 225 campioni, sono risultati

concordi con quanto osservato al microscopio: FA-280 ha dimostrato una concordanza del 88,9% (IC al 95%: 84,4% - 92,2%) rispetto al metodo di riferimento (Tab. 5).

<i>Reference standard</i>	<i>FA-280 positivo</i>	<i>FA-280 negativo</i>	<i>Totale</i>
<i>Positivo</i>	VP	FN	VP + FN
<i>Negativo</i>	FP	VN	FP + VN
<i>Totale</i>	VP + FP	FN + VN	VP+ VN + FP + FN

Tab. 4- tabella base utilizzata per quelle successive necessarie all'analisi dei dati. Sono riportate le descrizioni dei valori che vengono inseriti.

<i>Reference standard</i>	<i>FA-280 positivo</i>	<i>FA-280 negativo</i>	<i>Totale</i>
<i>Positivo</i>	29	18	47
<i>Negativo</i>	10	196	206
<i>Totale</i>	39	214	253

Tab. 5-tabella dati del “primary dataset” formato dai campioni conservati in formalina al 10% e dai campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore, escludendo quelli positivi per *Enterobius vermicularis*.

È stato quindi possibile calcolare i valori utili alla valutazione diagnostica di base del metodo in esame, come la sensibilità e la specificità diagnostica, il valore predittivo positivo e negativo, ma anche altri parametri più specifici come l'indice di Youden, il DOR (Diagnostic Odds Ratio) e la Kappa di Cohen.

Il Diagnostic Odds Ratio (DOR), $DOR = \frac{VP*VN}{FP*FN}$, permette di comprendere l'efficacia diagnostica globale del test; l'indice di Youden, invece, calcolato come $J = sensibilità + specificità - 1$, dove J è compreso tra 0 e 1, indica la capacità complessiva del test nel distinguere la popolazione malata da quella sana; infine, la Kappa di Cohen misura la

concordanza tra il metodo in valutazione e il Gold standard, correggendo l'eventuale presenza di coincidenza, si calcola come $K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$, dove P_o indica l'accordo osservato e P_e l'accordo atteso per caso.

In merito al dataset primario, la sensibilità, ricavata da $\frac{VP}{VP+FN} * 100$, è risultata essere 61,7% (IC al 95%: 47,2% - 74,7%); mentre la specificità, $\frac{VN}{VN+FP} * 100$, è pari a 95,1% (IC al 95%: 91,1% - 97,5%) (Tab. 6).

	<i>Valore</i>	<i>IC al 95%</i>
<i>Sensibilità</i>	61,7%	47,2% - 74,7%
<i>Specificità</i>	95,1%	91,1% - 97,5%
<i>VPP</i>	74,4%	58,9% - 85,4%
<i>VPN</i>	91,6%	87,0% - 94,7%
<i>Indice di Youden</i>	0,568	-
<i>DOR</i>	31,6	12,9 - 77,1
<i>Kappa di Cohen</i>	0,60	0,45 - 0,75

Tab. 6-tabella riassuntiva con i valori dei principali parametri diagnostici ottenuti e riferiti al "primary dataset".

Mentre il Diagnostic Odds Ratio (DOR) maggiore di 20 indica che FA-280 possiede un'ottima capacità discriminativa, l'indice di Youden (J=0.56) è una performance moderatamente buona, e la Kappa di Cohen pari a 0.60 sottolinea un accordo buono/discreto tra i due metodi.

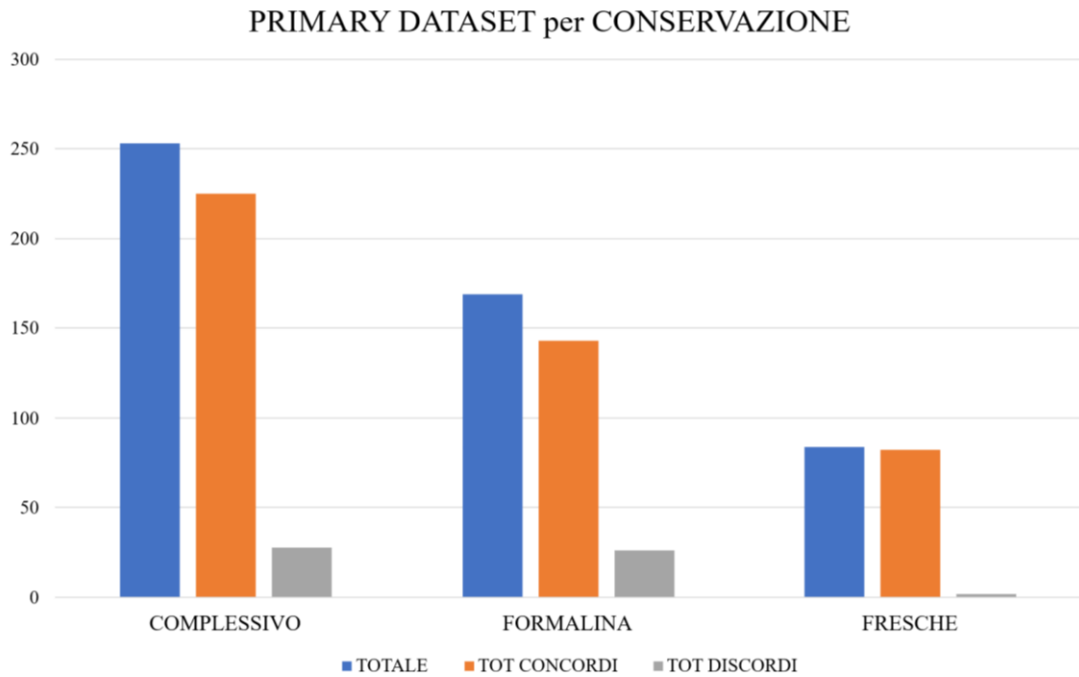


Fig. 28-grafico di distribuzione della concordanza tra il metodo di riferimento e FA-280 utilizzando i campioni del “primary dataset”, suddivisi anche secondo i due metodi di conservazioni scelti.

Focalizzandosi solo sui campioni conservati in formalina al 10% (Tab. 7), in cui si ha una concordanza con il metodo di riferimento dell’84,6% (IC al 95%: 78,4% - 89,3%) (Tab.8), si osserva che la sensibilità, la specificità e il VPN, ovvero la probabilità che un soggetto risultato negativo al test lo sia realmente, sono inferiori rispetto ai valori complessivi del “primary dataset”.

Il valore predittivo positivo (VPP), e quindi la probabilità che un soggetto risultato positivo al test lo sia veramente, è invece lievemente maggiore: 76,5% contro il 74,4% del generale.

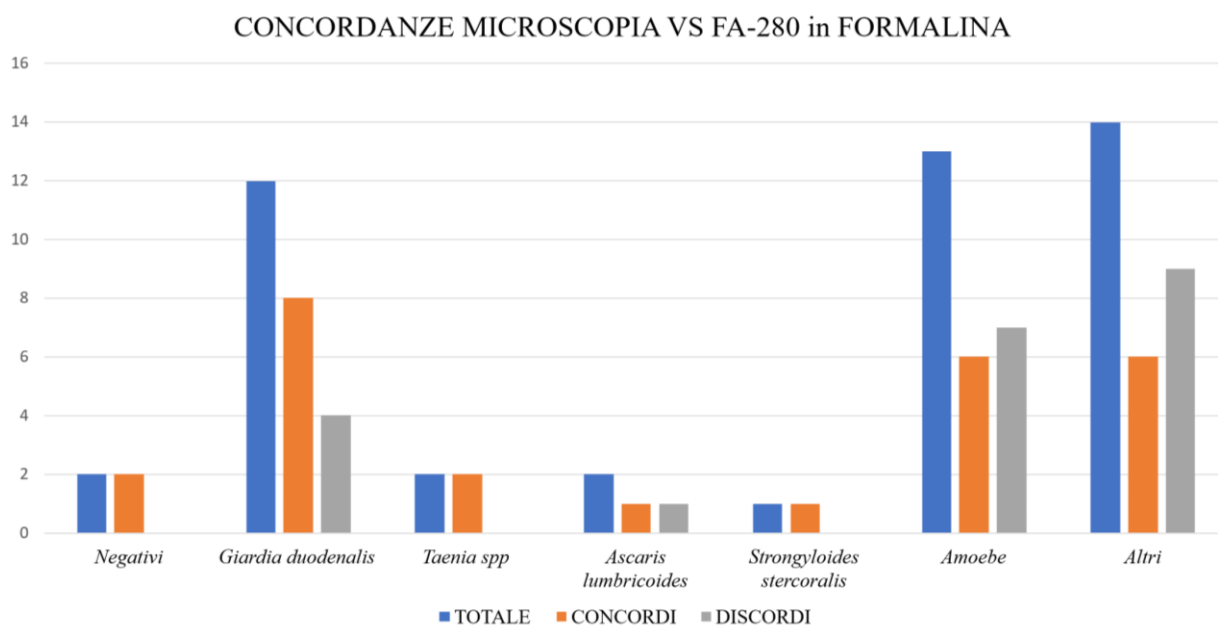
<i>Reference standard</i>	<i>FA-280 positivo</i>	<i>FA-280 negativo</i>	<i>Totale</i>
<i>Positivo</i>	26	18	44
<i>Negativo</i>	8	117	125
<i>Totale</i>	34	135	169

Tab. 7- tabella dati del “primary dataset” formato solo dai campioni conservati in formalina al 10%, escludendo quelli positivi per *Enterobius vermicularis*.

	<i>Valore</i>	<i>IC al 95%</i>
<i>Sensibilità</i>	59,1%	44,2% - 72,4%
<i>Specificità</i>	93,6%	87,8% - 96,8%
<i>VPP</i>	76,5%	59,8% - 88,0%
<i>VPN</i>	86,7%	79,8% - 91,6%
<i>Indice di Youden</i>	0,527	-
<i>DOR</i>	21,1	8,0 – 55,4
<i>Kappa di Cohen</i>	0,55	0,38 – 0,73

Tab. 8- tabella riassuntiva con i valori dei principali parametri diagnostici ottenuti e riferiti ai campioni conservati in formalina al 10% del “primary dataset”.

Proseguendo l’analisi, si è andati a vedere se ci fossero delle specie che, conservate in formalina al 10%, fossero ritrovate più difficilmente dallo strumento FA-280 rispetto ad altre (Fig. 29).



In «altri» sono contenuti *Ancylostoma/Necator*, *Schistosoma japonicum*, *Trichuris trichiura*, *Blastocystis hominis*, *Hymenolepis nana* e campioni misti di UK-NEQAS e VEQ-Lombardia

Fig. 29- grafico di distribuzione della concordanza tra il metodo di riferimento e FA-280 utilizzando i campioni conservati in formalina al 10% in base alle specie presenti nel campione.

Per quanto riguarda invece i campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore, FA-280 ha prodotto dei risultati molto buoni, soprattutto per la sensibilità, la specificità e il valore predittivo negativo, mentre il valore predittivo positivo è quello più scarso (Tab. 9), ma bisogna anche ricordare che la numerosità campionaria è ridotta rispetto a quella dei campioni in formalina al 10%. La concordanza rispetto al metodo di riferimento è del 97,6% (IC al 95%: 91,7% - 99,3%).

<i>Reference standard</i>	<i>FA-280 positivo</i>	<i>FA-280 negativo</i>	<i>Totale</i>
<i>Positivo</i>	3	0	3
<i>Negativo</i>	2	79	81
<i>Totale</i>	5	79	84

Tab. 9- tabella dati del “primary dataset” formato solo dai campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore, escludendo quelli positivi per *Enterobius vermicularis*.

	<i>Valore</i>	<i>IC al 95%</i>
<i>Sensibilità</i>	100%	43,9% - 100%
<i>Specificità</i>	97,5%	91,4% - 99,3%
<i>VPP</i>	60,0%	23,1% - 88,2%
<i>VPN</i>	100%	95,4% - 100%
<i>Indice di Youden</i>	0,975	-
<i>DOR</i>	-	-
<i>Kappa di Cohen</i>	0,72	0,39 – 1,00

Tab. 10- tabella riassuntiva con i valori dei principali parametri diagnostici ottenuti e riferiti ai campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore del “primary dataset”.

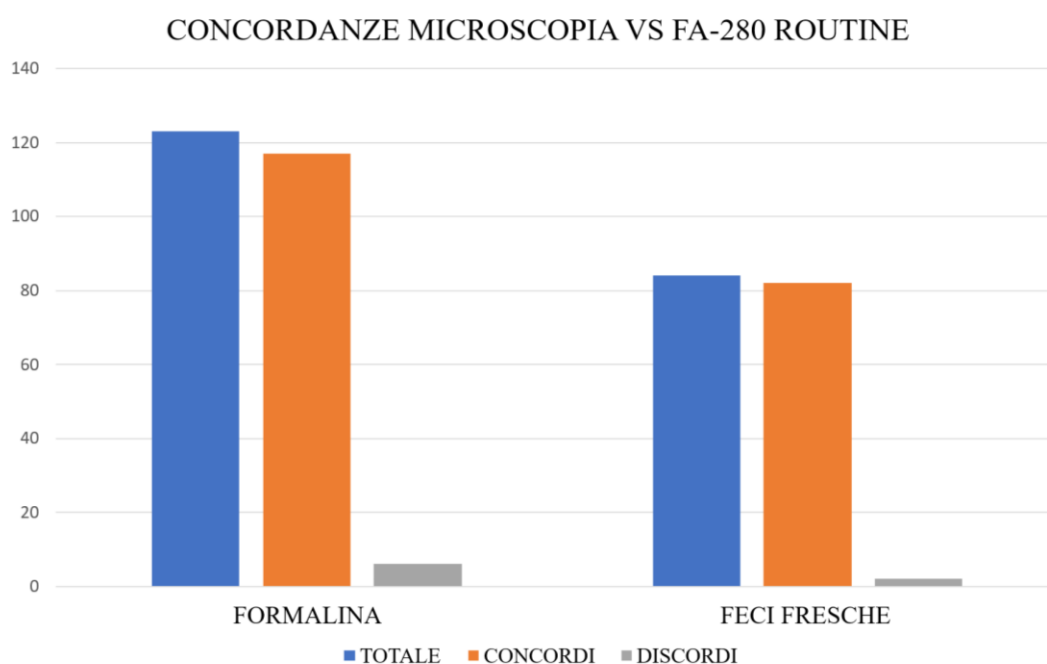


Fig. 30-grafico di distribuzione della concordanza tra il metodo di riferimento e FA-280 utilizzando i campioni di routine di feci fresche raccolte da meno di 48 ore o conservati in formalina al 10%.

Il secondo tipo di dataset, invece, è stato creato per indagare maggiormente se altri metodi di conservazione potessero impattare sulla performance di FA-280: è formato da campioni

di feci fresche congelate a -80°C e di brodi di coltura di FecalSwab™ congelati a 80°C, positivi e negativi al Gold standard; in più sono stati tenuti in considerazione anche i campioni positivi per *E. vermicularis* conservati con i diversi metodi.

Nello specifico, su 82 campioni positivi al metodo di riferimento, lo strumento FA-280 ne ha rilevati 32 (VP), mentre gli 8 campioni negativi al microscopio sono stati tutti identificati correttamente dallo strumento (VN). L'esito di 50 campioni, però, è stato erroneamente interpretato dal software, i quali corrispondono a 2 falsi positivi (FP) e 48 falsi negativi (FN) (Tab. 11).

<i>Reference standard</i>	<i>FA-280 positivo</i>	<i>FA-280 negativo</i>	<i>Totale</i>
<i>Positivo</i>	32	48	80
<i>Negativo</i>	2	8	10
<i>Totale</i>	34	56	90

Tab. 11- tabella dati dell'“exploratory dataset” formato dai campioni di feci congelate a -80°C, campioni di feci fresche congelate a -80°C e campioni positivi per *Enterobius vermicularis* conservati con i diversi metodi.

I campioni contenenti *E. vermicularis* erano 28, ma solo in 2 FA-280 ha riscontrato le uova.

Nei campioni di appartenenti al dataset esplorativo (“exploratory dataset”) si evidenzia una concordanza decisamente inferiore rispetto a quella ottenuta col primo dataset, rispettivamente del 44,4% (IC al 95%: 34,6% - 54,8%). Anche i valori degli altri indici diagnostici sottolineano una minore efficienza dello strumento quando viene utilizzata una matrice conservata a -80°C (Tab. 12).

	Valore	IC al 95%
<i>Sensibilità</i>	40,0%	29,9% - 51,0%
<i>Specificità</i>	80,0%	49,0% - 94,3%
<i>VPP</i>	94,1%	80,9% - 98,4%
<i>VPN</i>	14,3%	7,5% - 25,2%
<i>Indice di Youden</i>	0,200	-
<i>DOR</i>	2,67	0,51 – 13,9
<i>Kappa di Cohen</i>	0,05	-0,09 – 0,18

Tab. 12- tabella riassuntiva con i valori dei principali parametri diagnostici ottenuti e riferiti ai campioni inseriti nell’“exploratory dataset”.

Questi due tipi di conservazione, uniti anche ai campioni di feci contenenti *E. vermicularis*, si sono dimostrati quindi poco adatti per la ricerca parassitaria con lo strumento FA-280, poiché il congelamento causa la rottura delle uova e degli elminti, impedendo all’intelligenza artificiale di riconoscere le caratteristiche apprese durante l’addestramento per poter identificare correttamente i parassiti intestinali.

Ciononostante, il valore predittivo positivo (VPP) si è rilevato molto alto, 94.1 (Tab. 12), e anche la specificità è abbastanza buona, 80,0% (Tab. 12).

Per alcune specie, come ad esempio *A. lumbricoides*, il tipo di conservazione si è rilevato essere fondamentale: infatti se questo parassita era stato congelato tal quale nella matrice biologica e successivamente scongelato per effettuare l’analisi, le uova si frammentavano facilmente, non essendo quindi più riconoscibili dall’intelligenza artificiale dello strumento FA-280 (Fig. 31).

Anche per *S. stercoralis* si è riscontrata una performance non ottimale, ma, al di là del metodo di conservazione, FA-280 non dovrebbe comunque essere considerato un metodo di esclusione diagnostica, soprattutto nei pazienti a rischio, nei quali devono rimanere indicati percorsi dedicati (campioni serati, coltura/agar plate, sierologia e/o metodi molecolari secondo il contesto clinico). Questo perché la microscopia fecale ha dimostrato essere poco sensibile per *S. stercoralis*.

Per altre specie, quali *G. duodenalis* e *Taenia* spp., il metodo di conservazione non sembra impattare in modo significativo sulle capacità di FA-280 di rilevare i parassiti.

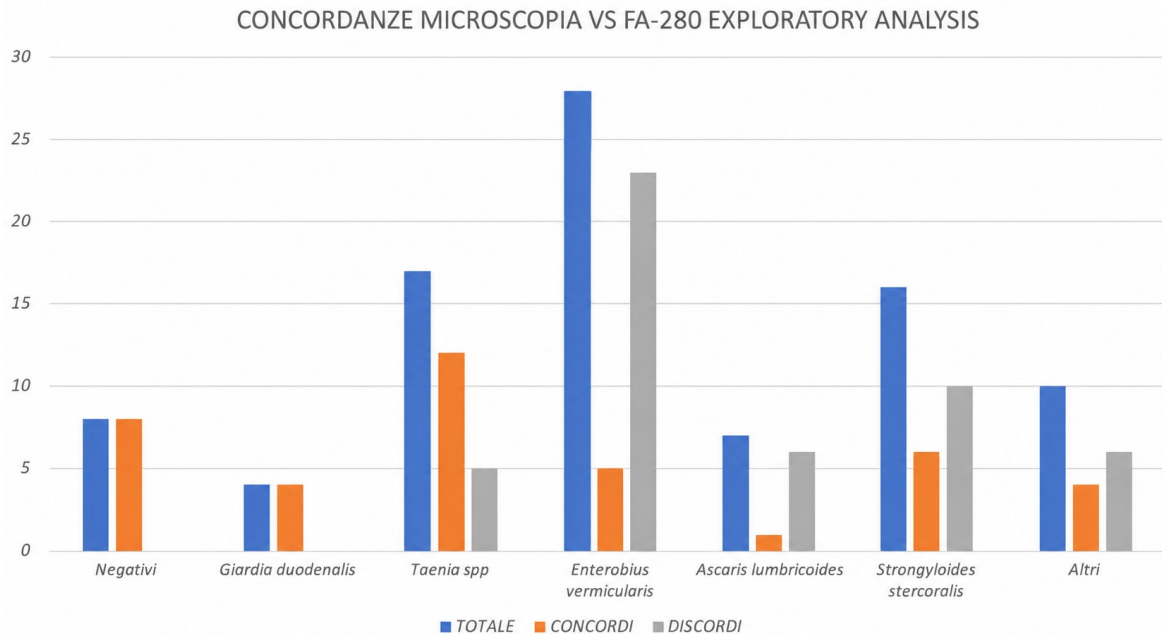


Fig. 31-grafico di distribuzione della concordanza tra il metodo di riferimento e FA-280 utilizzando i campioni dell’“exploratory dataset”.

È importante segnalare anche alcune problematiche riscontrate nell’utilizzo dello strumento: a causa di un errore di settaggio, le amebe non potevano essere riconosciute, ma al tempo stesso molte di queste venivano indicate come globuli bianchi (WBC), come già segnalato dell’Azienda Orienter. Con il nuovo aggiornamento del software (aggiornamento 39) verrà aggiunta la distinzione di *E. histolytica* dal resto delle altre amebe, e inoltre verranno aumentati i piani di fuoco da 10 a 15, per migliorare la qualità delle immagini prodotte.

Ciò che più distingue lo strumento FA-280 dal microscopio, oltre alla modalità di preparazione, è come i parassiti appaiono: nonostante si abbiano sempre degli interferenti presenti nel campione, l’immagine appare più nitida ed è possibile osservare un numero maggiore di piani di fuoco (Fig. 34 e Fig. 35).

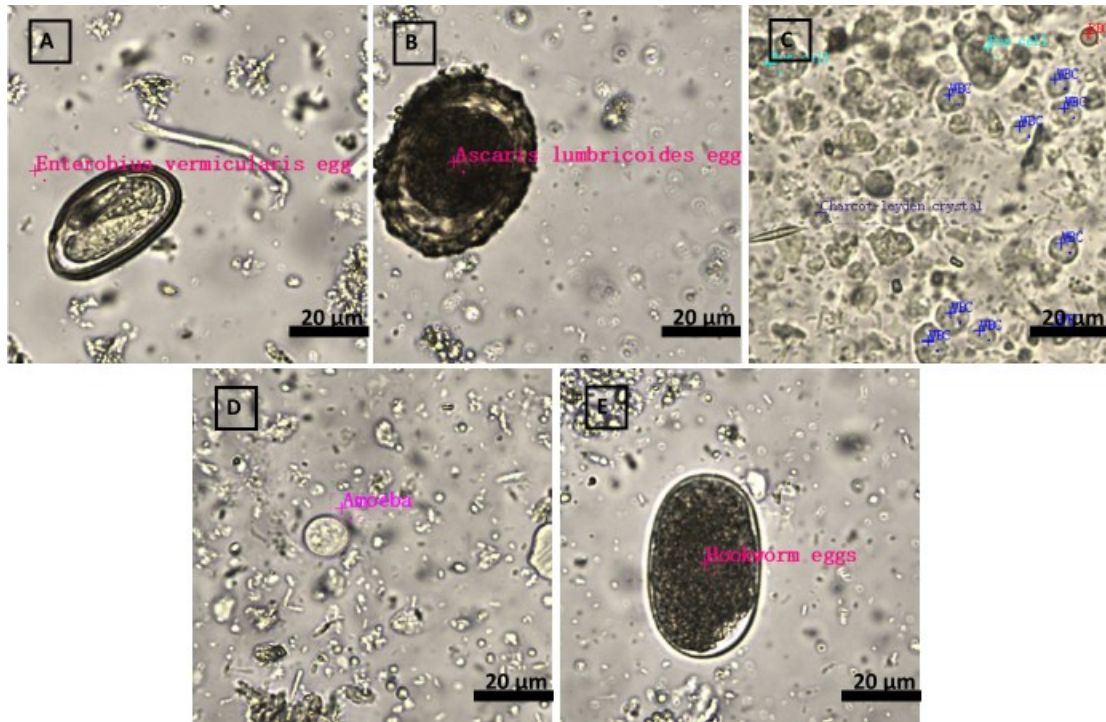


Fig. 34-immagini di FA-280 di *Enterobius vermicularis* (A); *Ascaris lumbricoides* (B); piociti, cristalli di Charcot-leyden, globuli bianchi/WBC e globuli rossi/RBC (C); ameba (D); hookworm/Ancylostomatidae (E).

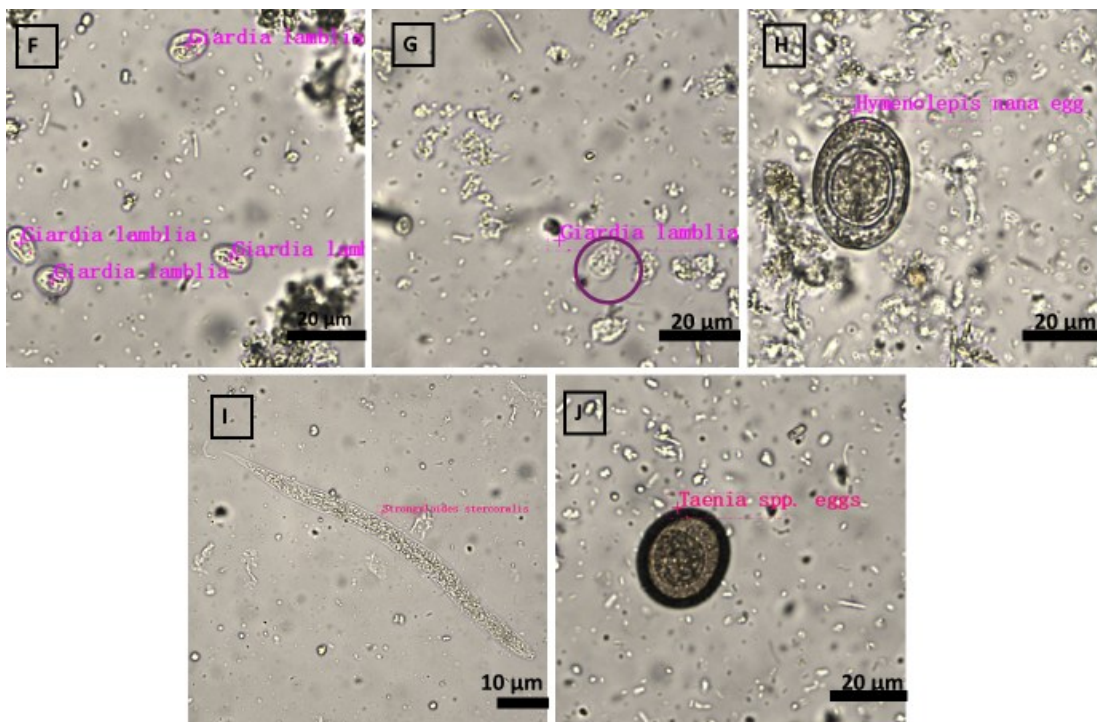


Fig. 35-immagini di FA-280 di *Giardia duodenalis* -cisti- (F); *Giardia duodenalis* -trofozoita- (G); *Hymenolepis nana* (H); *Strongyloides stercoralis* (I); *Taenia* spp. (J).

Andando a confrontare i dati ottenuti presso l'ASST Papa Giovanni XXIII rispetto ai valori evidenziati dal primo studio effettuato all'Università di Mahidol (Thailandia) (⁴²*Boonyong S. et al., 2024*), per alcuni parametri diagnostici si riscontrano delle differenze a volte anche significative, le quali però non sono date esclusivamente dalla dimensione campionaria, dal tipo di conservazione o dalle specie ricercate, quanto più da come è stato deciso di affrontare l'analisi dei dati.

Nel caso dello studio condotto dal Dott. Boonyong, in seguito all'analisi del primo set di campioni in cui è stato comparato il Gold standard con quanto riportato dallo strumento FA-280 in autonomia e da FA-280 associato al controllo dell'operatore umano, è stato stabilito che l'intervento dell'operatore fosse essenziale per la corretta attribuzione dell'esito.

Nel nostro caso, invece, poiché l'interesse maggiore era verificare l'affidabilità dello strumento all'interno della normale pratica di laboratorio, è stato stabilito che l'intervento umano dovesse essere minimo e limitato a verificare l'esito fornito dallo strumento e gli eventuali errori commessi (falsi positivi e falsi negativi), senza intervenire sulla correzione e l'attribuzione esatta di quanto segnalato o non segnalato.

Se dovessimo ri-analizzare i nostri dati applicando lo stesso metodo utilizzato nello studio sopracitato, noteremmo valori significativamente diversi: una parte dei falsi negativi (FN) sarebbe stata intercettata e corretta dall'operatore, così come tutti i falsi positivi (FP); la concordanza aumenterebbe dall'88,9% all'92,8%, molto più simile a quanto ottenuto dallo studio di Boonyong (93,4%); la sensibilità generale sarebbe del 61,7% e il valore predittivo positivo raggiungerebbe il 100%.

Restringendo poi l'analisi al metodo di conservazione, i campioni conservati in formalina al 10% sono quelli con il maggior numero di falsi negativi, i quali sarebbero potuti esseri corretti; in particolare la specificità diventerebbe del 100%, contro il 93,6%, e il valore predittivo negativi (VPN) sarebbe del 100%, un aumento del 13,3%.

V. Conclusioni

Le parassitosi intestinali continuano ad essere tra le patologie più diffuse e allo stesso tempo più difficoltose da diagnosticare, sia a causa dei sintomi e manifestazioni che queste possono provocare, sia per la difficoltà nella loro identificazione al microscopio (Gold standard), anche da parte degli operatori più esperti.

La necessità di migliorare la sensibilità e specificità nella ricerca di elminti e protozoi intestinali ha spinto diverse aziende a pensare e a realizzare nuovi sistemi strumentali per riuscire a identificarli.

L'analizzatore automatico associato al sistema di intelligenza artificiale FA-280 di Orienter potrebbe rappresentare un valido miglioramento nell'analisi dei campioni fecali: è uno strumento facile ed intuitivo da utilizzare, agli operatori è richiesta una formazione minima ed è in grado di velocizzare sensibilmente il processo di analisi dei campioni di feci per la ricerca di parassiti intestinali, aumentando al tempo stesso la sicurezza da rischio biologico per gli operatori e rendendo l'ambiente di lavoro più piacevole.

Il costo a campione per l'analisi è maggiore ma non impatta in maniera eccessiva e nella valutazione complessiva non è un fattore che incide in modo preponderante.

Si è dimostrato essere molto sensibile e specifico per alcune specie, come *G. duodenalis* e *Taenia* spp., mentre con altre riscontra ancora delle criticità, ad esempio con *S. stercoralis* e *A. lumbricoides*.

Si tratta ad ogni modo di uno strumento che sfrutta un'intelligenza artificiale per lo svolgimento del suo lavoro. che in quanto tale necessita ancora di essere addestrata per poter migliorare le sue prestazioni e la sua affidabilità diagnostica.

Al momento però non si può considerare uno strumento totalmente autonomo e la presenza dell'operatore rimane fondamentale per correggere eventuali errori commessi da FA-280, ciononostante si può rivelare un ottimo aiuto nello smaltimento del copioso numero di campioni che giornalmente vengono fatti recapitare a ospedali e centri di analisi.

Per poterlo implementare nella routine di un ospedale deve rispettare dei parametri minimi per poter garantire che il referto rilasciato al paziente sia sicuro e affidabile.

In particolare, vista l'applicazione che si prevede per lo strumento, cioè quella di alleggerire il carico di lavoro di personale strutturato e tecnici di laboratorio, è necessario che FA-280 sia in grado di discriminare con un'elevata percentuale la popolazione malata (VP) da quella sana (VN), e quindi deve possedere un'alta sensibilità piuttosto che una buona specificità diagnostica e allo stesso tempo deve avere un elevato valore predittivo negativo (VPN).

Per quello che è stato possibile valutare durante questo studio presso la struttura ASST Papa Giovanni XXIII di Bergamo, il FA-280 di Orienter ha avuto complessivamente dei discreti valori di specificità, di valore predittivo positivo (VPP) e di valore predittivo negativo (VPN), rispettivamente del 95,1%, del 74,4% e del 91,6%, mentre il risultato riguardante la sensibilità (61,7%) è abbastanza scadente.

L'analisi sul dataset esplorativo ha permesso di avere un'idea più ampia dell'impatto del metodo di conservazione sulle capacità di FA-280.

Tenendo in considerazione quanto ottenuto dal dataset primario, da quello esplorativo e dall'analisi specifica eseguita sui campioni conservati in formalina al 10% separati da quelli freschi, unito anche alle necessità degli operatori, il tipo di campione più adatto a questo genere di analisi e per questo strumento, si è confermato quello di feci fresche raccolte da meno di 48 ore (Tab. 13), come già indicato anche dall'azienda produttrice, poiché permette di avere una specificità del 97,5% e un VPN del 100%.

In alternativa, è possibile utilizzare la formalina al 10%, in cui si ha una diminuzione della specificità del 4% (93,6%) e del VPN di 13,3% (86,7%), ma si ottiene un valore predittivo positivo (VPP) maggiore (76,5%).

Bisogna però sottolineare che all'interno della popolazione di campioni conservati in formalina al 10%, una parte aveva diversa provenienza (UK-NEQAS e VEQ-Lombardia) rispetto ai campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore, facenti sempre parte del dataset primario. Da un lato, l'introduzione di campioni di UK-NEQAS e VEQ-Lombardia ci hanno permesso di avere un numero maggiore di campioni positivi per diverse specie di parassiti, dall'altro però crea una sottopopolazione non del tutto sovrapponibile con quella dei campioni di routine (feci fresche raccolte da meno di 48 ore). Per questo si evidenzia il fatto che i valori di VPP e VPN del "primary dataset" sono valori osservati nel dataset, ma non sono indice effettivo della performance di FA-280.

I dati raccolti sul dataset esplorativo non possono essere ritenuti affidabili, poiché hanno evidenziato delle criticità legate alla coerenza interna e alla numerosità campionaria. La concordanza del 44,4% data dai campioni conservati in tal modo, non solo risulta essere inferiore alla soglia di significatività attesa, ma è caratterizzata da intervalli di confidenza estremamente ampi ($\pm 10,4\%$) e che includono il valore del 50%, sottolineando che non è statisticamente possibile escludere che quanto ottenuto non sia attribuibile al puro caso.

	PRIMARY DATASET	FORMALINA al 10%	FECI FRESCHE	EXPLORATORY DATASET
<i>CONCORDANZA (% margine di errore)</i>	88,9% ($\pm 4,5$)	84,6% ($\pm 6,2$)	97,6% ($\pm 5,9$)	44,4% ($\pm 9,8$)
<i>SENSIBILITÀ</i>	61,7%	59,1%	100%	40,0%
<i>SPECIFICITÀ</i>	95,1%	93,6%	97,5%	80,0%
<i>VALORE PREDITTIVO POSI- TIVO</i>	74,4%	76,5%	60,0%	94,1%
<i>VALORE PREDITTIVO NE- GATIVO</i>	91,6%	86,7%	100%	14,3%

Tab. 13-tabella riassuntiva dei valori di concordanza, sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN) ottenuti coi diversi metodi di conservazione.

Complessivamente, se si usano i campioni di feci fresche raccolte da meno di 48 ore, i valori che sono stati ottenuti sono soddisfacenti e abbastanza robusti affinché lo strumento FA-280 possa essere implementato nella pratica di laboratorio dell'ASST Papa Giovanni XXIII o di un qualsiasi altro laboratorio di analisi microbiologiche. I valori minimi di sensibilità e specificità richiesti per l'approvazione diagnostica (circa l'80%), unito a una concordanza superiore al 60%, sono stati raggiunti, mentre con i campioni fissati in formalina al 10% sono i risultati sono solo in parte idonei, in quanto la sensibilità è inferiore al limite richiesto.

Anche la valutazione del Diagnostic Odds Ratio, l'indice di Youden e la Kappa di Cohen rafforzano la solidità di quanto osservato, ma sottolineano anche il fatto che lo strumento è più utile come test di conferma diagnostica che come test di screening, limitandone le possibili applicazioni al di fuori della diagnostica.

I dati ottenuti suggeriscono che FA-280 può rappresentare un utile supporto alla diagnostica parassitologica fecale, soprattutto come sistema di digitalizzazione, preselezione e assistenza alla lettura microscopica. Tuttavia, alla luce della sensibilità complessiva non ottimale (valutata sul dataset primario), dell'elevata dipendenza dalla matrice/conservazione del campione e della necessità di rilevazione da parte dell'operatore, lo strumento non può essere considerato autonomo né sostitutivo della microscopia convenzionale. L'eventuale introduzione in routine dovrebbe essere limitata a campioni freschi o conservati in formalina al 10%, con conferma obbligatoria da parte di personale esperto. I campioni congelati non si sono rilevati adatti per la ricerca di parassiti intestinali con FA-280, ed è necessario mantenere dei percorsi diagnostici dedicati per *E. vermicularis* e *S. stercoralis*.

VI. Bibliografia

1. Poulin R. The many roads to parasitism: a tale of convergence. *Adv Parasitol.* 2011;74:1-40. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385897-9.00001-X> . PMID: [21295676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21295676/).
2. Intra J, Taverna E, Sala MR, Falbo R, Cappellini F, Brambilla P. Detection of intestinal parasites by use of the cuvette-based automated microscopy analyser sedi-MAX®. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Mar;22(3):279-284. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.014> . PMID: [26679923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26679923/).
3. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):595-612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002> . Erratum in: *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan;16(1):174. PMID: [12364371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12364371/).
4. Araújo A, Reinhard K, Ferreira LF, Pucu E, Chieffi PP. Paleoparasitology: the origin of human parasites. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013 Sep;71(9B):722-726. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130159> . PMID: [24141513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24141513/).
5. Kowalewska-Grochowska K, Reyes R, Tomlin P. Parasitology of the twenty-first century: are we moving in the right direction? *J Med Microbiol.* 2025. Sep;74(9):002064. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.002064> . PMID: [40928839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40928839/).
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). da Silva AJ, Moser M. The life cycle of the infectious protozoa *Giardia lamblia* [Internet]. 2002 [cited 2026 Apr 3]. Available from: CDC PHIL <https://wwwn.cdc.gov/phil/details.aspx?pid=3394> .
7. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Giardiasis: annual epidemiological report for 2022 [Internet]. Stockholm: ECDC; 2022 [cited 2026 Apr 3]. Available from: ECDC Giardiasis Report 2022 https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/GIAR_AER_2022_Report.pdf
8. Walkowski S. *Entamoeba histolytica* quadrinucleate cyst [Internet]. Wikimedia Commons; 2020 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Wikimedia Commons image https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Entamoeba_histolytica_quadrinucleate_cyst.jpg .
9. Nasrallah J, Akhoundi M, Haouchine D, Marteau A, Mantelet S, Wind P, et al. Updates on the worldwide burden of amoebiasis: a case series and literature review. *J Infect Public Health.* 2022;15(10):1134-1141. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.08.013> . PMID: 36155852.

10. Walkowski S. T. saginata egg [Internet]. Wikimedia Commons; 2011 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Wikimedia Commons image <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:T.saginata-egg.jpg> .
11. Omeragić J, Alagić D, Šerić-Haračić S, et al. Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in humans and animals. In: Infectious Diseases. London: IntechOpen; 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.110727> .
12. Public Health Image Library. Enterobius vermicularis (01) [Internet]. 2019 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Public Domain Files image https://ro.wikipedia.org/wiki/Fi%C8%99ier:Eggs_of_Enterobius_vermicularis_5229_lores.jpg .
13. Lashaki EK, Mizani A, Hosseini SA, Habibi B, Taherkhani K, Javadi A, et al. Global prevalence of enterobiasis in young children over the past 20 years: a systematic review and meta-analysis. *Osong Public Health Res Perspect*. 2023 Dec;14(6):441-450. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2023.0204> . PMID: [38204424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38204424/).
14. Taghipour A, Olfatifar M, Javanmard E, Norouzi M, Mirjalali H, Zali MR. The neglected role of Enterobius vermicularis in appendicitis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020 Apr 23;15(4):e0232143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232143> . PMID: 32324817.
15. Chaurasiya AK. Strongyloides stercoralis in stool wet mount microscopy [Internet]. Wikimedia Commons; 2017 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Wikimedia Commons image https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Strongyloides_stercoralis_in_Stool_Wet_Mount_Microscopy.jpg .
16. Buonfrate D, Bisanzio D, Giorli G, Odermatt P, Fürst T, Greenaway C, et al. The global prevalence of Strongyloides stercoralis infection. *Pathogens*. 2020 Jun 13;9(6):468. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060468> . PMID: [32545787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32545787/).
17. Delorieux; Bremser JG. XIX tabulae: anatomiam entozoorum illustrantes, congestae, nec non explicatione praeditae [Internet]. 1831 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Wikimedia Commons image [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:XIX_\(i.e._Undeviginti\)_tabulae_anatomiam_entozoorum_illustrantes,_congestae,_nec_non_explicatione_praeditae_\(IA_xixieundeviginti00schm\).pdf](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:XIX_(i.e._Undeviginti)_tabulae_anatomiam_entozoorum_illustrantes,_congestae,_nec_non_explicatione_praeditae_(IA_xixieundeviginti00schm).pdf) .
18. Colm G. Ascaris lumbricoides non-fertile egg [Internet]. Wikimedia Commons; 2010 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Wikimedia Commons user page

- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ascaris_lumbricoides_non-fer-
tile_egg.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ascaris_lumbricoides_non-fer-
tile_egg.jpg) .
19. SuSanA Secretariat. Viable Ascaris egg (immotile) [Internet]. Flickr; 2015 [cited 2026 Apr 3]. Available from: Flickr profile [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Viable_Ascaris_Egg_\(Immotile\)_18120485029.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Viable_Ascaris_Egg_(Immotile)_18120485029.jpg) .
 20. Holland C, Sepidarkish M, Deslyper G, Abdollahi A, Valizadeh S, Mollalo A, et al. Global prevalence of Ascaris infection in humans (2010-2021): a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty*. 2022 Nov 18;11(1):113. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-01038-z> . PMID: [36401308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36401308/).
 21. Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães P, Weatherhead JE. A historical and systematic overview of Ascaris vaccine development. *Parasitology*. 2021 Dec;148(14):1795-1805. Epub 2021 Aug 9. <https://doi.org/10.1017/s0031182021001347> . PMID: 35586777.
 22. Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). Percorso diagnostico: parassitosi intestinali [Internet]. 2022 [cited 2026 Apr 3].
 23. Corpuz KDF, Kusolsuk T, Wongphan B, Chonsawat P, Naing KM, Boonsang S, Kittichai V, Fan CK, Chuwongin S, Watthanakulpanich D. Performance validation of deep-learning-based approach in stool examination. *Parasit Vectors*. 2025 Aug 1;18(1):322. <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06878-w> . PMID: 40751198.
 24. Bernieri F, Crotti D, Raglio A. *Manuale illustrato di diagnostica parassitologica*. Bologna: Zanichelli; 2001.
 25. World Health Organization (WHO). *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites* [Internet]. Geneva: WHO; 2019 [cited 2026 Apr 3].
 26. McGill University, J.D. MacLean Centre for Tropical & Geographic Medicine [Internet]. 2015 [cited 2026 Apr 3]. Available from: McGill media gallery <https://www.mcgill.ca/tropmed/media-gallery/detail/1218/126> .
 27. Burns BL, Rhoads DD, Misra A. The use of machine learning for image analysis artificial intelligence in clinical microbiology. *J Clin Microbiol*. 2023 Sep 21;61(9):e02336-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.02336-21> . PMID: [37395657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37395657/).
 28. Sung J. Artificial intelligence in medicine: ethical, social and legal perspectives. *Ann Acad Med Singap*. 2023 Dec 28;52(12):695-699. <https://doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.2023103> . PMID: [38920162](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38920162/).
 29. Abramoff MD, Lavin PT, Birch M, Shah N, Folk JC. Pivotal trial of an autonomous AI-based diagnostic system for detection of diabetic retinopathy in primary

- care offices. NPJ Digit Med. 2018 Aug 28;1:39. <https://doi.org/10.1038/s41746-018-0040-6> . PMID: [31304320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31304320/).
30. Adachi M, Fujioka T, Ishiba T, Nara M, Maruya S, Hayashi K, et al. AI use in mammography for diagnosing metachronous contralateral breast cancer. J Imaging. 2024 Aug 28;10(9):211. <https://doi.org/10.3390/jimaging10090211> . PMID: [39330431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39330431/).
 31. Brigo F, Broggi S, Leuci E, Turcato G, Zaboli A. Can ChatGPT 4.0 diagnose epilepsy? A study on artificial intelligence's diagnostic capabilities. J Clin Med. 2025 Jan 7;14(2):322. <https://doi.org/10.3390/jcm14020322> . PMID: [39860325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39860325/).
 32. Pantanowitz L, Wu U, Seigh L, LoPresti E, Yeh FC, Salgia P, et al. Artificial intelligence-based screening for mycobacteria in whole-slide images of tissue samples. Am J Clin Pathol. 2021 Jun 17;156(1):117-128. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa215> . PMID: [33527136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33527136/).
 33. Wang Z, Zhang L, Zhao M, Wang Y, Bai H, Wang Y, et al. Deep neural networks offer morphologic classification and diagnosis of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2021 Jan 21;59(2):e02236-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02236-20> . PMID: [33148709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33148709/).
 34. World Health Organization (WHO). Malaria [Internet]. Geneva: WHO; 2025 Dec 5 [cited 2026 Apr 3]. Available from: WHO malaria fact sheet <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> .
 35. Bruschi F, Pozio E. De Carneri parassitologia generale e umana. Rozzano (MI): Casa Editrice Ambrosiana; 2023.
 36. Liu R, Liu T, Dan T, Yang S, Li Y, Luo B, et al. AIDMAN: an AI-based object detection system for malaria diagnosis from smartphone thin-blood-smear images. Patterns (N Y). 2023 Aug 3;4(9):100806. <https://doi.org/10.1016/j.pat-ter.2023.100806> . PMID: [37720337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37720337/).
 37. Mathison BA, Kohan JL, Walker JF, Smith RB, Ardon O, Couturier MR. Detection of intestinal protozoa in trichrome-stained stool specimens by use of a deep convolutional neural network. J Clin Microbiol. 2020 May 26;58(6):e02053-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.02053-19> . PMID: [32295888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32295888/).
 38. Huang C, Huang Y, Lin F, Liao L. The clinical application value of the KU-F40 fully automatic fecal analyzer for the detection of fecal parasites: a large-sample retrospective study. Sci Rep. 2025 Jul 7;15(1):24172. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-09935-7> . PMID: [40624366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40624366/).

39. Légeret C, Rüttimann C, Fankhauser H, Köhler H. Parasitic infections in Swiss children: are we overtesting? *BMC Gastroenterol.* 2021 Jan 26;21(1):39. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01619-6> . PMID: [33499814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499814/).
40. Kantzanou M, Karalexi MA, Vrioni G, Tsakris A. Prevalence of intestinal parasitic infections among children in Europe over the last five years. *Trop Med Infect Dis.* 2021 Sep 2;6(3):160. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030160> . PMID: [34564544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34564544/).
41. Crotti D, Bernieri F, Raglio A; AMCLI-CoSP Group Study. Epidemiology of intestinal parasitosis in Italy between 2005 and 2008: diagnostic techniques and methodologies. *Microbiol Med.* 2013;28:1-16. <https://doi.org/10.4081/mm.2013.2274> .
42. Boonyong S, Hunnangkul S, Vijit S, Wattano S, Tantayapirak P, Loymek S, et al. High-throughput detection of parasites and ova in stool using the fully automatic digital feces analyzer, orienter model FA280. *Parasit Vectors.* 2024 Jan 7;17(1):13. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06108-1> . PMID: [38185634](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38185634/).
43. Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep;38(9):3337-40. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3337-3340.2000> . PMID: 10970380.

Ringraziamenti