

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE  
CICLO XXIII**

**“SVILUPPO E APPLICAZIONE  
DI METODICHE MOLECOLARI RAPIDE  
PER L'IDENTIFICAZIONE  
DI AGENTI PATOGENI UMANI”**

Coordinatore:

**Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli**

Tutor aziendale:

**Gent.ma Dott.ssa Laura Zerbini**

Presso: Poliambulatorio Dalla Rosa Prati - Parma

Dottoranda:

**Dott.ssa Chiara Fecci**

# INDICE

|   |                |
|---|----------------|
| <b>INTRODUZIONE</b>   | <b>Pag. 3</b>  |
| <b>IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA</b>                                | <b>Pag. 5</b>  |
| <b><i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i></b>   | <b>Pag. 8</b>  |
| 1. Classificazione  | Pag. 8         |
| 2. Caratteristiche biologiche   | Pag. 9         |
| 3. Morfologia e organizzazione genomica   | Pag. 10        |
| 4. Modalità di infezione e risposta immunitaria                                     | Pag. 11        |
| 5. Patologie correlate e manifestazioni cliniche                                    | Pag. 13        |
| 6. Epidemiologia  | Pag. 15        |
| 7. Misure di controllo e prevenzione  | Pag. 16        |
| <b><i>MYCOPLASMA HOMINIS</i></b>  | <b>Pag. 19</b> |
| 1. Classificazione  | Pag. 19        |
| 2. Caratteristiche biologiche   | Pag. 20        |
| 3. Morfologia e organizzazione genomica   | Pag. 20        |
| 4. Modalità di infezione e risposta immunitaria                                     | Pag. 21        |
| 5. Patologie correlate e manifestazioni cliniche                                    | Pag. 22        |
| 6. Epidemiologia  | Pag. 23        |
| 7. Misure di controllo e prevenzione  | Pag. 24        |
| <b>DIAGNOSI DI LABORATORIO CONVENZIONALE</b>  | <b>Pag. 25</b> |
| - <i>Chlamydia trachomatis</i>  | Pag. 25        |
| - <i>Mycoplasma hominis</i>   | Pag. 28        |
| <b>DIAGNOSI DI LABORATORIO CON TECNICHE MOLECOLARI</b>                              | <b>Pag. 30</b> |
| <b>MATERIALI E METODI</b>   | <b>Pag. 33</b> |
| - Campioni  | Pag. 33        |
| - Estrazione del DNA  | Pag. 38        |
| - Analisi spettrofotometrica  | Pag. 41        |
| - Controllo di amplificazione   | Pag. 43        |
| - Primers specifici per <i>Chlamydia trachomatis</i>                                | Pag. 45        |
| - Primers specifici per <i>Mycoplasma hominis</i>                                   | Pag. 47        |
| - Thermal Cycler non convenzionale  | Pag. 49        |
| - Requisiti per la preparazione della PCR Phusion                                   | Pag. 50        |
| - PCR per <i>Chlamydia trachomatis</i>  | Pag. 54        |
| - PCR per <i>Mycoplasma hominis</i>   | Pag. 54        |
| - PCR per $\beta$ -Globina  | Pag. 55        |
| - Protocollo per il sequenziamento con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer               | Pag. 55        |
| - PCR Multiplex rapida per <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> | Pag. 58        |
| - PCR Kit commerciale   | Pag. 59        |
| <b>RISULTATI</b>  | <b>Pag. 60</b> |
| <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>  | <b>Pag. 77</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>Pag. 82</b> |

# INTRODUZIONE

La biologia molecolare si sta affermando sempre di più nei laboratori di diagnostica medica, perché consente, in tempi piuttosto rapidi, di diagnosticare patologie genetiche o di verificare la presenza di agenti patogeni di origine virale, batterica o micotica in campioni biologici, in alcuni casi, sostituendo le metodiche tradizionali, in altri aggiungendosi alle stesse.

La comunicazione rapida al medico curante, e/o allo specialista, di una diagnosi d'infezione, consente di adottare tempestivamente la terapia più adeguata, mirata ed efficace al fine di evitare ulteriori complicazioni e di prevenirne la trasmissione ad altre persone. La diagnosi rapida d'infezione è necessaria soprattutto per i soggetti a rischio, donne in gravidanza, bambini e anziani, per cui la tempestività della comunicazione al medico è spesso di vitale importanza.

Le metodiche diagnostiche convenzionali, come il dosaggio degli anticorpi, non sono sempre attendibili, e i metodi colturali tradizionali, per la ricerca di batteri e miceti, richiedono tempi lunghi (almeno 24-48 ore) e, in alcuni casi, per i patogeni intracellulari, sono necessarie le colture cellulari.

Le tecniche di biologia molecolare possono essere di grande aiuto soprattutto nella diagnosi precoce di malattie infettive e/o di infezioni spesso asintomatiche e/o latenti.

In particolare, la PCR (Polymerase Chain Reaction/Reazione a Catena della Polimerasi) è una tecnica rivoluzionaria perché ha cambiato l'approccio, sia teorico che sperimentale, verso lo studio del DNA, consentendo la riproduzione, in modo semplice, rapido e piuttosto economico, di un numero illimitato di copie del DNA bersaglio e, quindi, l'amplificazione del materiale genetico di qualunque organismo.

La PCR si basa sull'attività naturale delle polimerasi, enzimi presenti in tutti gli organismi viventi, che consiste nel copiare correttamente il materiale genetico e, quando si rende necessario, di correggere gli errori di copiatura, amplificando sequenze specifiche di DNA.

Alla luce di queste considerazioni, si è deciso di studiare una metodica PCR rapida per l'identificazione, in campioni biologici umani, della *Chlamydia trachomatis* e del *Mycoplasma hominis*, due agenti patogeni piuttosto diffusi nella popolazione, ma di difficile identificazione e in grado di provocare infezioni a trasmissione sessuale, spesso asintomatiche e latenti, ma con gravi complicanze, sia nell'uomo che nella donna.

Una malattia venerea è un'infezione che si trasmette principalmente per contagio sessuale diretto, il nome, infatti, deriva dalla mitologia, ovvero da "Venere", dea dell'amore.

Queste malattie, conosciute fin dal tempo dei romani, sono state spesso fonte di forte riprovazione sociale, perché associate a comportamenti considerati immorali, atteggiamento che, in passato, ha limitato le misure necessarie a contenere l'infezione, o il ricorso alla terapia, spesso praticata in clandestinità.

Inoltre la prostituzione e la scarsa informazione hanno peggiorato la situazione favorendo, in alcuni casi, una diffusione epidemica di alcune malattie veneree.

Attualmente è noto che queste patologie sono causate dalla trasmissione di agenti patogeni (batteri, virus, parassiti o funghi) attraverso le mucose genitali.

La via principale di contagio avviene per via sessuale, e gli organi maggiormente interessati sono quelli dell'Apparato uro-genitale ma, in alcuni casi, sia per la *Chlamydia trachomatis* che per il *Mycoplasma hominis*, sono colpiti anche altri organi, provocando gravi complicanze, per trasmissione dalla madre al feto, durante la gravidanza, o al neonato durante il passaggio nel canale del parto.

Oggi nei Paesi industrializzati, l'informazione è molto più diffusa, grazie ai Media, a internet, alle campagne scolastiche e alle condizioni socio-culturali più elevate che in passato, perciò si tende a prestare maggiore attenzione a queste problematiche, c'è maggiore prevenzione e i sistemi sanitari nazionali sono impegnati nel combattere le cause che ostacolano la prevenzione e nel tentare di abbattere i pregiudizi, fortemente radicati nelle culture, allo scopo di portare il paziente dal medico, limitando così l'ulteriore diffusione dell'infezione.

La richiesta, quindi, da parte dei medici, di verificare se, nei loro pazienti, è in atto una infezione da *Chlamydia trachomatis* e/o da *Mycoplasma hominis* è sempre più frequente, soprattutto dopo rapporti a rischio, in coppie che devono sottoporsi a fecondazione assistita, in donne in gravidanza o in persone che devono essere sottoposte ad intervento chirurgico.

Lo studio dei due patogeni e di una tecnologia PCR innovativa e rapida per la diagnosi di queste infezioni si è svolto presso il Poliambulatorio Dalla Rosa Prati di Parma, in collaborazione con la ditta Euroclone-Finnzymes, che ha fornito la tecnologia, i reagenti e i materiali di consumo.

Il Poliambulatorio Dalla Rosa Prati ha inaugurato nel 2008 la nuova sede alle porte di Parma, dotato di un laboratorio di analisi con le specialità di microbiologia e biologia molecolare, oltre alla biochimica clinica.

La realizzazione di questa nuova struttura, all'avanguardia in campo medico, mi ha visto protagonista nello studio della normativa vigente e nella sua applicazione, in stretta collaborazione con il Direttore Sanitario e la Direttrice Tecnica del Laboratorio, nell'allestimento del settore di biologia molecolare in cui avrei poi operato.

Pertanto il progetto di ricerca ha avuto i seguenti obiettivi:

1. studio e applicazione della normativa regionale per l'Accreditamento Istituzionale di Strutture Sanitarie e della norma per la gestione della qualità UNI EN ISO 9001/2008, per l'ottenimento delle relative certificazioni,
2. progettazione e realizzazione del laboratorio di biologia molecolare,
3. stesura del manuale della qualità, dell'accREDITamento e delle relative procedure operative per la gestione dei processi del laboratorio per le tre aree di biochimica clinica, di microbiologia e di biologia molecolare,
4. studio degli agenti patogeni *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*, delle loro caratteristiche biologiche e genetiche;
5. messa a punto, validazione e applicazione di metodiche diagnostiche molecolari rapide, competitive e di semplice interpretazione per l'identificazione di tali patogeni da campioni biologici umani;
6. studio e verifica dell'applicabilità della metodica PCR rapida anche alla sensibilità/resistenza agli antibiotici dei patogeni oggetto dello progetto.

# IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

La normativa per l'Accreditamento di Strutture Sanitarie al Servizio Sanitario della Regione Emilia Romagna e quella della UNI EN ISO 9001/2008 sono estremamente rigorose, soprattutto per quanto riguarda la gestione e l'organizzazione dei laboratori di analisi, in particolar modo per il laboratorio di biologia molecolare che deve rispettare requisiti strutturali specifici. Deve essere presente un'area sporca, una zona filtro (per evitare contaminazioni), una zona pulita e il percorso di campioni e operatori deve essere a senso unico.

Il percorso dei campioni segue le seguenti fasi: accettazione, fase analitica, refertazione e controllo.

Tale organizzazione prevede una gestione del laboratorio mediante l'applicazione di una serie di procedure operative scritte, facilmente reperibili e verificabili, firmate dal redattore, dal responsabile della qualità e dal responsabile della struttura per:

- l'accettazione dei campioni biologici,
- il loro trasporto da un reparto all'altro,
- il trattamento degli stessi secondo metodiche definite e utilizzando materiali certificati,
- la gestione delle attrezzature,
- la pulizia/sterilizzazione degli ambienti e delle superfici,
- la valutazione del rischio chimico e biologico e il conseguente utilizzo di dispositivi di protezione individuale (DPI) specifici,
- l'approvvigionamento: selezione dei fornitori e regolamentazione per il trasporto e la conservazione di materiali e reagenti,
- la conservazione e la corretta etichettatura di reagenti e campioni per garantirne la tracciabilità e il monitoraggio,
- le modalità e le responsabilità per la refertazione.

### Fase analitica:

Di fondamentale importanza è il monitoraggio quotidiano delle apparecchiature: si devono tenere i registri dove riportare le temperature di frigoriferi, congelatori e incubatori, al fine di garantire la corretta conservazione di campioni e reagenti. Questo è stato applicato inserendo negli strumenti delle sonde digitali che registrano in continuo la temperatura, segnalando eventuali alterazioni.

La registrazione di ogni trattamento, praticato al campione, consente la verifica di eventuali contaminazioni/problematiche insorte e l'identificazione della fase critica, per garantire la qualità delle procedure e la corretta etichettatura del campione in tutte le fasi del trattamento, consentendone la tracciabilità e rintracciabilità.

Per questi motivi è necessario tenere i registri per tutte le fasi del processo:

- manutenzione ordinaria e straordinaria di tutte le apparecchiature,
- ordini di materiali e "carico e scarico",
- tutti i campioni in entrata nel laboratorio e quelli eventualmente rifiutati,
- tutti i trattamenti eseguiti e le metodiche utilizzate per l'analisi,
- i reagenti e i materiali preparati in laboratorio devono essere facilmente identificabili e devono riportare la descrizione del prodotto, la concentrazione, la data di preparazione e di scadenza, le indicazioni di pericolo e il nome del preparatore,
- eventuali ripetizioni di una o più fasi analitiche e delle cause di tale ripetizione.

Sulla base di queste registrazioni, periodicamente si svolgono verifiche ispettive interne con l'eventuale segnalazione di non-conformità e le relative azioni correttive.

Le nuove metodologie analitiche, prima di essere inserite nella routine, devono essere validate sulla base di:

- scostamento sistematico rispetto a valori noti di riferimento,
- riproducibilità nella serie e tra le serie.

Il laboratorio deve assicurare, mediante modalità di calibrazione e/o materiali di calibrazione adeguati, la concordanza con i valori di riferimento dei propri risultati; quando non è possibile occorre dimostrare l'affidabilità dei risultati forniti.

Devono essere definiti la frequenza, i metodi, i materiali di calibrazione, la loro adeguatezza per ogni analita, e l'evidenza documentale deve essere conservata per un periodo di tempo di almeno un anno.

Il laboratorio deve definire un sistema di controllo della fase analitica per individuare gli errori ai fini del risultato, che deve prevedere un controllo di qualità interno (CQI) e un controllo di qualità esterno (VEQ). Il CQI deve essere eseguito, se la procedura lo richiede, per tutti gli analiti, e devono essere definiti: la frequenza di esecuzione, le concentrazioni del controllo, i modelli di elaborazione e di validazione adeguati alla complessità delle analisi e i "traguardi analitici" da raggiungere. Inoltre, deve esistere la registrazione documentata dell'effettiva esecuzione e validazione dei risultati e l'evidenza di programmi di VEQ eseguiti per gli analiti che lo richiedono e di valutazione con eventuali azioni correttive.

Il laboratorio deve anche definire i criteri che descrivono l'accettabilità e la validazione dei dati analitici e le relative responsabilità.

### Refertazione:

Di notevole importanza è anche la gestione della refertazione:

- i referti devono essere compilati in modo tale da essere facilmente comprensibili e interpretabili; devono contenere tutte le informazioni necessarie (identificazione anagrafica del paziente, nome del laboratorio, data del campione e del referto, denominazione dell'analisi, risultato, unità di misura, intervallo di riferimento, evidenza del dato patologico),
- devono prevedere tutte le possibili variabilità dovute ad età, sesso, gravidanza o altri eventi significativi che possono interagire con i risultati e/o gli indici di riferimento,
- deve essere previsto uno spazio per eventuali note esplicative;
- il referto non deve presentare correzioni o segni non convenzionali; se fosse necessaria una correzione, dovrebbe riportare la validazione con l'apposizione della firma leggibile di chi l'ha apportata. La forma originale deve essere comunque visibile.

### Controllo:

Deve essere previsto un controllo sistematico su tutto il processo di gestione del laboratorio che comprende:

- registrazione di dati relativi a situazioni particolari che risultano non conformi a quanto stabilito dalle procedure (richieste, campioni, analisi, risultati, ecc..),
- registrazione di tutti i reclami dei pazienti che evidenziano il mancato rispetto dei requisiti di qualità definiti dal laboratorio,
- pianificazione di verifiche ispettive e audit interni,
- evidenza che le informazioni, derivanti dal controllo sistematico, servano a individuare i punti critici su cui si rende necessario intervenire mediante trattamenti, azioni preventive o correttive;
- evidenza dei momenti sistematici di revisione dell'intero processo, tramite l'analisi dei dati e delle informazioni raccolte, allo scopo di proporre azioni di "miglioramento" del sistema.

I punti sopradescritti corrispondono ai requisiti per l'ottenimento dell'accreditamento sanitario istituzionale e della certificazione di qualità.

L'applicazione di tali requisiti risulta piuttosto complessa e non è quindi semplice l'organizzazione di un laboratorio diagnostico che rispetti costantemente tali procedure; per tanto nella progettazione di un nuovo laboratorio tali requisiti vanno presi in considerazione a priori, per evitare di dover stravolgere le strutture esistenti e le procedure operative.

Il lavoro di progettazione e di attivazione del laboratorio ha richiesto quasi un anno di lavoro e studi costanti, che hanno permesso al Poliambulatorio Dalla Rosa Prati di superare positivamente la visita da parte della commissione giudicatrice della Regione Emilia Romagna per l'Accreditamento Istituzionale e di ottenere nell'Ottobre del 2009 la Certificazione UNI EN ISO 9001/2000 e la costante applicazione delle procedure ha fatto sì di ottenere nell'Ottobre 2010 la Certificazione di Qualità UNI EN ISO 9001-2008.

Queste certificazioni sono dei traguardi importanti per un centro di nuova istituzione, sorto in un periodo di crisi economica mondiale, oltre che un ottimo corollario al periodo di studio e di ricerca da me svolto.

# CHLAMYDIA TRACHOMATIS

## 1. CLASSIFICAZIONE

- **Regno:** *Bacteria*
- **Phylum:** *Chlamydiae*
- **Classe:** *Chlamydiae*
- **Ordine:** *Chlamydiales*
- **Famiglia:** *Chlamydiaceae*
- **Genere:** *Chlamydia*
- **Specie:** *Chlamydia trachomatis*

Dal database NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

I batteri che appartengono all'ordine *Chlamydiales* sono parassiti intracellulari obbligati di cellule eucariotiche.

Nel 1999 questo ordine è stato riclassificato tassonomicamente e ora comprende una vasta gamma di batteri Gram-negativi in base alla omologia delle sequenze nucleotidiche (prevalentemente RNA ribosomale) e delle loro due fasi del ciclo di replicazione (Everett et al., 1999).

L'ordine *Chlamydiales* è ora suddiviso in quattro famiglie, *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Waddliaceae* e *Simkaniaceae*.

La famiglia *Chlamydiaceae* è stata suddivisa nei generi *Chlamydia* e *Chlamydophila* (nel senso Chlamydia-like), che hanno una discendenza evolutiva comune, iniziata circa 2 miliardi di anni fa, il che li rende unici rispetto ad altri tipi di batteri.

Le *Chlamydiae* sono una delle cause più frequenti di malattie sessualmente trasmissibili (MST) che, se non trattate, possono provocare infertilità nelle donne. Sono trasmesse per contatto diretto o aerosol, e possono causare varie malattie, pur essendo anche in grado di coesistere con l'ospite in uno stato apparentemente asintomatico.

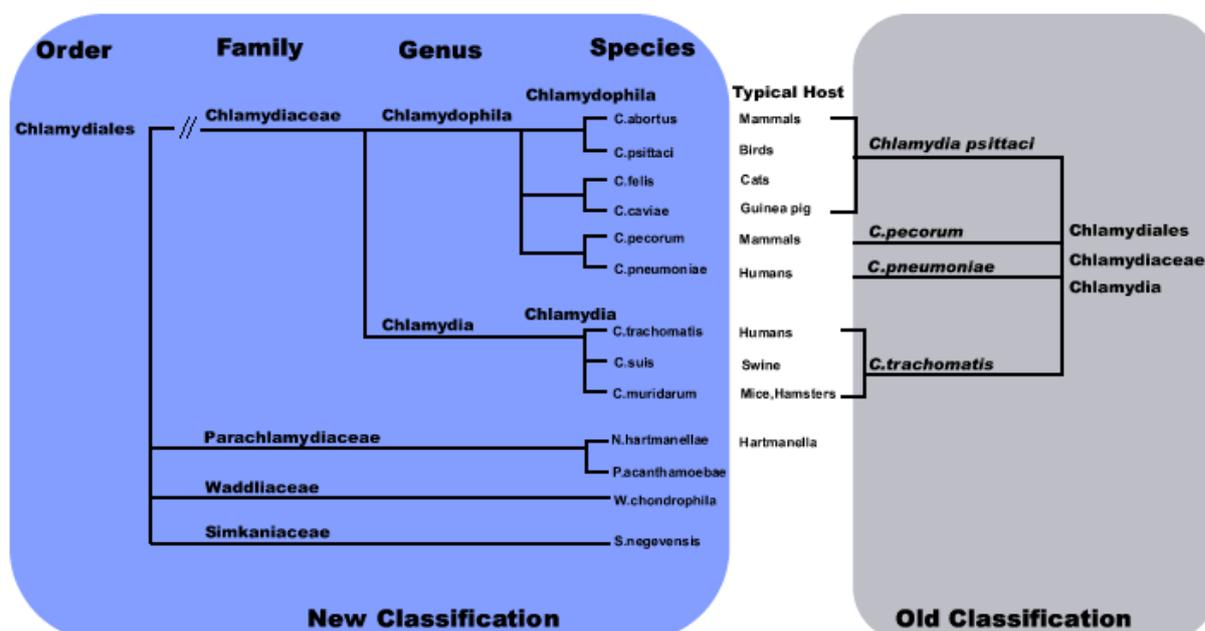


Fig.1

Adapted from: Bush, R.M. and Everett, K.D.E. (2001). *Molecular Evolution of the Chlamydiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 203 - 220.

## 2. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE

La *Chlamydia trachomatis* è un batterio Gram-negativo, intracellulare obbligato, che sopravvive e si replica in un fagosoma batterico-modificato chiamato inclusione

L'involucro esterno è costituito da una componente lipopolisaccaridica (LPS) e da una proteina denominata MOMP (Major Outer Membrane Protein) con probabile funzione di "porina". Questi batteri hanno una parete cellulare rigida con peptidoglicano sostituito da proteine ricche di cisteina, tale rigidità è data da ponti disolfuro tra le molecole MOMP e residui di cisteina nella molecola proteica.

Come altri parassiti intracellulari, questi batteri sovvertono il percorso fagocitario per evitare il degrado in fagolisosomi e sfruttare le vie di traffico per l'acquisizione sia di energia che di nutrienti essenziali per la loro sopravvivenza, perché non sono in grado di produrre autonomamente energia (non producono ATP, ma utilizzano quello della cellula infettata).

La *Chlamydia trachomatis* ha un particolare tropismo per l'epitelio della mucosa genitale e oculare ed è l'agente eziologico delle più diffuse malattie veneree genito-urinarie e può causare cecità negli esseri umani, a seconda del sierotipo responsabile dell'infezione.

### Esistono 17 sierotipi:

I sierotipi A, B, Ba e C sono gli agenti causa del tracoma (non a trasmissione sessuale) frequente nei bambini.

I sierotipi D, Da, E, F, G, H, I, Ia, Ja e K sono responsabili di malattie sessualmente trasmissibili e oculari. In particolare i sierotipi D-K causano nell'uomo uretriti, nella donna cerviciti, salpingiti e infezioni pelviche (PID), gravidanze extra-uterine, aborto. Nel neonato, di madre infetta, l'infezione contratta durante il parto può causare congiuntivite o polmonite interstiziale.

I sierotipi L1, L2 e L3 sono la causa del linfogranuloma venereo. Questi sierotipi possono attraversare le cellule epiteliali delle mucose e quindi diffondere attraverso il sistema linfatico dove si moltiplicano all'interno dei fagociti mononucleari presenti all'interno dei linfonodi.

| SIEROTIPI                              | MALATTIE UMANE              | TRASMISSIONE                                  | PATOLOGIA   |
|--|-----------------------------|---|---|
| <b>A, B, Ba, C</b>                     | Tracoma oculare             | contatto con materiali, mani, lacrime infetti | congiuntiviti, cicatrici congiuntivali e corneali   |
| <b>D, Da, E, F, G, H, I, Ia, Ja, K</b> | Malattie oculari e genitali | sessuale e perinatale                         | cerviciti, uretriti, endometriti, malattia infiammatoria pelvica, infertilità, gravidanza ectopica, congiuntiviti e polmoniti neonatali |
| <b>L1, L2, L3</b>                      | Linfogranuloma venereo      | sessuale                                      | invasione sotto-mucosa e dei linfonodi, con necrosi, granulomi e fibrosi  |

Tab. 1 Sierotipi di *Chlamydia Trachomatis*

### 3. MORFOLOGIA E ORGANIZZAZIONE GENOMICA

*La Chlamydia trachomatis* possiede un genoma circolare a DNA costituito da circa 1.044.352 nucleotidi, di cui l'88% è codificante e completamente sequenziato dal "Progetto Genoma".

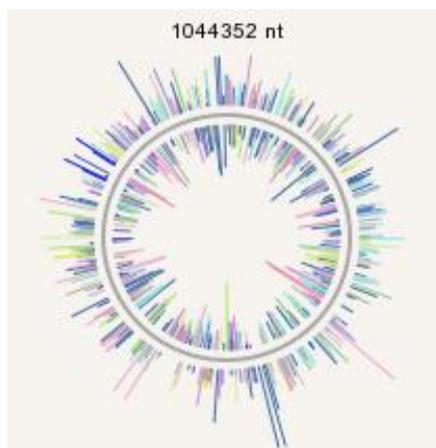


Fig.2 Genoma di *Chlamydia Trachomatis*

Dal sito NCBI (National Center for Biotechnology Information) sono stati tratti i dati relativi al genoma di *Chlamydia trachomatis*:

| Genome Info:                      | Features:                           | BLAST homologs:         | Links:  | Review Info:   |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---|--|
| Refseq: <a href="#">NC_012686</a> | Genes: <a href="#">936</a>          | COG                     | <a href="#">Genome Project</a>                | Publications: <a href="#">[1]</a>                                  |
| GenBank: <a href="#">FM872308</a> | Protein coding: <a href="#">875</a> | <a href="#">TaxMap</a>  | <a href="#">Refseq FTP</a>                    | Refseq Status: PROVISIONAL   |
| Length: 1,044,352 nt              | Structural RNAs: <a href="#">43</a> | <a href="#">TaxPlot</a> | <a href="#">GenBank FTP</a>                   | Seq. Status: Completed   |
| GC Content: 41%                   | Pseudo genes: 18                    | GenePlot                | <a href="#">BLAST</a>                         | Sequencing center: <a href="#">Wellcome Trust Sanger Institute</a> |
| % Coding: 88%                     | Others: 18                          | <a href="#">gMap</a>    | TraceAssembly                                 | Completed: 2009/05/19  |
| Topology: circular                | Contigs: None                       |                         | <a href="#">CDD</a>                           | Organism Group   |
| Molecule: DNA                     |                                     |                         | Other genomes for species: <a href="#">11</a> |  |

Fig.3 Tabella riassuntiva, genoma di *Chlamydia trachomatis*

*La Chlamydia trachomatis* possiede anche diversi plasmidi, alcuni già completamente sequenziati (pSW3, pSW2, pJALI, pCTB, pSW5 pSW4 pCTA), altri ancora in corso di studio.

### 4. MODALITÀ DI INFEZIONE E RISPOSTA IMMUNITARIA

I meccanismi fisiopatologici dell'infezione da parte di Clamidia sono poco conosciuti.

La risposta iniziale all'infezione delle cellule epiteliali consiste in un'infiltrazione di neutrofili, seguiti da linfociti, macrofagi, cellule del plasma e di eosinofili.

Il rilascio di citochine e interferoni da parte della cellula epiteliale infetta dà inizio alla cascata infiammatoria.

L'infezione da Clamidia stimola una risposta umorale delle cellule, con la produzione conseguente di immunoglobuline secretorie A (IgA), circolatorie M (IgM), immunoglobuline G (IgG) e una risposta immunitaria cellulare.

Da studi recenti sembra che sia coinvolta, nella risposta immunitaria, una proteina della membrana esterna (MOMP) di 40-kd, e proteine heat-shock (Chsp) di *Chlamydia* da 10 e 60 kd, ma sono in corso ulteriori studi per comprendere meglio questi meccanismi di risposta cellulare-mediata.

*La Chlamydia trachomatis* ha un ciclo vitale dimorfico [Fig. 4]: i CORPI ELEMENTARI (EB) infettanti, per la sopravvivenza extracellulare e i CORPI RETICOLARI (RB) non infettanti, per la replicazione intracellulare.

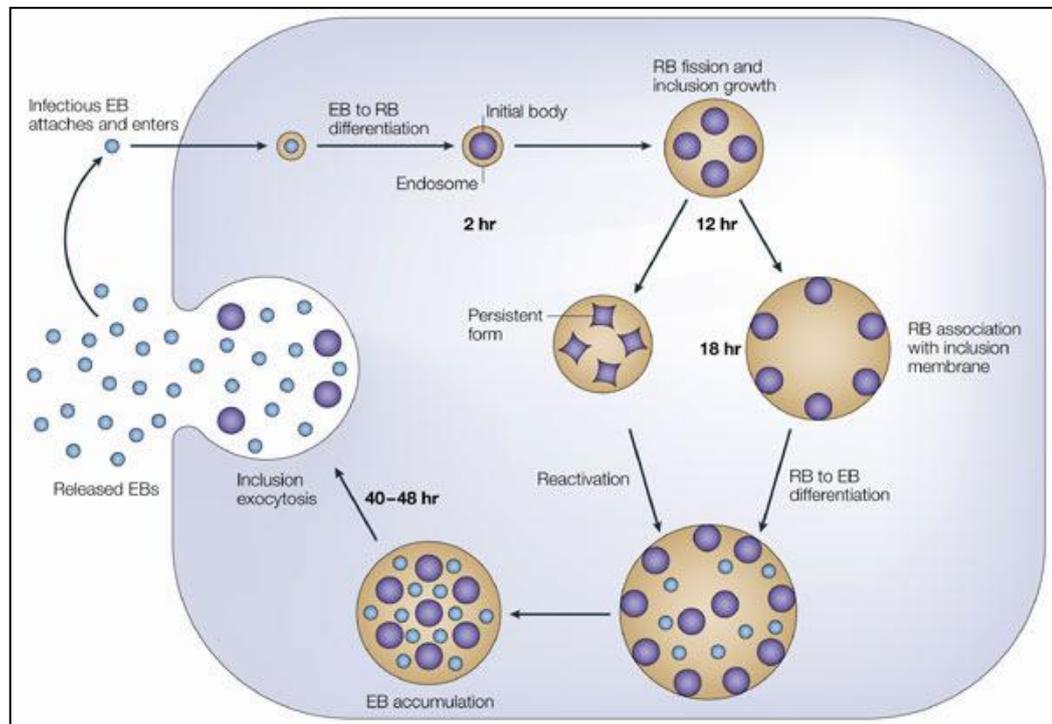


Fig. 4 Brunham R.C., Rey-Ladino J. (2005)- "Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine" Nature Reviews Immunology 5, 149-161

Il corpo elementare (punti azzurri nella Figura 4) è uno stadio infettivo, ma metabolicamente inattivo, con il quale *Chlamydia trachomatis* infetta le cellule epiteliali della mucosa (uro-genitale e/o oculare).

Il corpo elementare è piccolo, tondeggiante e denso; riconosce i recettori presenti sulla superficie delle cellule epiteliali della mucosa mediante il legame delle MOMP e penetra nella cellula mediante "endocitosi selettiva per il parassita".

Il corpo elementare penetra nella cellula all'interno di un fagosoma e inibisce la sua fusione con i lisosomi cellulari, impedendo così la lisi intracellulare.

All'interno dell'inclusione, dopo circa 6-8 ore, i corpi elementari si idratano, si accrescono e si differenziano in corpi reticolari (RB), metabolicamente attivi (punti viola nella Figura 4).

I corpi reticolari all'interno dell'inclusione sintetizzano DNA, RNA e proteine utilizzando l'ATP della cellula e si dividono per scissione binaria, accumulandosi all'interno dell'inclusione (visibili al microscopio ottico).

Nell'arco di 24-48 ore, i corpi reticolari si differenziano in corpi elementari infettivi, che vengono successivamente rilasciati per autolisi, e infettano le cellule vicine.

In presenza di inibitori della crescita, come l'interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ), questi batteri possono acquisire una forma persistente, non-replicativa e non-infettiva e, dopo la rimozione del inibitore, sono in grado di riattivarsi nuovamente ritornando infettivi (EB).

L'interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ), prodotto dalle cellule T dell'uomo, induce l'espressione di indoleamine-2,3-diossigenasi (IDO) cellulare che degrada il triptofano, riducendone i livelli intracellulari.

La carenza di tale aminoacido porta alla morte della *Chlamydia*. Si è visto che una popolazione di *Chlamydia spp.*, nello stadio di corpo reticolato (RB), risponde alla mancanza di triptofano con l'acquisizione di una forma persistente non-replicativa, ma vitale.

Dopo la rimozione di IFN- $\gamma$  e l'aumento di triptofano, le forme persistenti si ridifferenziano rapidamente in corpi elementari (EB) infettivi.

Alcuni ceppi di *Chlamydia spp.* (sierotipi genitali) hanno adottato un sistema di difesa, basato su una triptofano-sintasi funzionale che può utilizzare indolo per sintetizzare triptofano e quindi bypassare il meccanismo di latenza [Fig. 5].

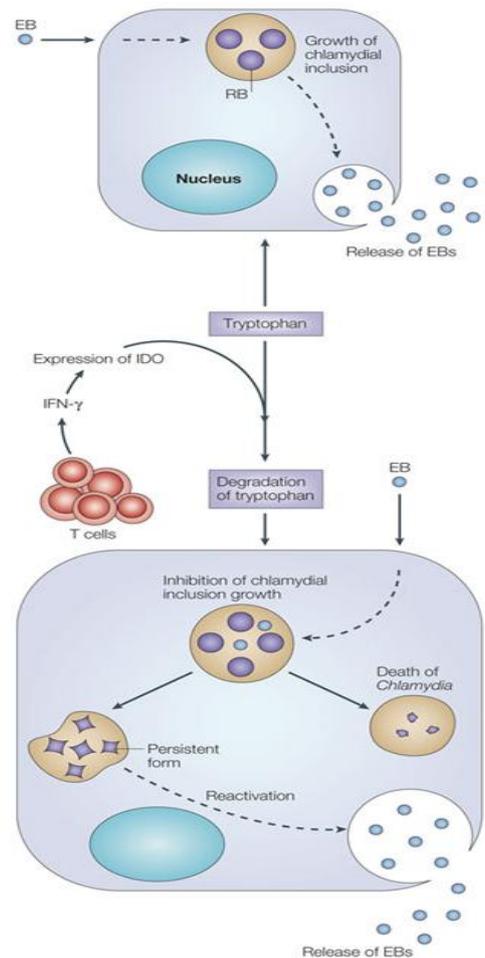


Fig. 5. Brunham R.C., Rey-Ladino J. (2005)- "Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine" Nature Reviews Immunology 5, 149-161

## **5. PATOLOGIE CORRELATE E MANIFESTAZIONI CLINICHE**

Dal sito del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (EPICENTRO)

Le malattie causate da *Chlamydia trachomatis* tendono a cronicizzare, perché non sono in grado di provocare una risposta immunitaria del tutto efficace.

Le infezioni croniche possono essere responsabili di diverse patologie come la malattia infiammatoria pelvica, la gravidanza ectopica e l'infertilità femminile.

Nel sesso maschile può causare un'epididimite sintomatica e, raramente, un danno permanente, anche se alcuni studi segnalano una possibile correlazione tra l'infezione da *Chlamydia* la sterilità maschile. Le complicanze più serie sono rare, come la sindrome di Reiter, una forma di artrite sieronegativa accompagnata da lesioni epidermiche e infiammazione all'uretra e agli occhi. Negli uomini la sintomatologia può limitarsi a sensazione d'irritazione, di prurito o a secrezioni e raramente a casi gravi di orchite.

L'infezione da *Chlamydia* è asintomatica in oltre il 70% delle donne e nel 50% degli uomini.

Le manifestazioni cliniche compaiono da una a tre settimane dopo l'infezione, interessando, nelle donne, la cervice uterina e l'uretra, con conseguenti perdite vaginali anomale e una fastidiosa sensazione d'irritazione; l'infezione può progredire in forma settica, provocando, dolori addominali, al dorso, al basso ventre, nausea, febbre e perdite ematiche anche al di fuori del ciclo mestruale; dalla cervice, l'infezione può eventualmente diffondere al retto.

### **SINDROME DI REITER:**

E' caratterizzata da una uretrite non batterica che compare 7-14 giorni dopo un contatto sessuale, ed è seguita, dopo alcune settimane, da febbre, congiuntivite e artrite. La sindrome di Reiter si risolve, generalmente, in alcuni mesi ma, in circa la metà dei pazienti, può cronicizzare con esiti più o meno gravi.

**TRACOMA:** (dal greco antico "occhio ruvido") è una infezione batterica della congiuntiva e della cornea, causata da *Chlamydia trachomatis*.

I primi sintomi si manifestano con arrossamento, fotosensibilità, forti bruciori, lacrimazione e gonfiore delle palpebre. In poche settimane i follicoli congiuntivali s'infiammano e i vasi capillari invadono la cornea, conducendo a congiuntivite muco-purulenta che evolve in cherato-congiuntivite follicolare, con tendenza alla cicatrizzazione, retrazione interna della rima palpebrale, lesioni corneali e cecità. La deformità della palpebra può svilupparsi anche 20-30 anni dopo che è cessata la malattia attiva.

Il tracoma è endemico in Africa, Medio-Oriente e Sud-Est Asiatico dove il principale serbatoio d'infezione sono i bambini, in quanto si trasmette prevalentemente attraverso le lacrime, la mani, indumenti contaminati e da insetti come le mosche, specialmente nelle aree povere, con igiene carente e scarsità di acqua potabile.

Nelle aree endemiche *C. trachomatis* si riscontra anche a livello respiratorio e gastrointestinale, con trasmissione anche per aerosol respiratorio e contaminazione fecale.

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), nel mondo oltre 150 milioni di bambini sono stati infettati e rischiano di diventare completamente ciechi.

### INFEZIONI GENITALI NELL'UOMO:

- uretrite non gonococcica (NGU)
- uretrite post gonococcica (PGU)
- congiuntivite da inclusioni (o da corpi inclusi o paratrachoma)

L'uretrite post-gonococcica risulta da una coinfezione di *Neisseria gonorrhoeae* con *Chlamydia trachomatis*. Siccome il periodo di incubazione di *Chlamydia* è più lungo di quello di *Neisseria* i sintomi dell'infezione da *Chlamydia* compaiono dopo il trattamento della gonorrea.

### INFEZIONI GENITALI NELLA DONNA:

- infezione genitale ascendente
- uretrite asintomatica
- cervicite
- endometrite
- salpingite (causa di infertilità)
- malattia infiammatoria pelvica (MIP/PID, Pelvic Inflammator Disease)
- periepatite

Nella donna le infezioni sono per lo più asintomatiche e quindi cronicizzano facilmente.

### IN GRAVIDANZA:

L'infezione da *Chlamydia trachomatis* in gravidanza è associata a complicazioni quali:

- ritardo di crescita intrauterina
- parto pretermine
- rottura prematura delle membrane
- endometrite post-partum.

L'infezione non trattata è stata associata ad aumentata frequenza di neonati di basso peso alla nascita e morte neonatale.

### INFEZIONI NEL NEONATO:

- congiuntivite: viene contratta al passaggio attraverso il canale del parto da circa il 25% dei nati da madri con infezione genitale attiva: dopo 5-12 giorni d'incubazione, la rima palpebrale diventa edematosa ed iperemica con abbondante secrezione purulenta
- polmonite interstiziale: viene contratta al passaggio attraverso il canale del parto da circa il 10-20 dei nati da madri con infezione genitale attiva: incubazione di 2-3 settimane dalla nascita, alla rinite segue comparsa di una tosse caratteristica senza rialzo febbrile.

### LINFOGRANULOMA VENEREO:

- Malattia a trasmissione sessuale
- Replicazione delle Clamidio nei fagociti mononucleati del sistema linfatico
- Inizia con la comparsa di ulcera o papula a livello genitale
- Infiammazione granulomatosa dei linfonodi regionali
- Formazione di fistole e retrazioni cicatriziali.

•

## 6. EPIDEMIOLOGIA

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che ogni giorno si verificano, nella popolazione mondiale, compresa tra i 15 e i 49 anni, tra il milione e il milione e mezzo di casi di infezioni sessualmente trasmesse (IST) curabili, quali quelle causate da: *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*. Questo batterio è la principale causa di cecità nel mondo.

In Italia si è calcolato circa un milione di soggetti infetti da *Chlamydia trachomatis*, con una percentuale di trasmissione del 60-70%.

Si stimano, a livello mondiale, circa 92 milioni di casi di infezione da *Chlamydia trachomatis* all'anno; per tanto risulta essere l'infezione a trasmissione sessuale batterica più diffusa al mondo, e la sua incidenza è maggiore nel sesso femminile rispetto a quello maschile, al contrario delle altre malattie a trasmissione sessuale.

Più di due terzi di questi casi si verificano nei Paesi in via di sviluppo, dove le condizioni igieniche sono carenti, le fonti di acqua potabile sono scarse e i servizi diagnostici e terapeutici sono quasi assenti.

L'infezione da *Chlamydia trachomatis* è spesso asintomatica (circa l'80% delle donne e il 40% degli uomini) e di conseguenza spesso non è trattata, con gravi ripercussioni sulla fertilità e le condizioni riproduttive nelle in entrambi i sessi.

Dal 10 al 40% delle donne con infezione non trattata sviluppano la malattia infiammatoria pelvica (Pelvic Inflammatory Disease, PID) che può condurre alla sterilità.

Soprattutto i paesi in via di sviluppo hanno un'alta incidenza di nuove infezioni da Clamidia, ma è alta anche nei Paesi industrializzati, prevalentemente nei soggetti a rischio come le prostitute (tra l'8,5% e il 37,0% a seconda dei Paesi e delle Nazionalità).

In alcuni paesi industrializzati stanno iniziando programmi nazionali di screening, per la popolazione ad alto rischio, ma sono inesistenti nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo. La maggiore limitazione dei programmi di screening è la mancanza di test efficaci semplici e di basso costo.

La localizzazione intracellulare del batterio crea un'ulteriore sfida per la diagnosi di routine, ancora più difficile nei pazienti asintomatici e nelle infezioni croniche o persistenti, quando la carica batterica è più bassa. La grande quantità di persone infette ma asintomatiche non solo rischiano di sviluppare gravi complicanze a lungo termine, ma anche di trasmettere l'infezione.

## **7. MISURE DI CONTROLLO E PREVENZIONE**

*I dati e parte dei testi riportati di seguito sono stati ricavati dal sito internet dell'Istituto Superiore della Sanità (ISS), dal "Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità - Volume 23 - Numero 10 - Ottobre 2010 - ISSN 0394-9303*

(Ct: *Chlamydia Trachomatis*, Tv: *Trichomonas Vaginalis*, Ng: *Neisseria gonorrhoeae*)

Le malattie sessualmente trasmissibili (IST) comprendono un gruppo di malattie infettive ad elevata morbosità e che comportano elevati costi assistenziali.

Nei Paesi occidentali sembravano sotto controllo, ma dagli inizi del secolo tali infezioni hanno fatto registrare, anche in Europa, un notevole incremento.

In seguito a questo incremento, agli inizi del 2000, l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) ha raccomandato, agli Stati membri dell'Unione Europea, di implementare e migliorare i sistemi di sorveglianza epidemiologica delle infezioni sessualmente trasmissibili, affiancando delle reti di laboratori, a elevato standard operativo, alle reti di segnalazione dei nuovi casi basate sui centri clinici, in modo da raccogliere il maggior numero di dati sulla circolazione e la trasmissione di queste infezioni, che nella maggior parte dei casi sono asintomatiche.

La risposta italiana a questa raccomandazione è avvenuta nel 2008 da parte dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che, in collaborazione con il Gruppo di Lavoro "Infezioni Sessualmente Trasmesse" (GLIST) dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI), ha avviato un programma di sorveglianza epidemiologica delle infezioni da *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, basato sulla segnalazione dei nuovi casi di infezione da parte di una rete sentinella costituita da 13 laboratori distribuiti sul territorio italiano.

Il programma ha lo scopo di fornire dati attendibili sulle tre infezioni soprattutto per: pianificare interventi ed azioni di sanità pubblica; migliorare la collaborazione tra i laboratori di riferimento, promuovendo la standardizzazione delle procedure diagnostiche; promuovere la collaborazione tra i laboratori italiani e altri laboratori europei.

I dati raccolti durante questo programma verranno utilizzati per:

- analizzare e interpretare gli andamenti delle infezioni nel tempo, relativamente a specifiche aree geografiche e a particolari caratteristiche socio-demografiche;
- identificare i fattori di rischio associati;
- promuovere attività di miglioramento di qualità delle procedure di diagnosi;
- promuovere programmi, anche locali, di controllo e prevenzione;
- predisporre interventi di supporto e di allocazione mirata di risorse finanziarie per la diagnostica e la prevenzione. "

La sorveglianza è stata ufficialmente attivata il 1° aprile 2009, arruolando 13 laboratori di microbiologia a elevato standard clinico-diagnostico, dislocati sull'intero territorio nazionale. I laboratori segnalano i soggetti che effettuano un test per la ricerca di una o più delle tre infezioni previste dalla sorveglianza, sia che risultino positivi che negativi all'identificazione del patogeno. Per ogni individuo i laboratori possono segnalare l'eventuale identificazione anche di più di un patogeno, e raccolgono alcuni dati demografici, clinici e comportamentali.

Dal 1° aprile 2009 al 31 agosto 2010 i laboratori hanno segnalato 28.948 campioni, analizzati per un'indicazione di approfondimento diagnostico per almeno una delle tre infezioni.

L'88,3% (n. 25.565) degli individui da cui sono stati prelevati i campioni era costituito da donne e il 12,3% da stranieri. Il 50,9% degli individui presentava sintomi genito-urinari al momento del prelievo del campione, il 77,1% riferiva di non aver utilizzato nessun metodo contraccettivo negli ultimi 6 mesi e il 28,1% delle donne era in gravidanza. Il 95,2% dei soggetti dichiarava di aver avuto un solo partner sessuale negli ultimi 6 mesi e nel 98,3% dei casi questo partner era un partner stabile. Delle 28.948 determinazioni totali, 25.706 (88,8%) sono state quelle mirate alla ricerca di Tv, 22.108 (76,4%) alla ricerca di Ct e 16.816 (58,1%) alla ricerca di Ng.

Le prevalenze più elevate sono state osservate tra gli uomini sintomatici (57,6% degli uomini), sia per l'infezione da Ct (11,8%) che da Ng (2,5%), e tra le donne sintomatiche (50,1% delle donne) per l'infezione da Ct (3,0%) e da Tv (1,0%). Di tutte le donne positive alla Ct più di un terzo (38,7%) non presentava sintomi genito-urinari al momento del prelievo del campione.

In particolare, per l'infezione da Ct si è osservata una prevalenza significativamente più elevata (p-value < 0,001) nei soggetti che avevano dichiarato due o più partner sessuali negli ultimi sei mesi rispetto a chi ne aveva dichiarato uno o nessuno (17,4% vs 2,3%); nei soggetti con età compresa tra i 15 e i 24 anni rispetto ai soggetti con età uguale o maggiore a 25 anni (7,9% vs 2,4%); e nei soggetti che avevano sintomi genitourinari al momento del prelievo del campione rispetto a chi non li presentava (4,3% vs 2,1%).

Non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra gli italiani e gli stranieri per le prevalenze di infezione da Ct e da Ng; mentre la prevalenza dell'infezione da Tv è risultata statisticamente più elevata tra gli stranieri rispetto agli italiani (1,5% vs 0,5%, p-value < 0,001).

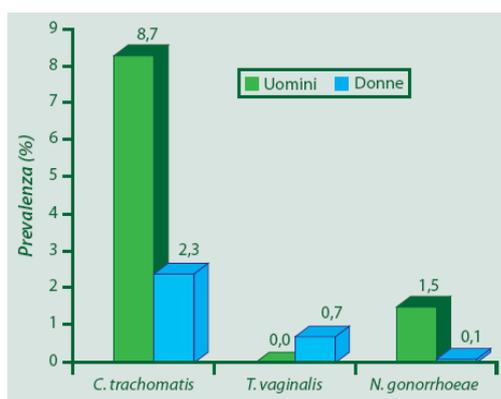


Fig.6: istogramma della prevalenza per sesso delle tre infezioni: *Chlamydia trachomatis* è l'infezione maggiormente diffusa e con un'incidenza maggiore nel sesso maschile rispetto a quello femminile.

(Sorveglianza sentinella delle IST basata su laboratori, aprile 2009-agosto2010)

Di recente sono state proposte delle linee guida per prevenire la trasmissione del patogeno attraverso l'inseminazione artificiale, in considerazione dell'alta prevalenza di infezione da *C. trachomatis* nei donatori di sesso maschile.

L'European Society for Human Reproduction and Embryology e l'American Society for Reproductive Medicine sostengono che il test per l'identificazione di *C. trachomatis* dovrebbe essere sempre effettuato tra i test di screening in campioni uretrali, di urine e sperma (American Society for Reproductive Medicine,1998; Baratt et al., 1998).

Il metodo più sicuro per evitare di acquisire le malattie sessualmente trasmesse è di:

- evitare contatti sessuali a rischio,
- avere una relazione monogama a lungo termine con un partner riconosciuto non infetto.

I preservativi maschili di lattice, quando usati sempre e correttamente, possono ridurre il rischio di trasmissione di *Chlamydia trachomatis*.

Uno screening annuale per *Chlamydia trachomatis* è raccomandato per :

- tutte le donne sessualmente attive fino ai 25 anni;
- le donne di età superiore con fattore di rischio per *Chlamydia trachomatis* (partner sessuale nuovo, più partners sessuali o rapporti a rischio).

Tutte le donne in gravidanza dovrebbero sottoporsi allo screening per *C. trachomatis*.

La comparsa di sintomi genitali dovrebbe essere motivo di interruzione dell'attività sessuale e di immediata consultazione di uno specialista.

Nel caso in cui una persona venga trovata infettata da *C. trachomatis*, o da un'altra malattia sessualmente trasmissibile, dovrebbe immediatamente avvisare tutti i partners sessuali recenti per consentire che anch'essi siano visitati e eventualmente trattati, in modo da ridurre il rischio di complicazioni oltre che ridurre il rischio personale di essere reinfettati. Il/la paziente e tutti i suoi partners sessuali dovrebbero astenersi dall'attività sessuale sino al termine della terapia per *Chlamydia trachomatis*.

Ripetute infezioni aumentano il rischio per la donna di gravi complicazioni riproduttive, o di infertilità. Deve essere ripetuto il test per la ricerca di *C. trachomatis* 3-4 mesi dopo il trattamento.

Una relazione sessuale con un partner non infetto è un modo per evitare le infezioni. Anche l'uso appropriato del preservativo durante il rapporto sessuale può prevenire l'infezione.

La prevenzione nei Paesi in via di sviluppo può avvenire col miglioramento delle condizioni igieniche delle popolazioni colpite o con la lotta contro gli insetti vettori (moscerini e mosche) ed è importante evitare i contatti diretti tra individui infetti e individui sani.

La misura più efficace per ridurre la diffusione dell'infezione neonatale consiste nel ridurre il serbatoio. Un uso più estensivo delle indagini diagnostiche specifiche avrebbe un maggiore impatto nella prevenzione dell'infezione neonatale. Lo screening di tutte le donne in gravidanza ed un adeguato trattamento dei casi risultati positivi certamente ridurrebbe l'incidenza dell'infezione neonatale, tuttavia tale prassi è particolarmente impegnativa sul piano tecnico e costosa, per cui di fatto non è stata applicata su vasta scala.

# MICOPLASMA HOMINIS

## 1. CLASSIFICAZIONE

- **Regno:** *Bacteria*
- **Phylum:** *Firmicutes*
- **Classe:** *Mollicutes*
- **Ordine:** *Mycoplasmatales*
- **Famiglia:** *Mycoplasmataceae*
- **Genere:** *Mycoplasma*
- **Specie:** *Mycoplasma hominis*

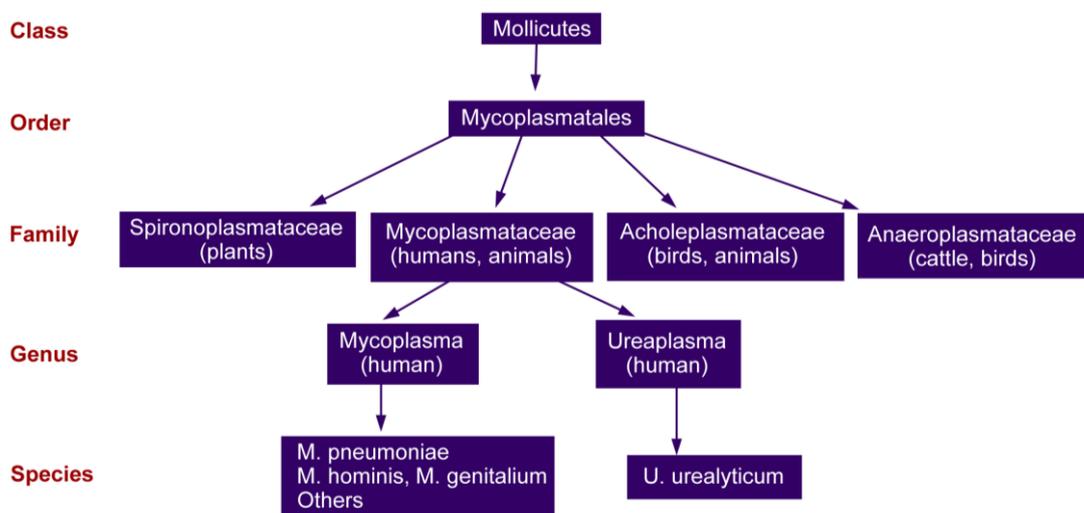


Fig. 7 Tassonomia: Chatterjee A. (2010) -Mycoplasma Infection - <http://emedicine.medscape.com>

I micoplasmi sono Procarioti, tassonomicamente riuniti nella classe *Mollicutes* (dal latino *mollis cutis*), che comprende la famiglia *Mycoplasmataceae* a cui appartengono due generi responsabili di infezioni umane: *Mycoplasma* e *Ureaplasma*.

I micoplasmi sono di dimensioni molto ridotte e non possono essere classificati tra i Gram-positivi o i Gram-negativi, per la totale assenza di parete cellulare; sono, quindi, insensibili agli antibiotici beta-lattamici, che inibiscono la sintesi della parete cellulare. Possiedono invece una membrana cellulare contenente steroli.

Per tali caratteristiche, assolutamente peculiari, la cellula presenta una notevole plasticità, che si rifletta nella capacità di assumere forme diverse in base alle condizioni nutritive e alla pressione osmotica del sito in cui vivono.

Al momento della loro scoperta, i micoplasmi sono stati scambiati per virus, perché sono in grado di passare attraverso i filtri per batteriologia, tuttavia, a differenza dei virus, sono in grado di crescere in terreni di coltura, e non in colture cellulari, e contengono sia RNA che DNA.

Alcune specie di micoplasma sono state anche ritenute batteri di forma-L, che sono prive di pareti cellulari, ma i batteri di forma-L, a differenza dei micoplasmi, non hanno steroli nelle membrane cellulari e possono tornare alle loro forme originali.

## 2. CARATTERISTICHE BIOLOGICHE

Il nome *Mycoplasma* si riferisce alla plasticità delle forme batteriche, simili a elementi fungini.

*Mycoplasma hominis* è il batterio più piccolo esistente in natura (150-250 nm), è un parassita cellulare di superficie, che nell'uomo si localizza sulle mucose dell'apparato respiratorio e genitourinario, aderendo alla membrana plasmatica delle cellule epiteliali.

Questi batteri mancano della parete cellulare e hanno una membrana cellulare delicata e ricca di colesterolo, che spiega il grande pleomorfismo (Koneman, 1995).

Tutti i micoplasmi richiedono steroli per la crescita e per la sintesi della membrana, non sono in grado di produrli autonomamente, per cui vivono bene in presenza di siero animale/umano dal quale possono estrarre gli steroli necessari.

I micoplasmi sono batteri aerobi o aerobi-anaerobi facoltativi (ad eccezione di *M. pneumoniae*, che è un aerobio stretto), che per produrre energia sfruttano la loro capacità di metabolizzare il glucosio (*M. pneumoniae*), l'arginina (*M. hominis*) o l'urea (*U. urealyticum*). La quarta specie, *M. genitalium*, è estremamente difficile da far crescere in cultura.

Per la loro coltivazione, è richiesto l'allestimento di terreni contenenti, oltre al siero, i precursori degli acidi nucleici (estratto di lievito), e crescono lentamente per fissione binaria.

## 3. MORFOLOGIA E ORGANIZZAZIONE GENOMICA

I Micoplasmi contengono sia DNA che RNA.

Il genoma di *Mycoplasma hominis* è circolare e costituito da 665,445 bp, con un scarso contenuto in GC, pari al 27%.

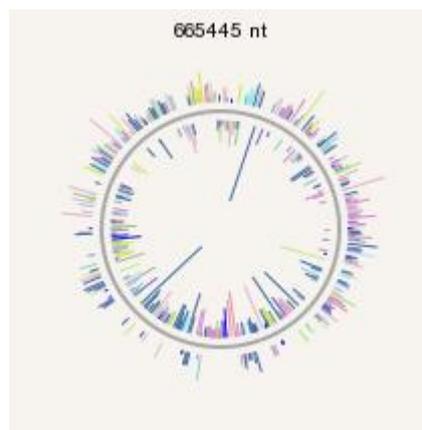


Fig.8 Genoma di *Mycoplasma hominis*

Dal sito NCBI (National Center for Biotechnology Information) sono stati tratti i dati relativi al genoma di *Mycoplasma hominis*:

| Genome Info:                      | Features:                           | BLAST homologs:         | Links:                         | Review Info:               |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Refseq: <a href="#">NC_013511</a> | Genes: <a href="#">577</a>          | COG                     | <a href="#">Genome Project</a> | Publications: [1]          |
| GenBank: <a href="#">FP236530</a> | Protein coding: <a href="#">523</a> | <a href="#">TaxMap</a>  | <a href="#">Refseq FTP</a>     | Refseq Status: PROVISIONAL |
| Length: 665,445 nt                | Structural RNAs: <a href="#">40</a> | <a href="#">TaxPlot</a> | <a href="#">GenBank FTP</a>    | Seq. Status: Completed     |
| GC Content: 27%                   | Pseudo genes: 14                    | GenePlot                | BLAST                          | Sequencing center: None    |
| % Coding: 88%                     | Others: None                        | <a href="#">gMap</a>    | TraceAssembly                  | Completed: 2009/11/14      |
| Topology: circular                | Contigs: None                       |                         | <a href="#">CDD</a>            | Organism Group             |
| Molecule: DNA                     |                                     |                         | Other genomes for species:     |                            |

Fig. 9 Tabella riassuntiva, genoma di *Mycoplasma hominis*

I micoplasmi, come cellule “auto-replicanti” possiedono il genoma più piccolo (meno di 500 regioni codificanti), che è uno dei motivi per cui sono stati scelti tra i primi microrganismi per i progetti di sequenziamento del genoma. L’analisi dei genomi dei micoplasmi, indica i pathways biochimici in cui ci sono state delle riduzioni di geni, per cui aiuta a definire il set minimo di geni essenziali per una cellula auto-replicante. Durante la loro evoluzione, i micoplasmi sembrano aver perso tutti i geni coinvolti nella biosintesi di aminoacidi e cofattori, nella sintesi della parete cellulare e nel metabolismo lipidico, con conseguente necessità di sfruttare i substrati e i cofattori necessari dall’ospite o da terreni di coltura arricchiti.

I micoplasmi hanno perso un certo numero di geni coinvolti nei processi cellulari, come la divisione cellulare, la risposta allo shock termico, geni regolatori, i due componenti del sistema di trasduzione del segnale, istidina protein-chinasi o i loro regolatori, e la maggior parte dei fattori di trascrizione; sono, inoltre, carenti di geni che codificano per i componenti del metabolismo intermedio e di produzione dell’energia, dipendono, quindi, principalmente dalla glicolisi come pathway per la produzione di ATP.

#### **4. MODALITÀ DI INFEZIONE E RISPOSTA IMMUNITARIA**

##### FATTORI DI ADERENZA:

I micoplasmi l’infettano l’ospite principalmente come parassiti extracellulari, aderendo alla superficie delle cellule epiteliali ciliate e non ciliate delle vie respiratorie e genitali; responsabili di questa adesione sono le proteine di adesione.

Il sito di legame, o recettore, è un complesso carboidratico strutturalmente simile all’antigene I dei globuli rossi. La risposta anticorpale a questo recettore consiste nella produzione di anticorpi anti-I o agglutinine a freddo, che agisce come un autoanticorpo.

##### PRODOTTI TOSSICI DEL METABOLISMO:

In seguito al legame, il micoplasma può causare direttamente danni citotossici alle cellule epiteliali a causa della formazione di prodotti metabolici tossici, quali il perossido di idrogeno e superossido, che sono quindi implicati nella patogenesi da ossidazione dei lipidi dell’ospite. Inoltre, i micoplasmi sono in grado di inibire le catalasi della cellula ospite, aumentando le concentrazioni di perossido.

### IMMUNOPATOGENESI:

I micoplasmi possono anche causare indirettamente la citolisi della cellula ospite, attraverso la stimolazione di una risposta infiammatoria mediata da cellule mononucleate o di reazioni antigene-anticorpo, possono infatti attivare i macrofagi e stimolare la produzione di citochine e l'attivazione dei linfociti.

I Micoplasmi genitali sono associati a numerose malattie del tratto genito-urinario e riproduttivo, ad esempio, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, e *Ureaplasma urealyticum* sono sessualmente trasmissibili, infatti persone con partners sessuali diversi sono più facilmente infette.

*Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono tra le specie patogene isolate più di frequente nell'apparato genitourinario.

La trasmissione dell'infezione può avvenire sia per contatto sessuale che dalla madre al figlio, durante il passaggio nel canale del parto, come per *Chlamydia trachomatis*, o durante la gravidanza. Normalmente l'infezione del neonato è temporanea e priva di complicazioni, ma in casi rari, una percentuale molto bassa, può causare polmonite congenita, batteriemia e meningite. In uno studio condotto su donne con infezione da micoplasmi si è dimostrata l'esistenza di una relazione tra l'aumento del titolo anticorpale specifico nelle donne e la nascita di neonati con peso ridotto: donne con un titolo anticorpale quattro volte maggiore rispetto al valore di riferimento hanno concepito neonati con un peso ridotto del 30%; mentre la riduzione del peso del neonato era solo del 7.3% in donne che non presentavano titoli anticorpali specifici.

Di recente, soprattutto in caso di infezioni croniche, si è studiata un'altra specie, *Mycoplasma genitalium*, un patogeno la cui attività è legata, non solo alla capacità adesiva tipica dei micoplasmi, ma anche alla sua capacità di penetrare nelle cellule della mucosa genitourinaria, è quindi un parassita intracellulare capace, come *Chlamydia trachomatis*, di eludere il sistema immunitario e quindi di instaurare infezioni latenti.

## **5. PATOLOGIE CORRELATE E MANIFESTAZIONI CLINICHE**

In circa il 10% di donne con malattia infiammatoria pelvica è stato isolato *Mycoplasma hominis* dalle tube di Falloppio e dall'endometrio.

*M.hominis* è anche agente eziologico di infezioni intramniotiche, febbre post-partum ed endometrite post-partum.

I micoplasmi in pazienti con vaginite batterica trovano le condizioni ideali per la loro proliferazione e possono contribuire alle manifestazioni cliniche, ma non ne sono la causa. Nelle vaginiti viene spesso riscontrato un elevato grado di associazione tra i micoplasmi e la *Gardnerella vaginalis* che potrebbe indicare un possibile effetto sinergico.

I micoplasmi possono determinare, nell'uomo, uretriti, prostatiti e prostatovesicoliti subacute, spesso accompagnate da emospermia.

Esiste una relazione diretta tra anomalie e disordini della riproduzione maschile e la presenza di *M. hominis* e *U. urealyticum*, che sono stati spesso isolati nello sperma di soggetti sterili, in particolare *U. urealyticum*. In tali pazienti il liquido seminale presenta una diminuzione del numero e della motilità degli spermatozoi e un aumento delle forme immature, del volume dell'eiaculato e del pH, conseguente all'idrolisi dell'urea. La caratteristica di adesività di questi microrganismi è, probabilmente, connessa alla diminuzione di mobilità dovuta al tropismo per la zona del colletto degli spermatozoi.

Inoltre, il liquido seminale di questi pazienti è caratterizzato da una tipica agglutinazione tra gli spermatozoi, probabilmente determinata dagli anticorpi specifici che vengono prodotti, presenti nelle secrezioni e soprattutto nel liquido seminale, che si legano ai microrganismi adesi agli spermatozoi.

L'infezione genitale da micoplasma può avere diverse manifestazioni, tra cui bruciore durante la minzione (uretriti non gonococciche), dolore prostatico, febbre e brividi (indicativi di pielonefrite), perdite vaginali, i sintomi della malattia infiammatoria pelvica, febbre post-partum, e febbre post-aborto; nei neonati si possono presentare sintomi vari come tosse o segni di meningite o ascesso cerebrale.

## **6. EPIDEMIOLOGIA**

Il *Mycoplasma hominis* appartiene alla normale flora genitale di molti uomini e donne sessualmente attivi.

L'incidenza delle infezioni genitali da micoplasmi aumenta dopo la pubertà. Circa il 15% degli e donne viene infettato da *M. hominis*.

Le infezioni genitali da micoplasmi sono asintomatiche nel 28% - 75% dei casi; la frequenza è variabile a seconda di diversi fattori legati alla popolazione di origine, all'età, alla razza, alle abitudini sessuali e al livello socio-economico di appartenenza.

Ad esempio, nella clinica di ostetricia e ginecologia di un grande ospedale di Boston è stato isolato *M. hominis* da 305 su 569 (54 %) donne visitate e da 40 su 188 (21 %) donne visitate presso gli ambulatori di medici privati nella stessa città.

L'infezione da *Mycoplasma hominis* è distribuita in tutto il mondo ed è trasmessa principalmente con il rapporto sessuale; è più frequente nelle donne che negli uomini e nelle bambine rispetto ai bambini.

I tassi d'infezione da *Mycoplasma hominis* variano dal 20 al 50%.

Le specie genitali di *Mycoplasma* sono state isolate più frequentemente in uomini e donne neri che in uomini e donne bianchi.

La trasmissione ai neonati di micoplasmi genitali di solito si verifica durante il passaggio attraverso il canale del parto infetto. I micoplasmi genitali sono stati isolati nel tratto respiratorio in una percentuale superiore al 15% dei neonati di madri con infezione genitale; ma di solito tale infezione nel neonato non persiste oltre i due anni.

La vagina delle neonate viene contaminata nel passaggio attraverso il canale del parto e per questo motivo nella bambina in prepubertà l'incidenza di *Mycoplasma hominis* in vagina è dell'8-9%.

I micoplasmi sono responsabili di circa il 30 % dei casi di uretrite non gonococcica (NGU). *Mycoplasma hominis* è stato isolato dal liquido amniotico nel 30% di 404 donne in gravidanza affette da amniotite ed è stata dimostrata una sua relazione con il parto pretermine a meno di 33 settimane di gestazione.

## **7. MISURE DI CONTROLLO E PREVENZIONE**

La prevenzione dell'infezione da *Mycoplasma hominis*, come per le altre infezioni, passa attraverso alcune basilari norme igieniche e di comportamento quotidiano.

E' però di fondamentale importanza, preservare l'ecosistema microbico residente, che rappresenta un' importante arma di difesa delle mucose.

La flora vaginale delle donne sane è costituita principalmente da lattobacilli, che ostacolano la colonizzazione della vagina da parte di altri microrganismi. Queste funzioni sono dovute alla loro capacità di occupare le possibili sedi di adesione, di sintetizzare perossido di idrogeno, che è un battericida diretto ed indiretto perché stimola l'attività dei globuli bianchi, di acidificare l'ambiente vaginale (pH 4-4,5) metabolizzando il glicogeno e producendo acido lattico.

Per questi motivi, l'impiego di detergenti per l'igiene intima a pH non acido o ad attività anti-lattobacillare, facilita il processo infettivo, riducendo la flora microbica residente che protegge la mucosa; mentre i talchi e gli spray profumati possono produrre irritazioni della mucosa vaginale.

Per prevenire le infezioni è importante anche evitare di indossare biancheria intima sintetica, jeans e pantaloni troppo stretti, che trattengono l'umidità e il calore, creando così le condizioni favorevoli allo sviluppo di microrganismi dannosi, in particolare i micoplasmi, che sono anaerobi facoltativi.

Il rapporto sessuale rappresenta per *Mycoplasma hominis* la principale fonte di contagio, favorito dalle caratteristiche del liquido seminale, con pH leggermente alcalino (7,4-7,6) che contribuisce alla diminuzione dell'acidità vaginale, facilitando l'adesione e la proliferazione del patogeno.

# DIAGNOSI DI LABORATORIO CONVENZIONALE

## CHLAMYDIA TRACHOMATIS:

La diagnosi d'infezione da *Chlamydia trachomatis* si basa sulla ricerca diretta del microrganismo con varie tecniche:

- osservazione microscopica del materiale patologico
- ricerca antigenica diretta
- immunofluorescenza diretta
- esame colturale (isolamento in colture di cellule *in vitro*)
- ricerca del materiale genetico (DNA) mediante PCR (Polymerase Chain Reaction)
- e/o la ricerca indiretta dell'agente infettante mediante indagini sierologiche (dosaggio anticorpale).

1. L'osservazione microscopica del materiale biologico prelevato permette di verificare la presenza delle inclusioni, caratteristiche della *Chlamydia trachomatis*, all'interno delle cellule epiteliali prelevate. Questa metodica consente però solo di verificare una infezione attiva in atto, ma non la presenza di una infezione latente/persistente.

I "corpi inclusi" nelle cellule sono evidenziabili con colorazione semplice (Giemsa) o impiegando anticorpi monoclonali fluoresceinati verso antigeni specie-specifici.

Le inclusioni (glicogeno) sono evidenziate dalla colorazione con soluzione di iodio (liquido di Lugol).

La più recente citologia a strato sottile (THIN PREP) sta lentamente sostituendo la citologia convenzionale, ed è normalmente utilizzata per il PAP-TEST perché offre una migliore risoluzione del campione citologico al microscopio, grazie ad un sistema semi-automatizzato per deposizione e colorazione dei vetrini con conseguente maggiore facilità di lettura da parte del citologo e, quindi, una diagnosi più accurata [Fig. 10].

Tale metodica consiste nel prelevare tessuto cervicale, mediante una apposito cito-brush, e nel conservare il materiale cellulare in un tampone liquido di trasporto per tempi lunghi (diversi mesi) e a temperatura ambiente, senza danneggiare le cellule.

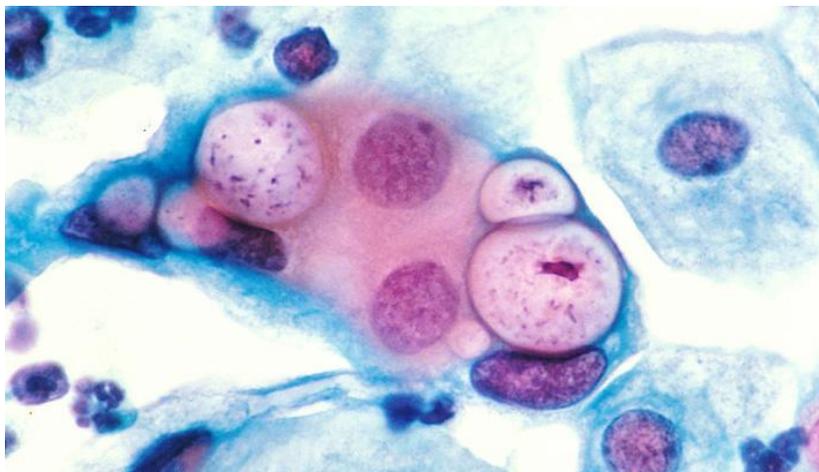


Fig. 10 - **PAP TEST THIN PREP:** evidente infezione da *C. trachomatis* in replicazione nelle inclusioni (H&E stain)

2. La ricerca antigenica diretta si basa, nella maggior parte dei prodotti commerciali, su metodiche immunocromatografiche rapide che hanno come supporto varie tipologie di strisce/cassette. Viene utilizzata per la determinazione qualitativa dell'antigene di *Chlamydia trachomatis*, su tampone cervicale della donna, su tampone uretrale, nell'urina e nel liquido seminale dell'uomo.

Il campione è trattato con enzimi specifici e, dopo un breve tempo di incubazione, viene deposto sulla cassetta o sulla striscia che si inserisce direttamente nella provetta. Il campione trattato migra per capillarità attraverso il supporto assorbente.

Alla striscia è legato un anticorpo specifico coniugato con un colorante e, se nel campione è presente l'antigene (campione positivo), quando avviene la reazione antigene-anticorpo, sulla striscia compare una banda colorata in corrispondenza del sito di legame. In un sito diverso della striscia è legato un anticorpo anti-IgG, che funge da controllo di reazione perché, in presenza del campione, compare una banda colorata, se il campione è trattato male, la banda è assente ed è necessario ripetere il test.

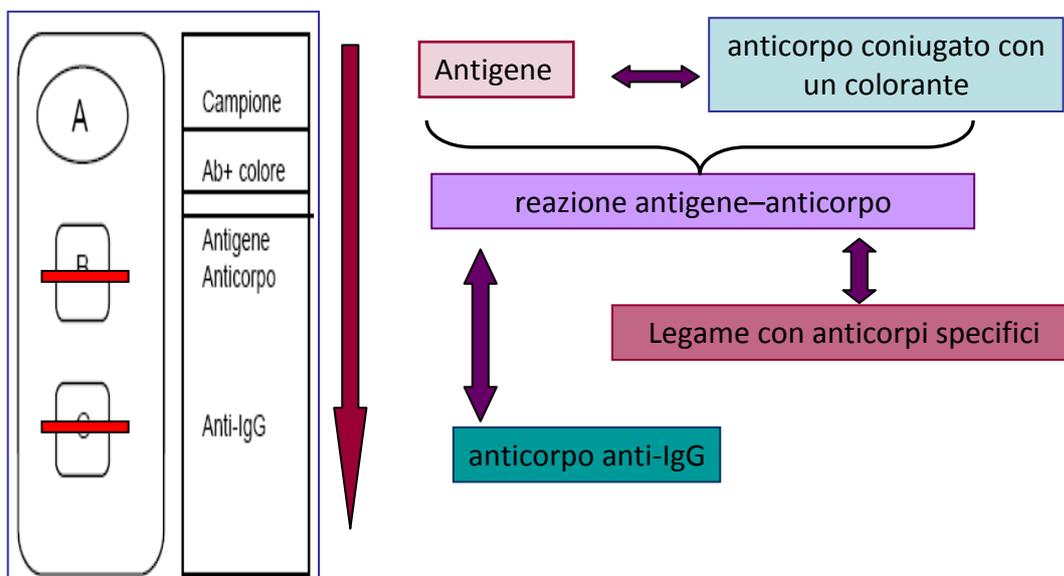


Fig. 11 Schema di metodologia immunocromatografica antigene-anticorpo

Questi test sono direttamente dipendenti dal campionamento perché, se il materiale prelevato è scarso, si rischia di avere un falso negativo, o un falso positivo a causa di reazioni crociate con antigeni di altri microrganismi.

3. Immunofluorescenza diretta: (da Linee-guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni uretro-cervico-vaginali del Comitato di Studio AMCLI per le Infezioni Sessualmente Trasmesse non AIDS - CoSIST) è la metodica più rapida e più diffusa nei laboratori e consente di valutare la cellularità del campione e quindi la sua idoneità.

Sul vetrino, strisciato con il materiale cervicale e fissato con apposito fissativo, viene deposta una goccia di antisiero contenente anticorpi monoclonali rivolti verso le proteine del MOMP e contro il LPS di *Chlamydia trachomatis*.

Dopo incubazione, a temperatura ambiente per 30 minuti, i corpi elementari, se presenti, appariranno al microscopio a fluorescenza come spots, perfettamente rotondeggianti, di 300 nm con colorazione fluorescente verde mela.

La sua correlazione con la coltura, che rappresenta il metodo di riferimento, è abbastanza elevata e supera il 90% se si considera, come proposto attualmente, il cut-off positivo/negativo di almeno 2 corpi elementari.

L'utilizzo di entrambi gli anticorpi monoclonali limita la possibilità di falsi positivi dovuti alla cross-reattività con la proteina A dello *Staphylococcus* spp.

4. L'isolamento in colture di cellule *in vitro* per la diagnosi di laboratorio delle infezioni da *Chlamydia trachomatis* era molto diffusa negli anni '70 e '80. Attualmente, l'utilizzo di colture cellulari a scopo diagnostico e/o di ricerca è stato limitato a laboratori specializzati.

Negli anni '80 si è diffusa la ricerca di antigeni specifici per Clamidia, che ha iniziato a sostituire la coltura cellulare, perché presenta una maggior facilità di trasporto e di trattamento dei campioni biologici, nonché tempi più rapidi di risposta.

Sono state commercializzate le metodiche per il dosaggio degli anticorpi: immunofluorescenza diretta (DFA) e immuno-enzimatica (EIA) con i relativi algoritmi per la conferma di falsi positivi.

Attualmente l'esame colturale è eseguito solamente in pochissimi centri di riferimento e consiste nella semina del materiale patologico, inviato al laboratorio in apposito terreno di trasporto (può essere eventualmente conservato a  $-70^{\circ}\text{C}$  fino al momento della semina), in linee cellulari idonee come terreni di coltura.

L'isolamento ottimale si ha centrifugando i corpi elementari della Clamidia su un monostrato cellulare di cellule McCoy, HeLa 299 o BHK-21, irradiate o trattate, dopo l'infezione, con inibitori metabolici (cicloesimide  $1\mu\text{g/ml}$ ).

Le cellule più utilizzate sono le McCoy, trattate con Rx e cicloesimide, per rallentarne le sintesi molecolari, così da rendere disponibili i metaboliti per *Chlamydia trachomatis*. Dopo 48-72 ore di incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  i monostrati cellulari vengono saggiati con anticorpi monoclonali fluoresceinati per ricercare, col microscopio a fluorescenza, le inclusioni tipiche di *Chlamydia*.

La coltura presenta un'elevatissima sensibilità che si può aumentare effettuando delle sottocolture, che permettono di evidenziare anche basse cariche di *Chlamydia trachomatis*, presenti nei campioni

Alcuni campioni biologici come il liquido amniotico, aspirato endometriale, endotubarico, e liquido seminale hanno dimostrato una inibizione della crescita in coltura di *Chlamydia trachomatis*.

L'isolamento in colture cellulari può essere eseguito solo in Laboratori altamente specializzati, in grado di garantire la qualità e l'idoneità delle linee cellulari e la corretta performance del test.

5. La ricerca indiretta dell'agente infettante si avvale di indagini sierologiche basate sulla ricerca e il dosaggio degli anticorpi specifici di tipo IgG, IgM ed IgA, che, però, non è sempre attendibile, tranne nei rari casi in cui è possibile osservare una evidente sieroconversione. Gli anticorpi stimolati da *Chlamydia trachomatis* hanno una vita lunga e non distinguono tra infezioni lontane e recenti. Un incremento di 4 volte nel titolo anticorpale è indice di infezione, ma sono necessarie almeno 4 settimane per assistere all'aumento degli anticorpi (sierconversione).

Il primo metodo sierologico utilizzato, che ancora oggi è utile a scopo diagnostico, è la reazione di fissazione del complemento. Sono stati impiegati anche saggi di radioimmunoprecipitazione, la reazione di micro-immunofluorescenza diretta (DFA) e saggi immunoenzimatici (EIA) con i relativi algoritmi per la conferma dei risultati positivi.

### **MYCOPLASMA HOMINIS:**

La ricerca di *Mycoplasma hominis* riveste un significato patognomonico solo se condotta su secreto cervicale o uretrale e non su essudato vaginale.

I micoplasmi genitali possono essere isolati da una grande varietà di campioni. Tra questi i tamponi uretrali, vaginali o cervicali, le secrezioni prostatiche, lo sperma, le urine, il sangue, diversi liquidi organici (ad esempio: liquor, liquido amniotico, secrezioni respiratorie, liquido sinoviale e pericardio) e tessuti (ad esempio: lavaggi e biopsie endometriali, tessuto placentare o amniotico, tessuti fetali o aborti, biopsie delle tube di Fallopio, biopsie uterine, biopsie da ferite, tessuti rettali).

La crescita dei micoplasmi necessita di terreni di coltura a composizione complessa, arricchiti con siero, la maggior parte delle specie richiede come fattore nutrizionale il colesterolo o altri steroli; essi sono molto sensibili all'essiccamento ed è necessaria una cura particolare nella raccolta e nel trasporto dei campioni clinici che li contengono.

L'esecuzione del prelievo, deve rispettare norme ben precise. Il tampone si introduce per circa 2 cm all'interno del canale uretrale o cervicale, ruotando per circa 10 secondi.

I pazienti devono essere istruiti su alcune norme da rispettare e in particolare.

- astenersi dai rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti l'esame
- aver cessato qualsiasi trattamento chemio-antibiotico da almeno una settimana
- non aver urinato nelle ultime 2 ore.

Lo studio dei micoplasmi può essere effettuato con sistemi che si differenziano sia per le tecniche impiegate sia per i principi su cui si basa l'indagine:

- tecniche di colorazione, capaci di evidenziare la presenza del genoma dei micoplasmi nelle cellule,
- test biochimici o immunoenzimatici,
- metodi colturali in appositi terreni selettivi,
- tecniche di ibridazione di DNA o rRNA mediante DNA-probe o mediante PCR soprattutto per la ricerca di quei micoplasmi con particolari esigenze di crescita.

I sistemi colturali sono, comunque, quelli attualmente maggiormente utilizzati perché la maggior parte di essi abbina allo studio delle attività metaboliche la possibilità di un esame morfologico microscopico delle colonie, cresciute su agar, che ne consentono una definitiva identificazione.

I sistemi di coltura e di identificazione sono costituiti da un terreno di trasporto, in cui il tampone con il materiale prelevato deve essere stemperato e un terreno liofilo, che deve essere reidratato con il terreno di trasporto. In quest'ultimo sono presenti tutti gli elementi necessari alla crescita dei micoplasmi, un indicatore di viraggio del colore legato all'aumento del pH e una miscela di antibiotici che rende selettivo il terreno.

Con lo stesso terreno, si deve seminare anche una piastra agarizzata che consente lo studio al microscopio della morfologia delle colonie di micoplasmi cresciuti. L'osservazione al microscopio delle piastre si esegue dopo 24-72 ore di incubazione a 37°C in microaerofilia .

*M. hominis* produce colonie su piastre di agar con la forma caratteristica a "uovo fritto" [Fig.12].

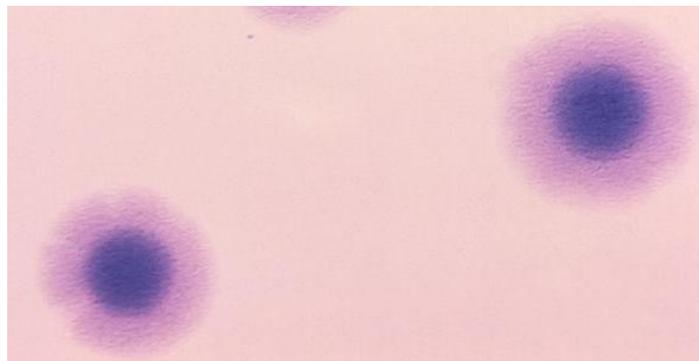


Fig.12 - *Mycoplasma hominis* isolato su agar.

[Da Mayer G. – Bacteriology – Chapter 19, Mycoplasma e Ureaplasma]

Altri metodi di coltura, presenti in commercio, associano al terreno di trasporto e di coltura un sistema contenente substrati di identificazione e antibiotici liofilizzati, che devono essere reidratati con il brodo. Questo sistema permette di identificare i micoplasmi, di determinare la carica ed il comportamento del ceppo isolato verso determinati antibiotici a concentrazioni critiche.

La coltura attualmente rappresenta, quindi, il metodo di riferimento e di controllo; l'identificazione deve essere sempre accompagnata dalla valutazione semiquantitativa del cut-off di carica (10000 UFC/ml) al di sopra del quale si può attribuire un ruolo patogeno al microrganismo. Valori al di sotto devono essere considerati quale indicazione di semplice commensalismo.

# DIAGNOSI DI LABORATORIO CON TECNICHE MOLECOLARI

La determinazione diretta del DNA di *Chlamydia trachomatis* e di *Mycoplasma hominis*, mediante la tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction: Reazione a Catena della Polimerasi), consente un netto incremento della specificità e soprattutto della sensibilità nella diagnosi di patologie Chlamydia/Mycoplasma -correlate.

Tramite la metodica PCR é possibile individuare una specifica regione del genoma di questi patogeni permettendo una diagnosi precisa anche in quei campioni (urina, sangue) in cui il parassita può avere scarsa o nulla vitalità oppure una carica microbica molto bassa (secreti congiuntivali, liquidi seminali e sinoviali); è in questi casi che si determinano le condizioni di latenza, asintomaticità e cronicizzazione, responsabile dell' elevata incidenza della trasmissione.

Esistono svariati kit in commercio per la determinazione della presenza del DNA di *Chlamydia Trachomatis* e di *Mycoplasma hominis* mediante l'amplificazione di regioni specifiche; questi kit si basano sulla PCR classica, PCR Nested o PCR Real Time, quest'ultima può fornire una risposta semi-quantitativa.

La PCR classica e la Nested sono abbinate a sistemi di rivelazione come quella "storica" su gel d'agarosio o l'utilizzo di strip di vari materiali, che consentono una lettura più semplice della banda e meno problemi di falsi positivi/negativi rispetto alla rivelazione su gel d'agarosio.

La PCR- Real Time invece fornisce in tempo reale una risposta direttamente sullo schermo del computer.

La PCR è un metodo di sintesi enzimatica *in vitro* di specifiche sequenze di DNA, che si è dimostrata molto versatile in biologia molecolare; ciò ha consentito un notevole progresso della ricerca e scoperta genetica, della diagnostica e dell'analisi dell'espressione genica; inoltre le nuove tecniche di PCR (Real Time, Nested, ...) hanno portato all'espansione delle possibili applicazioni scientifiche.

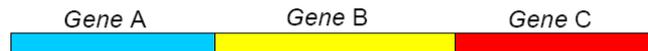
Si usano due primer di oligonucleotidi che ibridano i filamenti complementari opposti alle estremità della regione d'interesse del DNA bersaglio.

La PCR consiste in una serie di cicli ripetuti che coinvolgono denaturazione del DNA bersaglio (apertura dei due filamenti), annealing (ibridazione) dei primer (legame dei primer ai due filamenti) ed estensione dei primer ibridati(copiatura del filamento di DNA) ad opera della DNA polimerasi; ne risulta l'accumulo esponenziale di uno specifico frammento i cui termini sono definiti dalle estremità 5' dei primer.

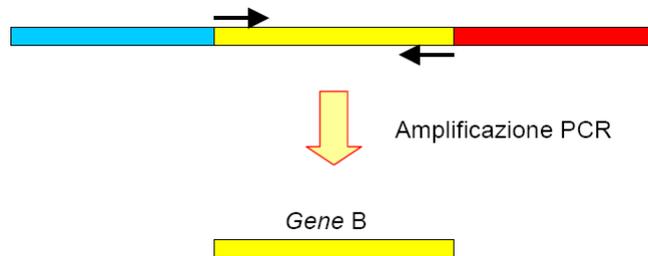
La DNA polimerasi umana viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99 °C), quindi normalmente si ricorre alle polimerasi di organismi termofili che non sono inattivate dalle alte temperature, come la Taq polimerasi proveniente dal batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*, che permette di effettuare più cicli di PCR in sequenza (normalmente dai 30 ai 50), in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti, ottenendo una reazione a catena che consente una moltiplicazione estremamente rapida del materiale genetico di interesse.

### PCR Classica:

Il frammento di DNA contiene 3 geni, ma è necessario amplificare solo il gene B.



Vengono preparati 2 primer che si ibridano alle 2 estremità del gene.



La PCR classica è utilizzata per amplificare una sequenza conosciuta e specifica di DNA; si studia la sequenza che si vuole amplificare, verificando che nel resto del genoma, o in altri genomi, non vi siano sequenze omologhe, mediante l'allineamento della sequenza di interesse con le altre sequenze presenti nel database BLAST (sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) che possano portare alla produzione di falsi positivi.

Successivamente si può iniziare a disegnare i *primer* che si devono ibridare alla sequenza da amplificare, considerando che i *primer* non dovrebbero contenere sequenze complementari tra loro oppure sequenze ripetute invertite per evitare che si formino aggregati di *primer* (dimeri) o strutture a forcina. Per disegnare i primer idonei si possono utilizzare vari software, anche gratuiti su internet (Primer3, Primer Express, ...), che permettono di inserire la sequenza di DNA di interesse e segnando le caratteristiche del segmento che si vuole amplificare (lunghezza, percentuale di GC, ecc.) disegna un set di primer tra cui si sceglie la coppia più specifica (che non abbia omologie di sequenza con il Dna di altri organismi, in modo da renderli il più possibile specie-specifici ed evitare così falsi positivi o reazioni crociate.

E' importante considerare che una concentrazione di *primer* troppo elevata potrebbe far amplificare sequenze aspecifiche, mentre una troppo bassa può rendere la PCR inefficace.

Durante la messa a punto della PCR è necessario ottimizzare la concentrazione dei *primer*, mediante diluizioni scalari.

La messa a punto della PCR prevede anche l'ottimizzazione della temperatura di annealing dei primer, basata sulla temperatura di melting degli stessi e tramite i cicli di temperatura della PCR si amplifica il segmento di DNA racchiuso tra i primer.

Fondamentale è anche l'ottimizzazione della concentrazione di magnesio. Perché influisce sull'attività della polimerasi, sull'ibridazione dei *primer* e fa aumentare la temperatura di denaturazione del DNA bersaglio.

In ogni reazione PCR è importante l'utilizzo di controlli di qualità per valutare la sensibilità e la specificità della metodica, e di verificare la presenza di falsi positivi o falsi negativi. Il controllo positivo contiene la sequenza bersaglio, mentre il controllo negativo ne è privo (di solito si utilizza acqua sterile) ed è utile per verificare eventuali contaminazioni legate sia all'estrazione del DNA, sia alla preparazione della PCR.

## PCR Real-Time

La tecnologia della Real-Time PCR rispetto alla classica ha introdotto nuove possibilità, in quanto consente la misura diretta e la quantificazione della reazione mentre avviene l'amplificazione.

I primi ad analizzare la cinetica della PCR furono Higuchi e collaboratori (1992) che costruirono un sistema in grado di rivelare i prodotti della PCR durante l'accumulo, quindi un sistema "in tempo reale", che utilizzava Etidio Bromuro come colorante fluorescente intercalante.

Ora sono disponibili strumenti per PCR Real-Time sempre più avanzati ma che si basano sullo stesso principio fondamentale: i campioni vengono irradiati da una sorgente a singola lunghezza d'onda o ad ampio spettro e, a seconda della strategia impiegata, viene rivelata la fluorescenza emessa dai campioni e trasmesso il segnale al computer che raccoglie tutti i risultati ottenuti relativi all'analisi tramite opportuni software appositamente studiati.

Il risultato ottenuto da una PCR è rappresentato da una curva di amplificazione, ovvero un diagramma del segnale di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli effettuati, che a livello teorico è di tipo esponenziale; ma in realtà è caratterizzata da una prima fase esponenziale, in cui nessun componente della reazione è limitante, seguita da un andamento di tipo lineare per raggiungere un plateau.

I replicati possono terminare in diversi plateau, ma la proporzionalità con il DNA target avviene solo nella fase esponenziale.

La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale consente di analizzarle nel momento in cui l'amplificazione è nella fase esponenziale.

L'andamento delle reazioni viene visualizzato in forma di grafico [Fig. 13] in cui per ogni campione di DNA viene rappresentata la fluorescenza, sull'asse delle Y, misurata in ogni ciclo di reazione, sull'asse delle X.

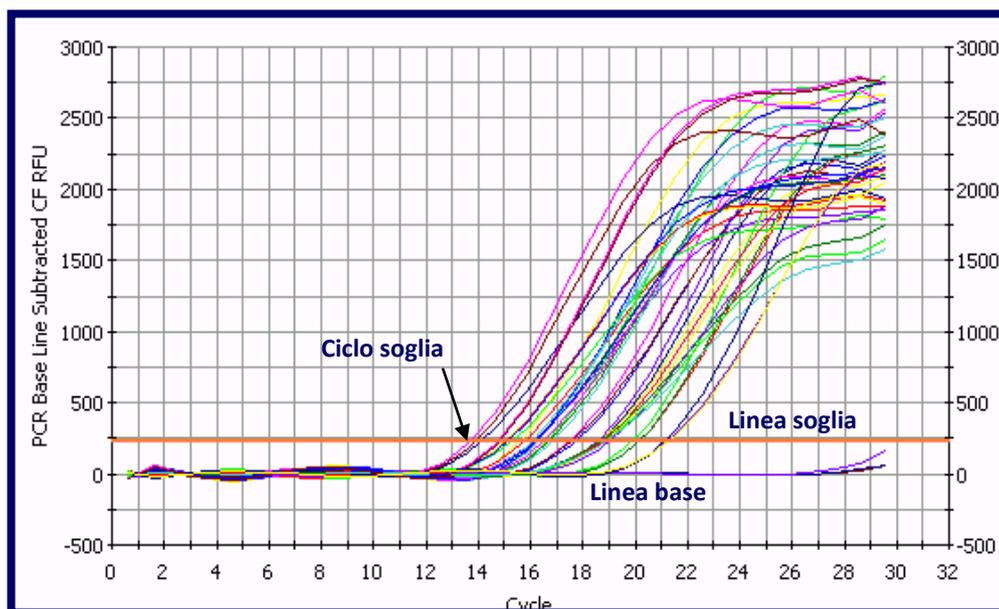


Fig. 13 Esempio di risultato con PCR Real Time

I primi cicli della PCR Real-Time in cui non è misurabile la variazione del segnale della fluorescenza definiscono la linea di base (baseline) che rappresenta un parametro importante della curva. Un aumento della fluorescenza oltre la baseline indica il rilevamento del prodotto della PCR in fase di accumulo.

Un altro parametro importante è la linea-soglia che è parallela alla linea di base e deve tagliare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale; ed è fondamentale per la quantificazione del DNA iniziale presente nei campioni che questa linea sia posizionata correttamente.

La curva di amplificazione di ogni campione taglia la linea-soglia in un punto preciso corrispondente al ciclo-soglia (Threshold Cycle, TC), che è definibile come il numero del ciclo, o una sua frazione, in cui la curva di amplificazione in fase esponenziale taglia la linea-soglia. Il ciclo-soglia non è un valore misurato alla fine dell'amplificazione, ma è un indicatore fedele della quantità di DNA: il logaritmo delle quantità iniziali di DNA nei confronti dei valori di ciclo-soglia è rappresentato in un diagramma da una retta.

Se nella reazione sono presenti campioni a quantità nota di DNA (standard) da cui viene ricavata una retta di riferimento, è possibile calcolare la quantità di DNA iniziale presente nei campioni analizzati.

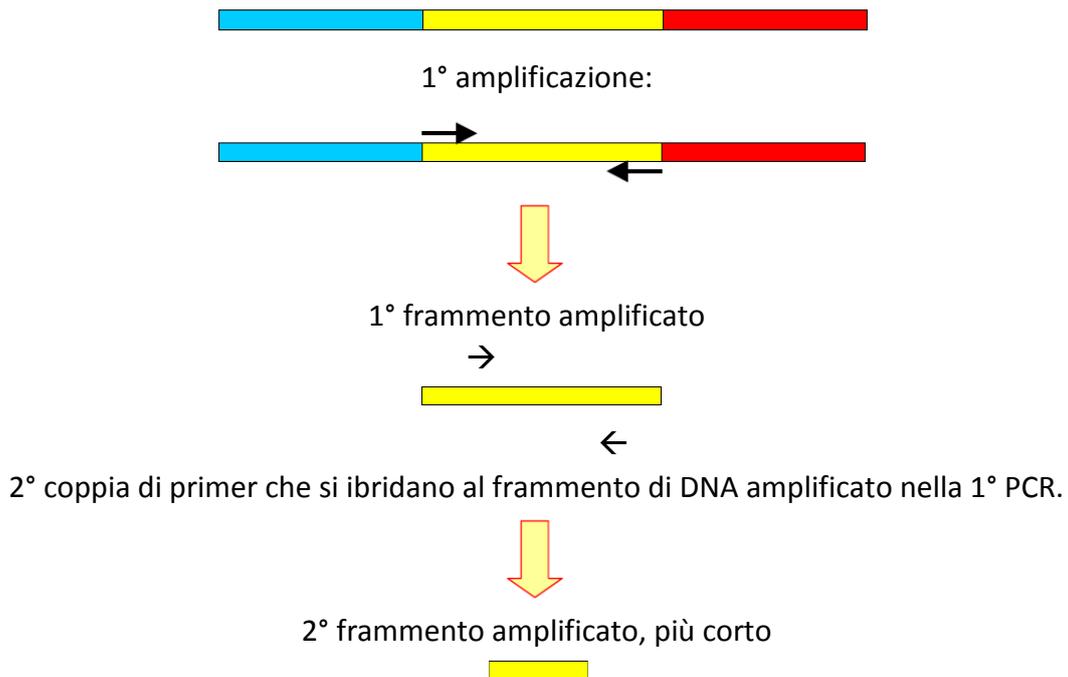
La tecnologia della PCR quantitativa Real-Time legata alla fluorescenza prevede l'uso di:

- coloranti intercalanti nel DNA capaci di emettere fluorescenza (fluorofori), se opportunamente eccitati per quanto riguarda un approccio generale,
- sonde ad ibridazione, di varie tipologie, legate a molecole fluorescenti "reporter" e "quencher", per un approccio di tipo sequenza-specifico.

## PCR Nested

Consiste in una doppia amplificazione mediante l'utilizzo di due coppie di primer diverse. Nella prima amplificazione si ottiene un frammento di DNA che verrà utilizzato da stampo per la seconda: i primers della seconda coppia sono disegnati all'interno del frammento sintetizzato nella prima fase, in modo da ottenere un frammento di amplicone più corto.

Vengono preparati 2 primer che si ibridano alle 2 estremità del frammento di DNA scelto



Questa doppia amplificazione permette di aumentare notevolmente la sensibilità e la specificità della PCR, infatti ottenendo un amplicone più corto si limita ulteriormente la possibilità di cross-reazioni con DNA di altri microrganismi, soprattutto nei casi in cui si ha poco DNA bersaglio o co-infezione, inoltre, la seconda amplificazione esclude la presenza di eventuali aspecifici amplificati nella prima reazione.

# MATERIALI E METODI

## CAMPIONI

E' possibile estrarre il DNA di *Chlamydia Trachomatis* e di *Mycoplasma hominis* dai seguenti campioni:

- tessuto epiteliale cervicale prelevato e conservato mediante metodica Thin-Prep,
- tamponi: vaginale, cervicale, uretrale, congiuntivale,
- sangue,
- urina,
- liquido seminale,
- biopsia tubarica,
- aspirato epididimale, linfonodale o endobronchiale,
- espettorato profondo,
- vetrini istologici in paraffina (studi retrospettivi).

Alcuni esempi di metodi di campionamento e conservazione:

[immagini ricavate dai siti internet delle case produttrici: Hologic per il Thin Prep e Biosigma per gli altri]



Fig. 14 - Thin Prep



Fig. 15 -Tamponi cervicali/  
vaginali



Fig. 16  
Tamponi  
uretrali



Fig. 17 - Urine  
Liquido seminale

Il metodo di campionamento è di fondamentale importanza per qualunque tipo di analisi biologica, chimica o fisica, in quanto da esso dipendono la quantità e la qualità del materiale campionato e di conseguenza incide notevolmente sul risultato finale.

Risulta, inoltre, ovvio che non è sufficiente un metodo di campionamento efficace ed efficiente se non è eseguito da personale esperto e preparato.

L'esecuzione di tamponi è una metodica all'apparenza semplice, ma richiede una preparazione scientifica e tecnica specifica.

Spesso infermiere/i e ostetriche/i eseguono un semplice striscio del tampone sulla parete di interesse, ma gli epiteli vaginale e cervicale sono spesso protetti da uno strato più o meno consistente di muco, il quale, se non rimosso, può influire negativamente sull'estrazione di DNA, in quanto viscoso, appiccicoso e filamentoso, oltre al rischio di prelevare solo muco e non le cellule epiteliali sottostanti, che sono quelle in cui risiedono i patogeni studiati, contribuendo così al possibile ottenimento di falsi negativi.

Un'altra accuratezza a cui è necessario porre attenzione, è l'impiego di gel per l'esecuzione del tampone, che si comporta esattamente come il muco.

Inoltre il tampone è costituito da una piccola porzione di materiale sintetico (preferibile al cotone, che tende a imbibirsi, ostacolando così l'estrazione), di superficie abbastanza liscia, che non consente di prelevare buone quantità di tessuto e devono essere privi di terreno di trasporto, in quanto il terreno è gelatinoso e può rendere difficoltosa l'estrazione del DNA, oltre che contenere sostanze che possono inibire la PCR.

Il campionamento mediante la tecnica Thin Prep è il metodo ideale, in quanto consente di prelevare abbondante materiale cellulare pulito.

Anche questa metodica richiede le stesse accuratezze per l'esecuzione di tamponi, ma il cito-brush è una sorta di spazzolino circolare dotato di piccole setole, per cui consente meglio di "sfregare" il tessuto epiteliale, staccando un sottile strato di cellule che restano adese alle setole, aumentando così la superficie di raccolta e quindi il materiale raccolto, che deve essere poi stemperato nel tampone di trasporto, che lo fissa e, inseguito a centrifugazione eventuali tracce ematiche restano in soluzione, ottenendo così un tessuto "pulito".

Le analisi molecolari, richiedono una notevole attenzione alla conservazione del campione, che deve avvenire a 4 °C per massimo 48 ore o a -20°C per tempi più lunghi, al fine di evitare/ridurre il più possibile la degradazione del DNA e l'insorgenza di muffe nei tamponi, rendendo il campione inutile per ottenere un risultato attendibile.

I campioni utilizzati nel progetto sono stati per la maggior parte prelevati da medici e infermieri del Poliambulatorio Dalla Rosa Prati, debitamente "addestrati" sulle metodiche e le accuratezze da intraprendere o raccolti dai pazienti stessi (liquido seminale).

Ai campioni è stato attribuito un numero di accettazione, utilizzato per renderli anonimi nel progetto, ma appartengono a pazienti che si sono recati presso il centro con regolare richiesta del medico curante per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* e/o di *Mycoplasma hominis*, o hanno richiesto l'esecuzione delle indagini inseguito a informazioni personali.

Molte richieste sono prive di quesito diagnostico, per cui il motivo della richiesta non è noto, ma negli altri casi, sono stati richiesti:

- alle coppie che per i programmi di fecondazione assistita,
- prima di eseguire interventi ginecologici,
- donne in gravidanza come routine nelle prime settimane di gestazione e a termine,
- uomini che hanno avuto rapporti a rischio,
- donne extracomunitarie con più partner e con sintomatologia evidente.

I campioni utilizzati per il progetto sono stati:

- prelievi cervicali in THIN PREP
- tamponi uretrali
- tamponi vaginali e cervicali
- liquidi seminali.

Su questi campioni è stata eseguita una metodica classica:

- per *Chlamydia trachomatis* sono state utilizzate, a seconda della richiesta del paziente/medico metodiche immunocromatografiche (kit commerciale della ditta Biosigma) o di PCR–Nested (Kit commerciale della ditta AB-Analitica);
- per *Mycoplasma hominis* è stato utilizzato il metodo colturale classico.

## **ESTRAZIONE DEL DNA**

L'estrazione del DNA deve avvenire in cappa Biohazard a flusso laminare, utilizzando materiali sterili (puntali con filtro, eppendorf, ecc) ed è fondamentale che l'operatore indossi gli opportuni DPI (Dispositivi di Protezione Individuale) in quanto si tratta di campioni biologici umani, potenzialmente infetti, e per tanto oltre a proteggere il campione da eventuali contaminazioni è necessario proteggere l'operatore.

Tra un campione e l'altro o se si viene a contatto con materiale non sterile, è fondamentale cambiarsi i guanti e gettare il materiale potenzialmente infetto negli appositi contenitori per il trattamento dei rifiuti biologici.

## **PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE**

Indipendentemente dal protocollo di estrazione utilizzato, la fase preliminare di trattamento del campione è sempre la stessa:

- Accendere il bagnetto incubatore a 56 °C;
- Lavorare sotto cappa sterile Biohazard.

### **Per materiale cellulare da THIN PREP:**

- Mescolare accuratamente per inversione il campione THIN PREP, prelevare 1000 µL e riporla in una Eppendorf e centrifugare 10 minuti a 10.000 rpm.
- Eliminare il surnatante (buffer di trasporto). Utilizzare il pellet contenente il tessuto epiteliale per l'estrazione del DNA.
- Normalmente il pellet si presenta biancastro, in rari casi il campione di partenza può essere ematico ma con la centrifugazione le tracce di sangue restano nel surnatante.

### **Per liquido seminale:**

- Prelevare una aliquota di circa 100 µL e riporla in una Eppendorf da 1,5 mL, il liquido seminale è molto vischioso per cui spesso risulta difficile aliquotarlo, risulta più facile utilizzando la pipetta da 1 mL.

### **Per materiale cellulare da TAMPONI A SECCO (VAGINALI, CERVICALI, URETRALI):**

- Porre il tampone in una Eppendorf da 1,5 mL e tagliare l'asticella del tampone con forbice sterile.

### **Kit NucleoSpin Tissue MMEDICAL distribuito da Macherey Nagel**

L'estrazione del DNA genomico avviene mediante un tampone di lisi contenente agenti denaturanti e detergenti. Il lisato viene poi unito ad un tampone di legame ed etanolo in modo da creare le condizioni per far sì che il DNA si leghi alla resina a base di silice, presente all'interno di una mini-colonna. Successivamente vengono poi utilizzate due diverse soluzioni di lavaggio per purificare il DNA da possibili inibitori della PCR.

Il DNA viene poi eluito in un buffer povero di sali o in acqua sterile.

- Aggiungere 180 µL Buffer T1 e 25 µL proteinasi K e vortexare.
- Chiudere con parafilm e porre nel bagnetto a 56°C per minimo 1 ora.
- Aggiungere 200 µL Buffer B3 e vortexare.
- Chiudere con parafilm e porre nel bagnetto a 70°C per 10-15 min.
- Con una pinza sterile eliminare il tampone.
- Aggiungere 210 µL di Etanolo 100% e mix per inversione.
- Porre una colonnina con anello verde sulla provetta di eluizione e trasferire il campione.
- Centrifugare 1 minuto a 11.000 rpm.
- Eliminare l'eluato e cambiare la provetta.
- Aggiungere nella colonna 500 µL di soluzione di lavaggio BW.
- Centrifugare 1 minuto a 11.000 rpm.
- Eliminare l'eluato e cambiare la provetta.
- Aggiungere nella colonna 600 µL di soluzione di lavaggio B5.
- Centrifugare 1 minuto a 11.000 rpm.
- Eliminare l'eluato e cambiare la provetta.
- Centrifugare 1 minuto a 11.000 rpm per asciugare il filtro.
- Trasferire la colonnina su una Eppendorf da 1,5 mL sterile su cui si deve segnare: numero accettazione - DNA.
- Aggiungere nella colonna 80 µL di Elution Buffer (precedentemente scaldato a 70°C).
- Lasciare 2 minuti a temperatura ambiente.
- Centrifugare 1 minuto a 11.000 rpm.

Caricare 5 µL di DNA su Gel d'Agarosio 1,5 % per verificare l'avvenuta estrazione e purificazione.

Conservare il campione di DNA a -20°C.

## Kit DNA IqSystem – Promega

E' un sistema di estrazione e quantificazione del DNA ideato specificamente per l'ambito forense. Questo sistema utilizza una resina costituita da particelle magnetiche con una capacità DNA-legante, per la preparazione di campioni puri a partire da campioni scarsi o di difficile estrazione. La resa tipica è di circa 100 ng. Dal momento che la resa dipende dal metodo di campionamento, dal supporto solido e dal tipo di campione, la metodica è stata adattata ai campioni biologici analizzati.

- Preparare i reagenti:
  - Lysis Buffer: 1  $\mu$ L di DTT 1M ogni 100  $\mu$ L di Buffer di lisi.
  - 1X Wash Buffer(kit per 100 campioni): aggiungere 15 mL Etanolo 100% e 15 mL Isopropanolo al 2X Wash Buffer e cambiare l'etichetta in 1X Wash Buffer.
  - aggiungere 5,5 mL di Incubation Buffer alla Proteinasi K liofilizzata, per ottenere la concentrazione finale di 18 mg/mL, e conservarla a -20 °C.
  - preparare la soluzione Incubation Buffer/ Proteinasi K: per un volume totale di 1000  $\mu$ L = 800  $\mu$ L Incubation buffer + 100  $\mu$ L DTT 1M + 100  $\mu$ L Proteinasi K.
  
- Preparare il campione come descritto in precedenza.
  
- Aggiungere 100  $\mu$ L di Incubation buffer/proteinasi K e incubare a 56° per 1 ora.
- Aggiungere 200  $\mu$ L di Lysis buffer e 7  $\mu$ L di resina, vortex 3 secondi e incubare 5 minuti a temperatura ambiente (ogni minuto di incubazione vortex per 3 sec.).
- Vortex 2 secondi e portte la Ependorf nel supporto magnetico (la resina si separa immediatamente verso il magnete).
- Facendo attenzione a non prelevare la resina, rimuovere il liquido.
- Aggiungere 100  $\mu$ L di Lysis buffer, rimuovere dal supporto e vortex per 2 secondi.
- Riporre la Eppendorf nel supporto magnetico e rimuovere il Lysis Buffer.
- Aggiungere 100  $\mu$ L di 1X Wash buffer, rimuovere dal supporto e vortex per 2 secondi.
- Riporre la Eppendorf nel supporto magnetico e rimuovere il liquido.
- Ripetere con altri 2 lavaggi da 100  $\mu$ L ciascuno di 1X Wash buffer.
- Rimuovere tutto il Wash buffer e lasciare asciugare la resina all'aria per 5 minuti (non superare i 20 minuti).
- Aggiungere 100  $\mu$ L di Elution Buffer e vortex 2 secondi.
- Incubare 5 minuti a 65 °C.
- Vortex 2 secondi e riporre la Eppendorf nel supporto magnetico.
- Trasferire la soluzione contenente il DNA in una nuova Eppendorf sterile.
  
- Conservare il campione di DNA a -20 °C.

## **ANALISI SPETTROFOTOMETRICA (GeneQuant Pro)**

L'analisi spettrofotometrica è necessaria per quantificare il DNA estratto dai campioni e per valutarne la purezza.

Le soluzioni proteiche, il DNA e l'RNA assorbono la luce in una regione di lunghezze d'onda compresa tra 210 e 300 nm; le soluzioni di DNA e RNA hanno un massimo di assorbimento a 260 nm, mentre le soluzioni proteiche a 280 nm.

Per una quantificazione approssimativa lo strumento va impostato sull'analisi "DNA" con i seguenti parametri: cammino ottico a 10 mm e fattore di diluizione a 30 e si deve settare il riferimento iniettando 290 µL di H<sub>2</sub>O sterile in una cuvetta di quarzo (trasparente agli UV) che va inserita nella finestra dello strumento e si avvia l'analisi. Svuotare la cuvetta ed iniettare 10 µL di campione + 290 µL di H<sub>2</sub>O sterile; inserire nello strumento e avviare l'analisi.

Tra un campione e l'altro si deve lavare la cuvetta con H<sub>2</sub>O sterile in modo che non restino tracce che possono influenzare l'analisi del campione successivo e prima di procedere con il nuovo campione si deve analizzare un bianco (H<sub>2</sub>O sterile) per verificare che la cuvetta sia pulita.

Se nel campione è presente DNA lo strumento fornisce come risultato una curva (che per il bianco non deve esserci) con un picco a circa 260 nm; quindi se non si vede il picco il DNA non è stato estratto.

Esempio di curve tipiche:



Fig. 18 Esempi di curve di quantificazione

Lo strumento fornisce inoltre la concentrazione del DNA e i rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280.

Per valutare la purezza del DNA è importante il rapporto A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>:

- se compreso tra 1.800 e 2.000 (circa) si ha DNA puro;
- se maggiore di 2.000 è inquinato da RNA;
- se minore di 1.800 è inquinato da proteine.

Per una quantificazione precisa lo strumento va impostato sull'analisi "OLIGO" con i seguenti parametri: cammino ottico a 10 mm e fattore di diluizione a 30 e si deve settare il riferimento iniettando 260 µL di H<sub>2</sub>O sterile e 25 µL di NaOH nella cuvetta di quarzo.

Svuotare la cuvetta e iniettare 260 µL di H<sub>2</sub>O distillata sterile + 25 µL di NaOH + 15 µL di campione purificato; coprire la cuvetta con parafilm e mischiare gentilmente per inversione in modo da facilitare la denaturazione del DNA, riporre la cuvetta nello spettrofotometro e avviare l'analisi.

Per determinare una quantificazione precisa si effettuano 3 analisi successive dello stesso campione e per ognuna, 3 misure, poi viene calcolata la media delle 3 misure e la media delle medie delle 3 analisi.

Sulla base della quantificazione effettuata bisogna, se necessario, procedere alle diluizioni dei campioni con H<sub>2</sub>O bidistillata sterile in modo da avere la stessa concentrazione di DNA in ognuno e controllare l'effettiva concentrazione con un'ulteriore analisi con spettrofotometro in triplo.

Il DNA estratto è stato in alcuni casi quantificato anche tramite gel elettroforesi (Sambrook, et al 1989) utilizzando il marcatore di peso molecolare  $\lambda$  DNA digerito con enzima di restrizione *HindIII*. Per la determinazione della concentrazione e delle dimensioni dei DNA genomici estratti, sono state caricate su un gel di agarosio delle aliquote di 5  $\mu$ L con concentrazione 0,8%, separate mediante elettroforesi in un tampone di TAE 1X.

La visualizzazione del gel di agarosio e la quantificazione delle bande di DNA genomico rilevate è stata effettuata mediante il software e lo strumento UV Bio-Rad Gel Doc 2000 image detector.

Questo è servito per verificare l'attendibilità della quantificazione mediante lo spettrofotometro, per tanto si è deciso di procedere con l'analisi spettrofotometrica, con tre ripetizioni per ciascun campione, tenendo poi la media, questa si è visto rispecchiare la quantificazione su gel.

## CONTROLLO DI AMPLIFICAZIONE

Come controllo di adeguatezza del campione e di tutto il processo analitico è stata amplificata e rivelata con la stessa metodica rapida il gene della  $\beta$ -globina che è sempre presente nel DNA genomico umano, pertanto consente di verificare che il DNA sia stato estratto correttamente e che non contenga inibitori della reazione.

Sono stati utilizzati i primers GH20 e PCO4, ampiamente descritti in letteratura (Saiki et al., 1988):

- Primer GH20: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' (20 bp)
- Primer PCO4: 5' CAACTTCATCCACGTTACC 3' (20 bp)

Dal database NCBI si è ricavata la sequenza completa del gene (se ne riporta solo una prima parte in quanto molto lunga): (FASTA format)

```
>gi|302313136|gb|GU324922.1| Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB) gene, complete cds
TTTCACATATACATGCCCTCTTATATCAGGGATGTGAAACAGGGTCTTGAAAACCTGTCTAAATCTAAAACA
ATGCTAATGCAGGTTTAAATTTAATAAAAATAAAATCCAAAATCTAACAGCCAAGTCAAATCTGCATGTTT
TAACATTTAAAATATTTTAAAGACGTCCTTTCCAGGATTCAACATGTGAAATCTTTTCTCAGGGATACA
CGTGTGCCTAGATCCTCATTGCTTTAGTTTTTACAGAGGAATGAATATAAAAAGAAAATACTTAAATTT
TATCCCTCTTACCTCTATAATCATAACATAGGCATAATTTTTTAACCTAGGCTCCAGATAGCCATAGAAGA
ACCAAACACTTTCTGCGTGTGTGAGAATAATCAGAGTGAGATTTTTTCCACAAGTACCTGATGAGGGTTGA
GACAGGTAGAAAAGTGAGAGATCTCTATTTATTTAGCAATAATAGAGAAAGCATTTAAGAGAATAAAGC
AATGGAAATAAGAAATTTGTAAATTTCTTCTGATAACTAGAAATAGAGGATCCAGTTTCTTTTGGTTAA
CCTAAATTTTATTTTCATTTTATTGTTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTGTGTAATCGTAGTTTCA
GAGTGTTAGAGCTGAAAGGAAGAAGTAGGAGAAACATGCAAAGTAAAAGTATAACACTTTCCTTACTAAA
CCGACATGGGTTTCCAGGTAGGGGCAGGATTCAGGATGACTGACAGGGCCCTTAGGGAACACTGAGACCC
TACGCTGACCTCATAAATGCTTGCTACCTTTGCTGTTTTAATTACATCTTTTAATAGCAGGAAGCAGAAC
TCTGCACTTCAAAGTTTTTCTCACCTGAGGAGTTAATTTAGTACAAGGGGAAAAGTACAGGGGGATG
GGAGAAAGGCGATCACGTTGGGAAGCTATAGAGAAAGAAGAGTAAATTTTAGTAAAGGAGGTTTAAACAA
ACAAAATATAAAGAGAAATAGGAACCTGAATCAAGGAAATGATTTTAAAACGCAGTATTCTTAGTGGACT
AGAGGAAAAAATAATCTGAGCCAAGTAGAAGACCTTTTCCCCTCCTACCCCTACTTTCTAAGTCACAGA
GGCTTTTTGTTCCTCCAGACACTCTTGCAGATTAGTCCAGGCAGAAACAGTTAGATGTCCCAGTTAACC
TCCTATTTGACACCCTGATTACCCCATGATAGTCACACTTTGGGTTGTAAGTGACTTTTTATTTATTT
GTATTTTGTACTGCATTAAGAGGTCTCTAGTTTTTTATCTCTTGTTCCTTCCAAAACCTAATAAGTAACTAA
TGCACAGAGCACATTGATTTGTATTTATCTATTTTTAGACATAATTTATTAGCATGCATGAGCAAATTA
AGAAAAACAACAACAATGAATGCATATATATGTATATGTATGTGTATATATACACACATATATATAT
ATATTTTTTCTTTTCTTACCAGAAGGTTTTAATCCAATAAGGAGAAGATATGCTTAGAACCGAGGTAGA
GTTTTTCATCCATTCTGTCCGTGTAAGTATTTTGCATATTTCTGGAGACGCAGGAAGAGATCCATCTACATAT
CCCAAAGCTGAATTATGGTAGACAAAACCTTCCACTTTTAGTGCATCAACTTCTTATTTGTGTAATAAG
AAAATGGGAAAACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTGTGATTCCAAATATTACGTAAATACACTTGCA
AAGGAGGATGTTTTTAGTAGCAATTTGTACTGATGGTATGGGGCCAAGAGATATATCTTAGAGGGAGGGC
TGAGGGTTTGAAGTCCAACCTTAAGCCAGTGCCA GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTA
GACCTCACCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCA
GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACT
AGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGG
CAA GGTGAACCTGGATGAAGTTG GTGGT GAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
AAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCT
CTCTGCCATTGGTCTATTTTCCCACCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTG
AGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAA
AGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGT
GAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACCTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTT
TTCTTTCCC...
```

Con i primers sopra descritti si amplifica una regione di 268 bp:

GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTACTC  
 CCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGAC  
 ACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTG  
 TGGGGCAAAGTGAACGTGGATGAAGTTG

La ricerca di omologie di sequenza del frammento amplificato mediante il database BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ha dato solo allineamenti con il gene della  $\beta$ -globina:

Sequences producing significant alignments:

| Accession                  | Description  | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|----------------------------|--|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|-------|
| <a href="#">GU324922.1</a> | Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB) gene, complete cds | 44.1      | 1026        | 100%           | 3e-08   | 100%      |       |

```
>gb|GU324922.1| D Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB) gene, complete cds
Length=19006

Score = 496 bits (268), Expect = 4e-137
Identities = 268/268 (100%), Gaps = 0/268 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACACCC 60
            |||
Sbjct 1856   GAAGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACACCC 1915

Query 61     TAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAA 120
            |||
Sbjct 1916   TAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAAA 1975

Query 121    GTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAA 180
            |||
Sbjct 1976   GTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAA 2035

Query 181    CCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTG 240
            |||
Sbjct 2036   CCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTG 2095

Query 241    TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG 268
            |||
Sbjct 2096   TGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG 2123
```

Fig. 19 Allineamento del frammento amplificato mediante BLAST

Il frammento che si amplifica è localizzato tra 1856 bp e 2123 bp.

## PRIMERS SPECIFICI PER *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

I primer per *Chlamydia trachomatis*, utilizzati per la messa a punto del metodo, sono stati disegnati sulla base della sequenza del gene (CrP) di una proteina di membrana di 60kDa ad alto contenuto di cisteine “Chlamydia cysteine rich outer membrane protein gene” (GenBank: X53510.1), questa proteina è stata scelta in quanto la sua sequenza si è visto essere specifica per *Chlamydia trachomatis* e pertanto si è ritenuto essere un buon oggetto di studio.

La ditta Alfa Wassermann ha fornito il Controllo Positivo costituito proprio da un frammento della regione 60 KD del gene CrP di *Chlamydia trachomatis* clonato in plasmide.

La sequenza del gene di origine è lunga 2385 bp ed è localizzata nel DNA genomico di *Chlamydia trachomatis* (B/jali20/OT), in cui inizia a 516581 bp e termina a 514196 bp.

Dal database NCBI si è ricavata la sequenza completa del gene: (FASTA format)

>gi|40681|emb|X53510.1| Chlamydia 60kDa cysteine rich outer membrane protein gene

```
CTCTTTGAATCCGAGCTGTTTATTATTTTATTTTGTGGCTTTGATTGCTAATTACCTGTTATTAGACGATTTGTTTTAAAAACAATT
GATATAATTTTTATTTATAATGTAATATTGTCTATGAGGGCTAGTTTCTTTTATTGTTAAAAGAATTGCTTTTATCGATAAAAGAAA
CTTCAAGAGCCCTTTTCTAGAAAAGGAGTCTGGAAGTTATGAAAAAACTGCTTTACTCGCTGCTTTATGTAGTGTTGTTTCTTTAAG
TAGTTGTTGTCGTATCGTTGACTGTTGCTTGAAGATCCATGCGCACCTATCCAATGTTACCTTGTGAATCTAAGAAGAAAGACGT
AGACGGTGGTTGCAACTCTTGAACGGGTATGTCCAGCTTCAAACCTTGGGAGGGGATACGCACCAAGATGCTAAACATGGC
CCTCAAGCTAGAGGAATTCCAGTTGACGGCAAATGCAGACAATAGGTAGCGCAAGTTAAGAGCCTACCCACAACAGATGTAGTTA
GTAAGGAAGTTGGCTTCTACTAACTATTTGCGCTAACAGAAAATGTTGAGGGTAAAAGTTAGTTAATAACAATTTCTACCCGAT
GGCAGACAAAAATAATCTATGCGAATAGGAGATCCTATGAACAACTCATCAGACGAGCAGTGACGATCTTCGCGGTGACTAGT
GTGGCGAGTTTATTTGCTAGCGGGGTGTAGAGACCTCTATGGCAGAGTCTCTCTACAAACGTTATTAGCTTAGCTGACACCAA
AGCGAAAAGACAACACTTCTATAAAAGCAAAAAAGCAAGAAAAAACACAGCAAAGAGACTCCCGTAGACCGTAAAAGAGTTGC
TCCGGTTCATGAGTCTAAAGCTACAGGACCTAAACAGGATTCTGCTTTGGCAGAATGTATACAGTCAAAGTTAATGATGATCGCA
ATGTTGAAATCACACAAGCTGTTCTGAATATGCTACGGTAGGATCCTATCCTATTGAAATTAAGTCTACAGGTAAGAGGGATT
GTGTTGATGTTATCATTACTCAGCAATTACCATGTGAAGCAGAGTTCGTACGCAGTGATCCAGCGACAACCTCTACTGCTGATGGT
AAGCTAGTTTGGAAAATTGACCGCTTAGGACAAGCGAAAAGAGTAAAATTACTGTATGGGTAAAACCTCTAAAGAAGGTTGCT
GCTTACAGCTGCAACAGTATGCGCTTGTCCAGAGATCCGTTGTTTACAAAATGTGGACAACCTGCTATCTGTGTTAAACAAGAA
GGCCAGAGAATGCTTGTGCTTGGCCAGTAGTTTACAAAATTAATATAGTGAACCAAGGAACAGCAACAGCTCGTAACGTTGT
TGTTGAAAATCCTGTTCCAGATGGTTACGCTCATTCTTCTGGACAGCGTGTACTGACGTTTACTCTGGAGATATGCAACCTGGAGA
GCACAGAACAATTACTGTAGAGTTTTGTCGCTTAAACGTGGTGTGCTACCAATATAGCAACGGTTTCTACTGTGGAGGACATA
AAAATACAGCAAGCGTAACAACTGTGATCAACGAGCCTTGGCTACAAGTAAGTATTGCAGGAGCAGATTGGTCTTATGTTTGTAA
GCCTGTAGAATATGTGATCTCCGTTTCCAATCCTGGAGATCTTGTGTTGCGAGATGTCGTCGTTGAAGACTCTTTCTCCCGGAGT
CACAGTTCTTGAAGCTGCAGGAGCTCAAATTTCTTGAATAAAGTAGTTTGGACTGTGAAAGAACTGAATCCTGGAGAGTCTCTAC
AGTATAAAGTTCTAGTAAGAGCACAACTCCTGGACAATTCACAAATAATGTTGTTGTGAAGAGCTGCTCTGACTGTGGTACTTGT
ACTTCTTGCAGAAAGCGACAACCTTACTGAAAAGGAGTTGCTGCTACTCATATGTGCGTAGTAGATACTTGTGACCCTGTTTGTGT
AGGAGAAAATACTGTTTACCGTATTTGTGTCACCAACAGAGTTCTGCAGAAGATACAAATGTTTCTTAAATGCTTAAATCTCTAA
AGAACTGCAACCTGTATCCTTCTGACCAACTAAAGGAACGATTACAGGCAATACAGTAGTATTTCGATTGTTACCTAGATTAG
GTTCTAAAGAACTGTAGAGTTTTCTGTAACATTGAAAGCAGTATCAGCTGGAGATGCTCGTGGGGAAGCGATTCTTTCTCCGAT
ACATTGACTGTTCCAGTTTCTGATACAGAGAATACACACATCTATTAATCTTTGATTTTATCGATGTGTAGGTGCCGTCCAGGGATT
CCTGGGCGGCTTTTTTTGTTATCTATATGAAAATAAAGAGTTTCATTTTCGTTCTC
```

Nel gene sono state evidenziate in giallo le sequenze corrispondenti ai primer disegnati:

- Primer Forward (CHL+): 5' GAGGTTGCTCCGGTTCATGA 3' (20 bp)
- Primer Reverse (CHL-): 5' GTAATGATAACATCAACACAATCCCTTT 3' (28 bp)

Il frammento amplificato è lungo 200 bp:

5' **GAGGTTGCTCCGGTTCATGA** GTCTAAAGCTACAGGACCTAACAGGATTCTTGCTTTGGCAGAATGTATA  
CAGTCAAAGTTAATGATGATCGCAATGTTGAAATCACACAAGCTGTTCTGAATATGCTACGGTAGGATCTC  
CCTATCCTATTGAAATTACTGCTACAGGTA**AAAGGGATTGTGTTGATGTTATCATTAC** 3'

La ricerca di omologie di sequenza del frammento amplificato mediante il database BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ha dato solo allineamenti con il genoma di *Chlamydia trachomatis*:

```
>[emb|FM872308.1] [D] Chlamydia trachomatis B/Jali20/OT, complete genome
Length=1044352

Score = 370 bits (200), Expect = 6e-104
Identities = 200/200 (100%), Gaps = 0/200 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      GAGGTTGCTCCGGTTCATGAGTCTAAAGCTACAGGACCTAACAGGATTCTTGCTTTGGC 60
            |||
Sbjct 515725  GAGGTTGCTCCGGTTCATGAGTCTAAAGCTACAGGACCTAACAGGATTCTTGCTTTGGC 515666

Query 61     AGAATGTATACAGTCAAAGTTAATGATGATCGCAATGTTGAAATCACACAAGCTGTTTCT 120
            |||
Sbjct 515665  AGAATGTATACAGTCAAAGTTAATGATGATCGCAATGTTGAAATCACACAAGCTGTTTCT 515606

Query 121    GAATATGCTACGGTAGGATCTCCCTATCCTATTGAAATTACTGCTACAGGTA AAAAGGGAT 180
            |||
Sbjct 515605  GAATATGCTACGGTAGGATCTCCCTATCCTATTGAAATTACTGCTACAGGTA AAAAGGGAT 515546

Query 181    TGTGTTGATGTTATCATTAC 200
            |||
Sbjct 515545  TGTGTTGATGTTATCATTAC 515526
```

Fig. 20 - Allineamento del frammento amplificato mediante BLAST

## PRIMERS SPECIFICI PER *MYCOPLASMA HOMINIS*

I primers per *Mycoplasma hominis*, utilizzati per la messa a punto del metodo, sono stati disegnati sulla base della sequenza del gene di una fosfatasi “protein phosphatase” tipica di questo microrganismo, e quindi altamente specifica.

La ditta Alfa Wassermann ha fornito il Controllo Positivo costituito proprio da un frammento del gene della fosfatasi di *Mycoplasma hominis* clonato in plasmide.

Il gene che codifica per questa proteina è lungo 756 bp, situato sul genoma di *Mycoplasma hominis* tra 606073 bp e 606828 bp.

Dal database NCBI si è ricavata la sequenza completa del gene: (FASTA format)

```
>gi|268322399:606073-606828 Mycoplasma hominis strain PG21, chromosome, complete genome  
GenBank: FP236530.1
```

```
ATGGTAGACTTTTGCATAGCGTCAGATCAAGGAAAGTTTAGAAAAGAAAACCAAGATAGAGCCATTGTTG  
TTAATGGAGAGTATTGAACATTGGCTGCTTTGTGTGATGGTATGGGTGGACATGTTGGCGGTAGCCAATG  
TTCAACATTATCAACTAATAGTATTAACAATATTTCCCTAGACACATTTCCCTCAAAGTTGGAATGTAGT  
GATAAAAAAACGTTAGCAAATGATTTAACAATGCAATAAGCTTTATAAAGAAGCTTTAGTTAATTATG  
CAAAGAGTATACTGAATTTGAAGATATGGGGACTACAATGGTTGTTGCCCTCATTTTTAATGCAAATGG  
TTTAGCTTATGTCTTTAATATTGGTGATTCACGCTTGTATGCATACAATGGATTACTTTATCAAATCACA  
GAAGATCAAATTTATTTATATCAGTTAATGAGAGAATTTAATTTAACATACGAAGAAGCAGCATTAGATC  
CTAATTCATACAAACTTATAAGTTGTCTAGGACC AAATAAAAAACCAATTGTCAATCATTTTTTATATC  
ACAAAAATCAGCAGTTAAATATTTATTTAATTAACATCCGATGGATTACACGATTATGTTTCTAAACCAATA  
ATAGAACTGTTTTGCAAACAAATAAGAGTTTAAAAGATAAGTTAAACCTTCTAATAAAATATGCCAAAA  
AAATCTTTCAAAGACAATATAACCGGAATTCCTTGTGGGGTTGAAAAATGAATAA
```

Nel gene sono state evidenziate in giallo le sequenze corrispondenti ai primers disegnati:

Primer Forward (MYC HOM+) 5' GGTGATTCACGCTTGTATGC 3' (20 bp)

Primer Reverse: (MYC HOM -) 5' GGTCTAGACAACCTTATAAG 3' (20 bp)

Il frammento amplificato è lungo 152 bp:

```
5' GGTGATTCACGCTTGTATGCATACAATGGATTACTTTATCAAATCACAGAAGATCAAATTTATATC  
AGTTAATGAGAGAATTTAATTTAACATACGAAGAAGCAGCATTAGATCCTAATTCATACAAA  
CTTATAAGTT  
GTCTAGGACC 3'
```

La ricerca di omologie di sequenza del frammento amplificato mediante il database BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ha dato solo allineamenti con il genoma di *Mycoplasma hominis*:

```
> emb|FP236530.1| D Mycoplasma hominis strain PG21, chromosome, complete genome
Length=665445

Features in this part of subject sequence:
  Protein phosphatase

Score = 281 bits (152), Expect = 6e-73
Identities = 152/152 (100%), Gaps = 0/152 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GGTGATTCACGCTTGTATGCATACAATGGATTACTTTATCAAATCACAGAAGATCAAAAT 60
            |||
Sbjct 606445  GGTGATTCACGCTTGTATGCATACAATGGATTACTTTATCAAATCACAGAAGATCAAAAT 606504

Query 61     TATTTATATCAGTTAATGAGAGAATTTAATTTAACATACGAAGAAGCAGCATTAGATCCT 120
            |||
Sbjct 606505  TATTTATATCAGTTAATGAGAGAATTTAATTTAACATACGAAGAAGCAGCATTAGATCCT 606564

Query 121    AATTCATACAAACTTATAAGTTGTCTAGGACC 152
            |||
Sbjct 606565  AATTCATACAAACTTATAAGTTGTCTAGGACC 606596
```

Fig. 21 - Allineamento del frammento amplificato mediante BLAST

## THERMAL CYCLER NON CONVENZIONALE

E' stato utilizzato un Termociclatore non convenzionale della Finnzymes fornito dalla ditta Euroclone: **PIKO-24 Thermal Cycler** [Fig. 22].



Fig. 22 – PIKO Thermal Cycler- Finnzymes

### Caratteristiche tecniche:

- Range di temperatura del blocco: da 0 °C a 99,9 °C
- Uniformità di temperatura del blocco: +/- 0,3 °C entro 1 sec. a 95 °C
- Accuratezza di controllo della temperatura: +/- 0,2 °C
- Alta velocità di ramping tra gli step del ciclo termico (8 °C/sec.)
- Piccoli volumi di reagenti
- Occupa poco spazio (16 x 17 x 23 cm) nella versione 24 campioni (volume massimo 50 µL)
- Possibile averlo anche da 96 campioni (volume massimo 20 µL)
- Oltre 1000 programmi memorizzabili

Con il PIKO Thermal Cycler sono state utilizzate provette con spessore ultrasottile (UTW), che facilitano lo scambio termico, consentendo, quindi, di ottenere il massimo delle prestazioni.

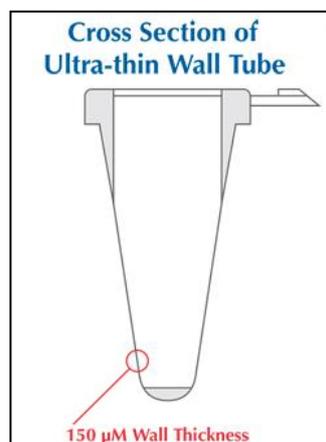


Fig. 23 – Sezione di provetta UTW

## REQUISITI PER LA PREPARAZIONE DELLA PCR PHUSION

Per la Master Mix sono stati utilizzati i reagenti forniti dalla ditta Finnzymes, abbinati alla **Phusion High-Fidelity DNA Polymerase**.



Fig. 24 – Schema strutturale di Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (da sito Web Finnzymes)

La polimerasi Phusion High-Fidelity è costituita da un dominio di legame dsDNA-binding (Fig.24 - viola) fuso con un enzima proofreading “di correzione” *Pyrococcus*-like enzyme (Fig. 24 - verde), formando una unica polimerasi ad alta performance.

Questo dominio consente di aumentare l'affinità della polimerasi Phusion al DNA a doppio filamento, permettendo, così, l'incorporazione di più nucleotidi a ogni legame e diminuendo il numero di legami richiesti per l'allungamento.

Questa fusione consente alla Phusion DNA polimerasi di generare prodotti PCR con precisione e velocità irraggiungibili con un singolo enzima, anche sui templati più difficili. Inoltre, questo enzima è in grado di amplificare frammenti lunghi (ad esempio 7,5 kb di genoma umano o 20 kb di DNA  $\lambda$ , utilizzati dalla Finnzymes nei test di controllo della qualità).

Il processamento della Phusion DNA polimerasi è circa 10 volte superiore a quella della DNA polimerasi di *Pyrococcus furiosus* e due volte quella di *Thermus aquaticus*.

Questo notevole aumento nei risultati del processamento porta solo a tempi più brevi di estensione, ma ad una amplificazione più robusta e alla capacità di amplificare frammenti più lunghi. La Phusion DNA polimerasi, inoltre, consente di ottenere rendimenti più elevati con quantità inferiori di enzima rispetto alle tradizionali polimerasi.

Grazie a queste caratteristiche uniche, la Phusion DNA polimerasi può essere utilizzata per le PCR di routine e per tutte le applicazioni che richiedono grande precisione di amplificazione.

### Caratteristiche:

- **Accuratezza:** massima precisione, riduzione degli errori: tasso di errore pari a  $4,4 \times 10^{-7}$
- **Velocità:** aumentato processamento in tempi ridotti
- **Robustezza:** minor numero di reazioni fallite e minima ottimizzazione
- **Alto rendimento:** aumento delle rese del prodotto con quantità minime di enzima
- **Specificità:** modifiche hot start riducono amplificazioni non specifiche e degradazione dei primers

## REQUISITI PER LA PREPARAZIONE DELLA MASTER MIX :

| Reagenti               | 20 $\mu$ L reazione | Concentrazione finale |
|------------------------|---------------------|-----------------------|
| H <sub>2</sub> O       | x $\mu$ L           |                       |
| 5x Phusion HF buffer   | 4 $\mu$ L           | 1X                    |
| 10 mM dNTPs            | 0,4 $\mu$ L         | 200 $\mu$ M ciascuno  |
| Primer F               | x $\mu$ L           | 0,5 $\mu$ M           |
| Primer R               | x $\mu$ L           | 0,5 $\mu$ M           |
| DMSO                   | 0,6 $\mu$ L         | 3%                    |
| Phusion DNA Polymerase | 0,2 $\mu$ L         | 0,02 U/ $\mu$ L       |
| DNA                    | X $\mu$ L           | 20-100 ng/20 $\mu$ L  |

Tab.2 Preparazione della Master Mix

### Enzima:

La quantità ottimale di enzima per la reazione di PCR dipende dalla concentrazione del DNA bersaglio e dalla lunghezza del prodotto PCR.

Normalmente 1U di Phusion High-Fidelity DNA Polymerase per un volume di reazione di 50  $\mu$ L consente di ottenere buoni risultati, ma l'intervallo ottimale dovrebbe essere tra 0,5 e 2 unità per 50  $\mu$ L di volume, in base alla concentrazione e alla lunghezza del DNA bersaglio.

E' importante non superare 2 U/50  $\mu$ L (0,04 U/ $\mu$ L), soprattutto per ampliconi superiori a 5 kb.

### Buffer:

Nel kit sono forniti due Buffer: 5X Phusion HF e 5X Phusion GC.

Il 5X Phusion HF Buffer deve essere utilizzato per amplificazioni con elevate prestazioni, in quanto ha un tasso di errore dichiarato pari a  $4,4 \times 10^{-7}$ , decisamente inferiore rispetto a quello del 5X Phusion GC Buffer ( $9,5 \times 10^{-7}$ ).

Il 5X Phusion GC Buffer è in grado di migliorare la prestazione della Phusion DNA Polymerase se si ha a che fare con templati lunghi, difficili, ricchi in GC o con strutture secondarie complesse.

### Magnesio:

La concentrazione di Mg<sup>2+</sup> è sempre critica nella messa a punto delle reazioni di PCR, ma in particolare per la Phusion DNA Polymerase, in quanto è un enzima magnesio-dipendente.

Un eccesso di Mg<sup>2+</sup> può stabilizzare l'appaiamento di primer in siti sbagliati del DNA bersaglio creando artefatti e diminuendo così la specificità; mentre una concentrazione troppo bassa può portare a una scarsa concentrazione dell'amplicone.

La concentrazione ottimale di Mg<sup>2+</sup> dipende dalla concentrazione dei dNTPs, del bersaglio e dalla composizione del buffer; normalmente è quindi compresa tra 0,5 e 1 mM sulla concentrazione totale dei dNTPs di una PCR standard.

Se il buffer, i dNTPs contengono degli agenti chelanti, come EDTA, la concentrazione di Mg<sup>2+</sup> deve essere aumentata di 0,2 mM.

### dNTPs

Con la Phusion DNA Polymerase dovrebbero essere utilizzati High Fidelity dNTPs, per risultati ottimali deve sempre essere utilizzata una concentrazione di 200  $\mu$ M per ciascun dNTP.

### DNA bersaglio:

Dalle linee guida generali, per DNA a bassa complessità la concentrazione del bersaglio deve essere compresa tra 1 pg e 10 ng/50  $\mu$ L, mentre per DNA genomici complessi deve essere compresa tra 50 e 250 ng/  $\mu$ L.

### DMSO:

Per templati ad alto contenuto di GC alla master mix deve essere aggiunto il 3% di DMSO, per facilitare la denaturazione del DNA.

Se si utilizzano alte concentrazioni di DMSO, per DNA templati non ad elevato contenuto in GC, si abbassa la temperatura di annealing, perché il DMSO contribuisce ad abbassare la temperatura di melting dei primers. E' stato riportato che il 10% di DMSO diminuisce la temperatura di annealing di 5,5-6,0°C.

## REQUISITI PER IL PROTOCOLLO TERMICO

| Step                   | Temperatura | Tempo     | Cicli |
|------------------------|-------------|-----------|-------|
| Denaturazione iniziale | 98°C        | 30 sec    | 1     |
| Denaturazione          | 98°C        | 5-10 sec  | 25-35 |
| Annealing              | X°C         | 10-30 sec |       |
| Extension              | 72°C        | 15-30 sec |       |
| Extension finale       | 72°C        | 5-10 min  | 1     |

Tab. 3 Protocollo termico base

Primer annealing: la Phusion DNA polimerasi ha la capacità di stabilizzare l'ibridazione dei primers al DNA bersaglio.

Come regola di base:

Per primer >20 nt: utilizzare  $T_a = [T_m \text{ più bassa tra le } T_m \text{ dei 2 primers}] + 3^\circ\text{C}$

Per primer  $\leq 20$  nt: utilizzare  $T_a = [T_m \text{ più bassa tra le } T_m \text{ dei 2 primers}]$

La Temperatura di melting è stata calcolata dal software specifico presente sul sito internet della ditta Finnzymes: [https://www.finnzymes.fi/tm\\_determination.html](https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html)

### Tm calculator

This application calculates the Tm for a primer, and gives instructions on how to dilute the primer to a desired concentration.

> [How to use this calculator](#)

The application requires Java Virtual Machine.

> [Download Java](#)

#### Important notes

- If the PCR primer contains desired mismatches, e.g. for creating a mutation or a restriction site, make sure to calculate the Tm only for the correctly matched sequence.
- To determine **annealing temperature** for PCR, [read these instructions](#).

Type in or paste your sequence here:

5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

20nt: A=8.0 T=1.0 C=4.0 G=7.0 CG=55.0%

PCR conditions

Primer Conc:   $\mu$ M

Salt Conc:  mM

#### Result

**Tm = 60.82 °C** (Modified Breslauer's thermodynamics, dH° and dS° parameters \*)

This calculation method is recommended when setting up reactions with Finnzymes' DNA polymerases

Fig. 25 Software Tm calculator - Finnzymes

#### $\beta$ -Globina:

Primer GH20: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' (20 bp)  $\rightarrow$  60,82 °C

Primer PC04: 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3' (20 bp)  $\rightarrow$  63,51 °C

#### *Chlamydia trachomatis*:

Primer Forward (CHL+): 5' GAGGTTGCTCCGGTTCATGA 3' (20 bp)  $\rightarrow$  67,81 °C

Primer Reverse (CHL-): 5' GTAATGATAACATCAACACAATCCCTTT 3' (28 bp)  $\rightarrow$  64,82 °C

#### *Mycoplasma hominis*:

Primer Forward (MYC HOM+) 5' GGTGATTCACGCTTGTATGC 3' (20 bp)  $\rightarrow$  63,55 °C

Primer Reverse: (MYC HOM -) 5' GGTCTAGACAACCTTATAAG 3' (20 bp)  $\rightarrow$  50, 23 °C

Sulla base delle temperature di melting dei primers sono state calcolate le temperature di annealing di partenza per la messa a punto dei protocolli, mediante la regola sopra descritta:

- $\beta$ -Globina: (Ta = Tm più bassa tra quelle dei 2 primers)  $\rightarrow$  Ta = 61 °C
- *Chlamydia trachomatis*: (Ta= Tm più bassa tra quelle dei 2 primers)  $\rightarrow$  Ta = 65 °C
- *Mycoplasma hominis*: (Ta= Tm media in quanto molto diverse tra loro)  $\rightarrow$  Ta = 57°C

Inizialmente sono state messe a punto separatamente le PCR rapide per *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* e  $\beta$ -Globina.

Dopo diverse prove con gradienti della temperatura di annealing e variando la quantità dei primers si sono definiti i seguenti protocolli, ovvero quelli che hanno consentito una maggiore efficienza anche con quantità di DNA scarse (buona e specifica rivelazione dell'amplicone).

### **PCR RAPIDA PER CHLAMYDIA TRACHOMATIS**

Per ogni amplificazione utilizzare sempre il controllo positivo, il controllo negativo, e un controllo interno di amplificazione ( $\beta$ -globina).

Preparare i campioni per l'amplificazione secondo la master mix illustrata precedentemente e amplificare seguendo il ciclo specifico:

#### **Thermal Cycler PIKO:**

98 °C 30 sec.  
98 °C 5 sec }  
62 °C 15 sec. } 25 cicli  
72 °C 15 sec. }  
72 °C 5 min.

Dopo l'amplificazione caricare 10  $\mu$ l di amplicone su gel di agarosio al 2 % con Marker di corsa 100 bp.

La banda di amplificazione specifica è: ***Chlamydia* → 200 bp**

### **PCR RAPIDA PER MYCOPLASMA HOMINIS**

Per ogni amplificazione utilizzare sempre il controllo positivo, il controllo negativo, e un controllo interno di amplificazione ( $\beta$ -globina).

Preparare i campioni per l'amplificazione secondo la master mix illustrata precedentemente e amplificare seguendo il ciclo specifico:

#### **Thermal Cycler PIKO:**

98 °C 30 sec.  
98 °C 10 sec }  
60 °C 20 sec. } 30 cicli  
72 °C 20 sec. }  
72 °C 5 min.

Dopo l'amplificazione caricare 10  $\mu$ l di amplicone su gel di agarosio al 2 % con Marker di corsa 100 bp.

La banda di amplificazione specifica è: ***Mycoplasma* → 152 bp**

## **PCR RAPIDA PER $\beta$ -globina**

Preparare i campioni per l'amplificazione secondo la master mix illustrata precedentemente e amplificare seguendo il ciclo specifico:

### **Thermal Cycler PIKO:**

98 °C 30 sec.  
98 °C 5 sec } 25 cicli  
62 °C 5 sec. }  
72 °C 15 sec. }  
72 °C 5 min.

Dopo l'amplificazione caricare 10  $\mu$ L di amplicone su gel di agarosio al 2 % con Marker di corsa 100 bp.

La banda di amplificazione specifica è:  **$\beta$ -globina  $\rightarrow$  268 bp**

In seguito alle prime PCR eseguite per  $\beta$ -globina, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*, gli amplificati sono stati sequenziati mediante il sequenziatore automatico della ditta Applied Biosystem ABI PRISM 310 e la sequenza ottenuta è stata analizzata con BLAST per verificare che corrispondesse al frammento di DNA che si voleva amplificare, confermando che tutte e tre gli ampliconi sono stati amplificati correttamente e non hanno altre omologie di sequenza, quindi corrispondono a un buon controllo e a due buoni marcatori per l'identificazione di questi patogeni.

## **PROTOCOLLO PER IL SEQUENZIAMENTO CON ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER– APPLIED BIOSYSTEM**

Accendere il sequenziatore, inserire il capillare per il POP 6, impostare i parametri specifici per le analisi di sequenza, le matrici appropriate e il Software va impostato secondo il Filter Set E e il Dye Set /primer specifico, come riportato dal manuale dello strumento.

Per ogni analisi deve essere inserito un DNA bersaglio di controllo, a sequenza nota e riportata nel manuale, , fornito nel kit: i risultati del controllo possono contribuire a determinare se le reazioni non riuscite sono il risultato di un DNA di qualità scadente o del fallimento della reazione di sequenziamento.

Il prodotto PCR deve essere purificato da residui della reazione di amplificazione (dNTPs, primer,) che possono influenzare la buone riuscita del sequenziamento.

I campioni sono stati purificati con le colonnine MICROCON (Centricon) della ditta Millipore:

- Riporre un filtro con la parte bianca all'interno di una eppendorf da 1,5 mL
- Trasferire il prodotto PCR nella parte blu della colonnina
- Centrifugare 10 minuti (6000 -10000 rpm) e eliminare la Eppendorf
- Nella parte blu della colonnina aggiungere H<sub>2</sub>O bidistillata sterile, nella quantità desiderata
- Capovolgere la colonnina e trasferirla in una nuova eppendorf sterile (il blu all'interno della Eppendorf).
- Centrifugare 3 minuti a 2000 rpm.
- Nell'Eppendorf si ha il prodotto purificato.

L'amplicone purificato deve essere caricato su gel d'Agarosio al 1,5% con Buffer di corsa TAE 1X in modo da verificarne la purezza e l'assenza di DNA o RNA contaminati, successivamente i prodotti amplificati e purificati devono quindi essere quantificati mediante spettrofotometro, come descritto per la quantificazione del DNA ma con il programma "oligo".

La tabella, tratta dal manuale del kit, mostra la quantità di amplicone da utilizzare per il sequenziamento:

| Template              | Quantity   |
|-----------------------|------------|
| PCR product:          |            |
| 100–200 bp            | 1–3 ng     |
| 200–500 bp            | 3–10 ng    |
| 500–1000 bp           | 5–20 ng    |
| 1000–2000 bp          | 10–40 ng   |
| >2000 bp              | 20–50 ng   |
| Single-stranded       | 25–50 ng   |
| Double-stranded       | 150–300 ng |
| Cosmid, BAC           | 0.5–1.0 µg |
| Bacterial genomic DNA | 2–3 µg     |

Fig. 26- Quantità di amplicone da utilizzare per sequenziamento (ABI 310 Users Manual)

La quantità di prodotto PCR da utilizzare nel sequenziamento dipende anche dalla lunghezza e dalla purezza del prodotto PCR.

Si procede alla reazione di Cycle Sequencing utilizzando i reagenti forniti dal kit PE "BigDye-Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystem), preparare due identiche mix in provette diverse, una per il primer forward e una per il reverse

- 30-90 ng prodotto di PCR
- 4 µl BigDye mix
- 3,2 pmoli primer
- Portare al volume totale di 20 µL con H<sub>2</sub>O sterile fornita nel kit.

Mischiare gentilmente per inversione.

Riporre le provette nel Thermal Cycler e impostare il seguente protocollo termico, indicato dall'User's Manual, stando però attenti a cambiare la temperatura di annealing in relazione ai primers che si utilizzano per il Cycle Sequencing.

- 96°C 1 minuto
  - 96 °C 10 secondi
  - 50 °C 5 secondi
  - 60 °C 4 minuti
- } 25 cicli

Al termine del protocollo di amplificazione si esegue una purificazione dei prodotti dai BigDye non incorporati perchè ostacolano la lettura della sequenza,, per ogni provetta: Al termine dei cicli di PCR, si deve purificare il prodotto come segue:

- Preparare tante provette quanti i campioni da sequenziare con 2 µl di Na Acetato 3M pH 4,6 + 50 µl di EtOH 100%
- Aggiungere il contenuto della reazione di C.S. stando attenti a non recuperare anche l'olio se presente
- Tenere in ghiaccio per 10 minuti
- Centrifugare per 15 minuti alla massima velocità
- Scartare il supernatante
- Lavare il pellet con 200 µl di EtOH 70%
- Centrifugare per 5 minuti alla massima velocità
- Scartare con attenzione il supernatante
- Asciugare fino all'evaporazione totale dell'etanolo
- Conservare il pellet disidratato a -20°C fino all'utilizzo

Preparazione per il sequenziamento:

- Risospendere il pellet in 25µl di buffer TSR
- Si denatura 3minuti a 95°C
- Si mette in ghiaccio per 3 minuti
- Si caricano i campioni sulla macchina ABI 310 per l'iniezione per il sequenziamento.

Al termine dell'analisi procedere con l'analisi automatica della sequenza, verificare che non ci siano incongruenze ed eventualmente correggere manualmente, infine estrapolare il file nel formato FASTA e inserire la sequenza così ottenuta nel sito BLAST e verificare l'omologia di sequenza.

## **PCR MULTIPLEX RAPIDA PER *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* E *MYCOPLASMA HOMINIS***

Le tre metodiche PCR per  $\beta$ -globina, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis* sono state “fuse” per la messa a punto di una PCR multiplex, questo si è reso necessario per accelerare ulteriormente i tempi di risposta, in quanto spesso viene richiesta la ricerca di entrambi i patogeni (donne in gravidanza, per fecondazione assistita, come esami pre-concezionali o pre-operatori...).

Per ogni amplificazione utilizzare sempre i controlli positivi e il controllo negativo.  
Preparare i campioni per l'amplificazione e amplificare seguendo il ciclo specifico:

### Thermal Cycler PIKO:

98 °C 30 sec.  
98 °C 5 sec }  
62 °C 15 sec. } 28 cicli  
72 °C 15 sec. }  
72 °C 5 min.

Dopo l'amplificazione caricare 10  $\mu$ l di amplicone su gel di agarosio al 3 % con Marker di corsa 50 bp.

Le bande di amplificazione specifica sono: ***Mycoplasma* → 152 bp**  
***Chlamydia* → 200 bp**  
 **$\beta$ -globina → 268 bp**

## PCR KIT COMMERCIALE PER *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Il Kit commerciale, con cui è stata confrontata la metodica rapida PCR Phusion, fornisce tre master mix pre-aliquotate in singole Eppendorf monodose da 0,2 mL:

- mix1: per gene *TST* (*thiosulfate sulfurtransferase rhodanese*) nella regione 22q13.1, come controllo interno di amplificazione;
- mix2: per la 1° amplificazione di *Chlamydia*;
- mix3: per la 2° amplificazione (Nested) di *Chlamydia*.

I primer per *Chlamydia* sono stati disegnati sul plasmide criptico, di cui è fornito un frammento come controllo positivo.

Alle mix 1 e 2 si aggiungono 0,2 µL di Taq polimerasi e 10 µL di DNA (il kit non fornisce la quantità da aggiungere, bensì il volume, sottolineando che se si rende necessario diminuire il volume di DNA, bisognerà, ovviamente, aggiustare i volumi degli altri reagenti, per ottenere comunque un volume totale di 50 µL

Una volta pronte le mix (CHL1 e TST) amplificare con il seguente protocollo termico:

### Thermal Cycler PIKO:

95 °C 5 min.  
95 °C 45 sec }  
56 °C 45 sec } 30 cicli  
72 °C 45 sec }  
72 °C 5 min.

Dopo la prima amplificazione aggiungere alla mix3: 1 µL di amplicone CHL1 e 0,2 µL di Taq polimerasi e amplificare con il seguente protocollo termico:

### Thermal Cycler PIKO:

95 °C 5 min.  
94 °C 45 sec }  
55 °C 45 sec } 35 cicli  
72 °C 45 sec }  
72 °C 10 min.

Dopo la seconda amplificazione caricare 10 µL di amplicone *TST* su gel di agarosio al 3 % con Marker di corsa 100 bp.

Le bande di amplificazione specifiche sono: ***Chlamydia trachomatis* → 201 bp**  
**TST → 202 bp**

## RISULTATI

Sono stati analizzati 123 campioni per *Chlamydia trachomatis* e 100 per *Mycoplasma hominis*, così suddivisi:

| PAZIENTI                                | CAMPIONI                                | SIGLA | <i>Chlamydia trachomatis</i> | <i>Mycoplasma hominis</i> | TOTALE     |
|---|---|-------|------------------------------|---------------------------|------------|
| DONNE                                   | Tamponi Vaginali a secco                | V     | 41                           | 46                        | 87         |
| DONNE                                   | Tamponi Cervicali a secco e/o Thin Prep | C/TP  | 43                           | 29                        | 62         |
| UOMINI                                  | Tamponi Uretrali a secco                | U     | 26                           | 15                        | 41         |
| UOMINI                                  | Liquido Seminale                        | S     | 13                           | 10                        | 23         |
| Tab. 4 Campioni utilizzati nel progetto |   |       | <b>TOTALE</b>                | <b>123</b>                | <b>100</b> |
|   |   |       | <b>POSITIVI</b>              | <b>13%</b>                | <b>34%</b> |

Dei 123 campioni analizzati per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, il 13% è risultato positivo, questo è un dato allarmante, perché l'esame viene richiesto come accertamento ulteriore prima della fecondazione assistita o addirittura durante la gravidanza, essendo nella maggioranza dei casi un'infezione cronica e asintomatica.

Il 35% dei campioni analizzati è risultato positivo a *Mycoplasma hominis*; anche se la percentuale è più elevata rispetto ai campioni risultati positivi a Clamidia, è, però, meno preoccupante, perché l'analisi viene normalmente richiesta come conferma della diagnosi del medico, basata sulla sintomatologia del paziente.

Questi dati suggeriscono che sarebbe opportuno inserire l'identificazione di *Chlamydia trachomatis* nei programmi di screening, insieme al PapTest e al Papillomavirus.

Inizialmente sono state utilizzate due diverse metodiche di estrazione e purificazione: il kit Nucleospin-Tissue, basato su colonnine con membrane di silice, e il kit DNA-IqSystem, caratterizzato dall'impiego di una resina di microsfere magnetiche.

Il Kit Tissue richiede tempi più lunghi per l'estrazione e purificazione del DNA e, nella maggior parte dei casi, si sono ottenuti rapporti di assorbanza 260/280 nm tra 1,600 e 1,700, nettamente inferiori alle purezze ottenute con il kit IqSystem, sempre superiori a 1,800, e con bande su gel d'agarosio decisamente più nette e nitide [Fig. 28], mentre i DNA estratti con il Nucleospin presentavano sempre forti smear [Fig.27].

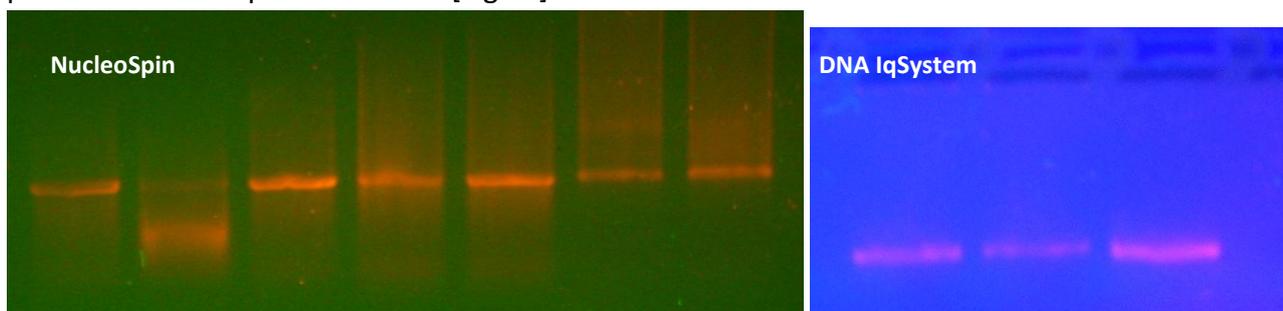


Fig. 27- Gel d'Agaroso 1,5% Dna estratti con kit NucleoSpin

Fig. 28 - DNA IqSystem

I tamponi, se eseguiti correttamente, sono ricchi di cellule epiteliali, ma spesso è presente del muco, vischioso e che può creare problemi nell'estrazione del DNA, oltre che contenere sostanze potenzialmente inibitrici della PCR. In altri casi invece, possono essere presenti sostanze che possono degradare il DNA, come residui di detergenti utilizzati per l'igiene intima, troppo aggressivi, che di conseguenza tendono a distruggere le cellule epiteliali più superficiali, pertanto con il prelievo mediante tampone si rischia di recuperare solo cellule danneggiate.

In questi casi è necessario, oltre ad un corretto campionamento, una corretta conservazione del campione e una metodica di estrazione/purificazione robusta, dotata di una chimica forte che consenta di eliminare gli inibitori e le eventuali DNasi.

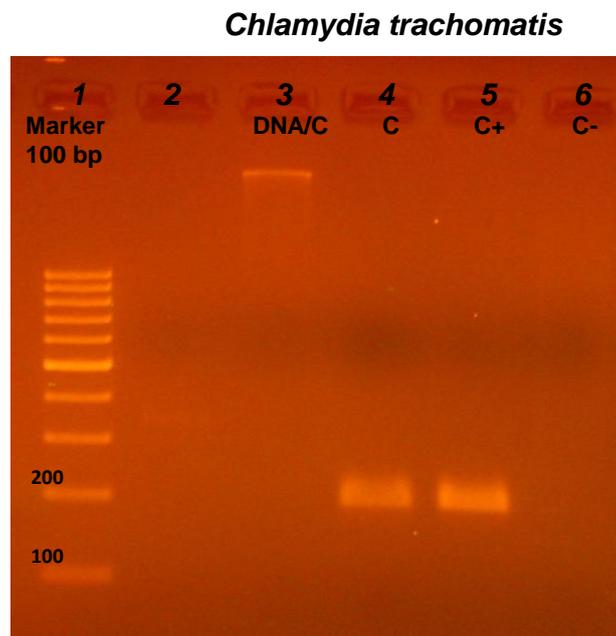


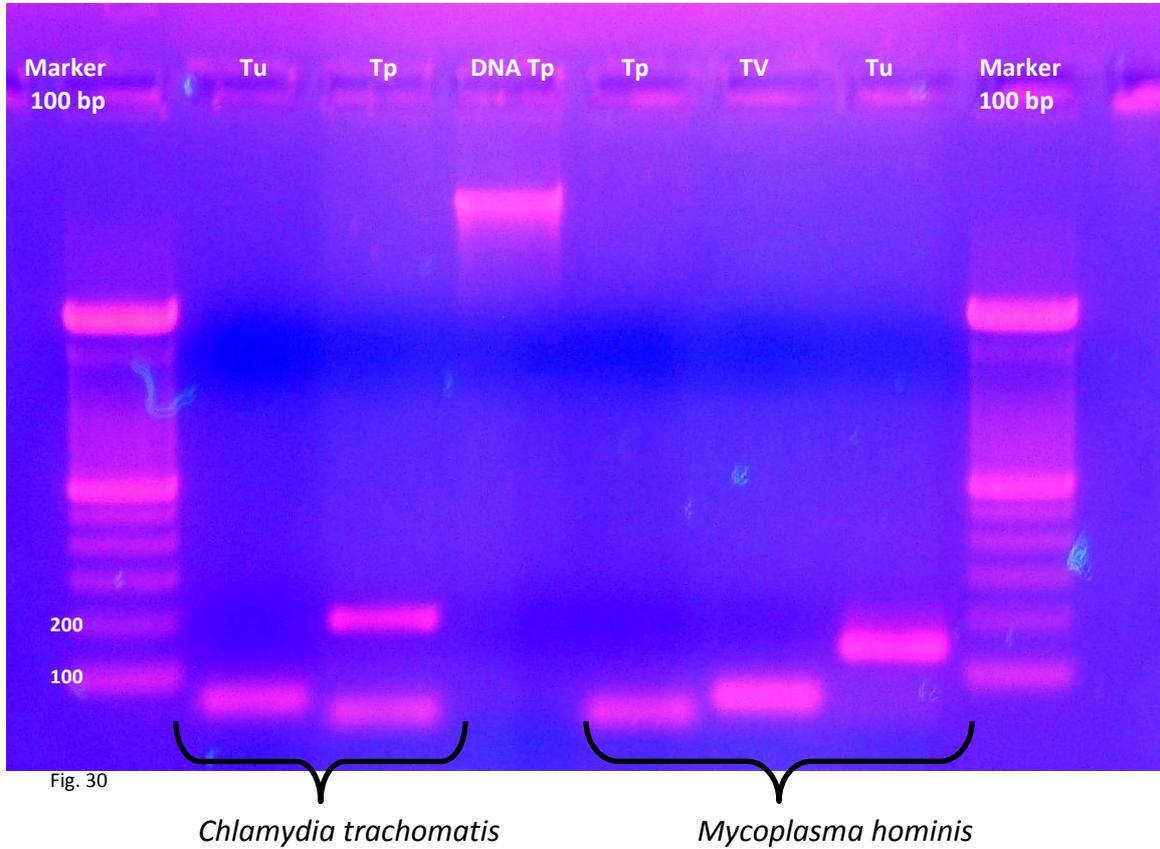
Fig. 29 – DNA estratto con kit IqSystem, amplicone (C) di CHL e C+ di CHL

La figura 29 mostra un Gel d'Agaroso al 2% in cui è possibile distinguere: nella prima linea un marker di corsa da 100 bp, nella seconda un campione diagnostico di altro tipo, e a seguire , DNA estratto con il kit DNA-IqSystem da un tampone cervicale (C), lo stesso campione (C) amplificato con PCR Phusion per identificare la presenza di *Chlamydia trachomatis* (CHL), risultato positivo (banda a 200 bp), il controllo positivo di CHL e il controllo negativo (H<sub>2</sub>O).

Come si può ben vedere, c'è un buon DNA di partenza e la banda dell'amplicone è molto intensa, confrontabile con il controllo.

L'immagine successiva (Fig. 30) riporta il risultato di una PCR Phusion per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*: si tratta di un gel d'Agaroso al 2 % in TAE 1X, in cui è stato caricato un marcatore di peso molecolare di 100 bp alle estremità del gel, il primo campione (c-) corrisponde al controllo negativo, il campione Tp corrisponde a un campione cervicale in THIN PREP, con il corrispondente DNA estratto con metodica DNA IqSystem, Tu corrisponde a un tampone uretrale e TV a un tampone vaginale.

E' possibile distinguere chiaramente una banda netta a 200 bp corrispondente al campione Tp risultato positivo a *Chlamydia trachomatis* ma negativo a *Mycoplasma hominis* e una più intensa a 152 bp corrispondente al campione Tu risultato positivo a *Mycoplasma hominis*, e negativo a *Chlamydia trachomatis*.



Per verificare la sensibilità della metodica, gli stessi campioni di DNA per *Chlamydia Trachomatis* sono stati analizzati sia con la PCR Phusion che con il kit commerciale in Nested PCR.

L'immagine sottostante (Fig. 31) riporta un esempio della diversa resa di amplificazione:

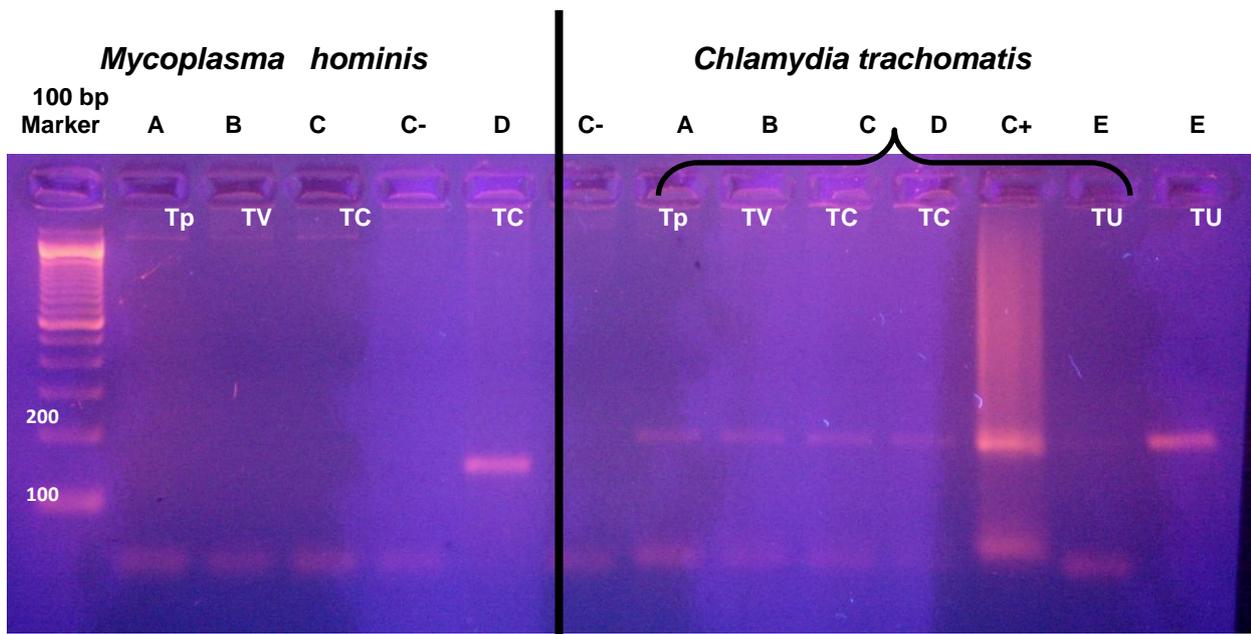


Fig. 31 – PCR per *Mycoplasma hominis* e PCR per *Chlamydia trachomatis*.

Nel gel sopradescritto (Fig. 31), sono stati caricati i seguenti campioni:

- A: THIN PREP
- B: Tampone vaginale
- C e D: Tamponi cervicali
- E: Tampone uretrale

I campioni A, B, C sono risultati negativi a *Mycoplasma hominis* con la PCR Phusion, mentre il campione D è risultato positivo.

I campioni A, B, C, D, E sono stati analizzati con il kit commerciale per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*. Come si vede dall'immagine del gel i campioni A, B, C e D sono risultati debolmente positivi con il KIT Commerciale, con una banda di intensità uguale per ciascuno, tranne che per il campione D, per cui la banda è quasi inesistente, creando dubbi sulla positività del campione.

Nel gel è stato caricato l'amplicone corrispondente al tampone uretrale E, in quanto la differenza con il risultato ottenuto dal kit commerciale è particolarmente significativa.

Come si vede chiaramente, la banda risulta molto più netta e intensa, anche rispetto agli altri campioni.

I tamponi uretrali, a causa delle loro dimensioni ridotte, sono spesso poveri di DNA, pertanto è fondamentale un corretto campionamento da parte dell'operatore sanitario che lo esegue, abbinato ad un metodo di amplificazione specifico e robusto, per evitare soprattutto falsi negativi.

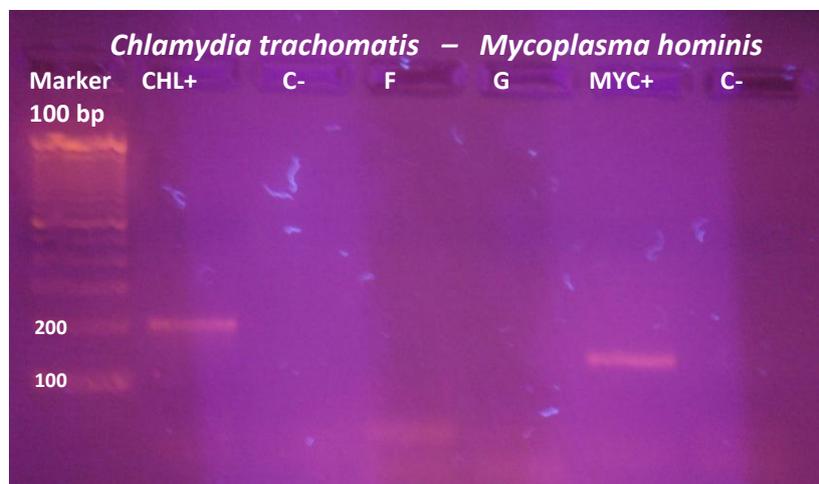


Fig.32- PCR per CHL e MYC

Fig.32: Il campione F è stato amplificato per CHL ed è risultato negativo, anche il campione G, amplificato per MYC, è risultato negativo, nel gel d'agarosio al 2% sono state rivelate solo le bande corrispondenti ai controlli positivi di CHL e MYC.

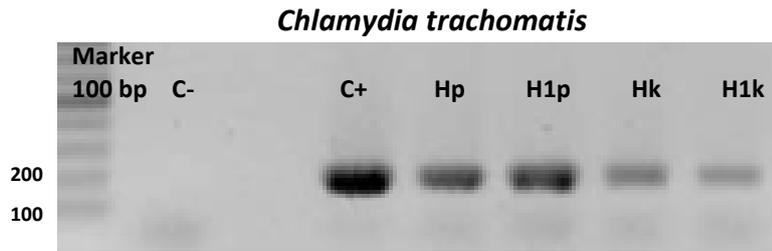


Fig 33 – PCR per CHL

La Figura 33 mostra un gel d'agarosio al 1,5% in cui sono stati caricati: un marker da 100 bp, il controllo negativo, un pozzetto vuoto, il controllo positivo (banda molto intensa) e i campioni A e B, positivi per CHL, sono stati amplificati con PCR Phusion per CHL (Hp e H1p) e con il kit commerciale (Hk e H1k).

Come è evidente dall'immagine 33, caricando su gel la stessa quantità di amplicone (10  $\mu$ L) i campioni amplificati con PCR Phusion hanno dato una banda molto più intensa rispetto agli ampliconi del kit commerciale, quindi la PCR Phusion, partendo dalla stessa quantità iniziale di DNA (50 ng), è stata più efficiente, permettendo di ottenere una maggiore resa, risultando, così, più sensibile anche verso DNA scarsi.

La Figura 34 mostra ancora una volta la maggiore resa della PCR Phusion rispetto al kit commerciale, in questo caso partendo da un tampone uretrale di un paziente sintomatico. La banda (lk 201 bp) corrispondente all'amplicone del kit commerciale è molto debole rispetto alla banda del controllo positivo del kit (CK+ 201 bp) e dell'amplicone phusion (lp 200 bp). La banda corrispondente alla  $\beta$ -globina (PCR Phusion 268 bp) è netta e evidente, ma non sono presenti bande in corrispondenza del TST del kit (Tk). Purtroppo, per questa rivelazione, è stata erroneamente utilizzata una celletta elettroforetica troppo piccola, non consentendo, così, al marker di separarsi bene.



Fig. 34 – PCR per CHL e  $\beta$ -globina

La figura 35 mostra un gel d'agarosio al 2% per *Mycoplasma* e *Chlamydia*:

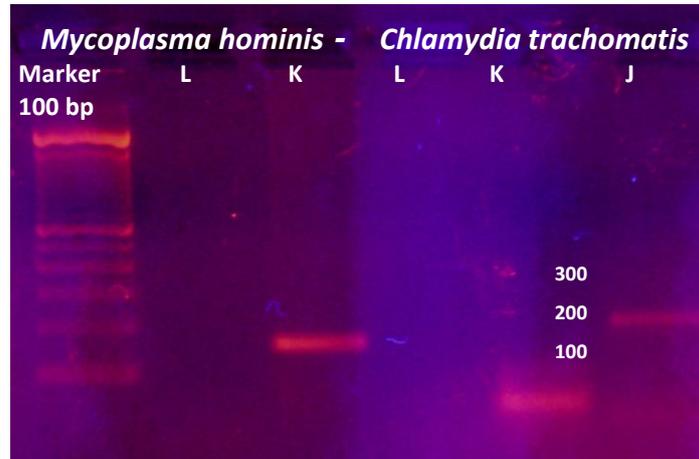


Fig. 35– PCR per CHL e MYC

In questo gel [Fig 35] sono stati caricati gli ampliconi (L,K) per *Mycoplasma hominis* e (L, K, J) per *Chlamydia trachomatis*, derivanti da PCR Phusion per DNA estratti tutti da Tamponi Vaginali: il campione L è risultato negativo sia per CHL che per MYC, il campione K è risultato positivo per MYC ma negativo per CHL, mentre il campione J è risultato positivo per CHL.

Per il campione J sono stati raccolti 2 tamponi, un positivo per CHL con la PCR Phusion, l'altro analizzato mediante kit immunocromatografico, risultato negativo, infatti la banda su gel non è particolarmente intensa. In questo caso, senza PCR, si sarebbe refertato un falso negativo.

Nella Figure 36 è riportato l'amplicone della  $\beta$ -globina per il campione L, per mostrare che è risultato negativo per entrambi i patogeni, ma che il gene di controllo è stato amplificato con una notevole resa, banda a 268 bp molto intensa.

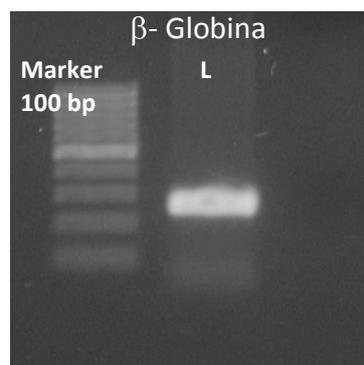


Fig. 36 – PCR  $\beta$ -globina

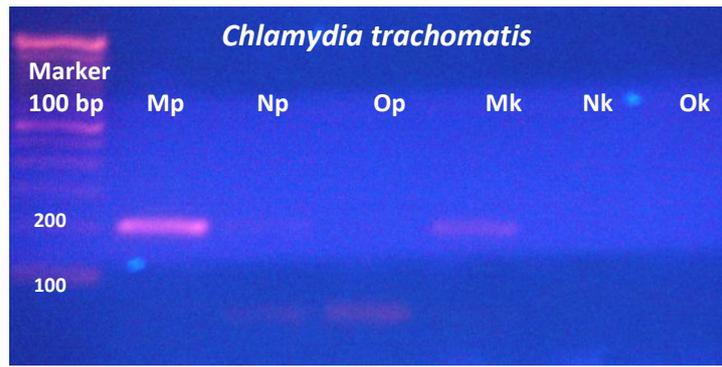


Fig. 37 – PCR CHL

I campioni M, N, O, [Fig. 37] corrispondenti a tamponi cervicali, sono stati raccolti in doppio, un tampone analizzato con kit immunocromatografico, mentre dall'altro è stato estratto il DNA, amplificato sia con PCR phusion che con il kit commerciale.

Il campione M è risultato positivo sia con la PCR Phusion (Mp 200 bp) che con il kit Nested (Mk 201 bp), ma per poter evidenziare la banda corrispondente a Mk si è reso necessario aumentare notevolmente il contrasto dell'immagine, sul transilluminatore era visibile solo ad un occhio esperto, mentre lo stesso DNA amplificato con la PCR phusion ha dato una banda decisamente più evidente. Il corrispondente tampone analizzato con metodo immunocromatografico è risultato positivo, con una banda debolissima (visibile solo da un esperto), dopo ben 30 minuti di incubazione della strip; considerando che la metodica si raccomanda di leggerlo non oltre i 10-20 minuti.

I campioni N e O sono risultati negativi con tutte e tre le metodiche utilizzate.

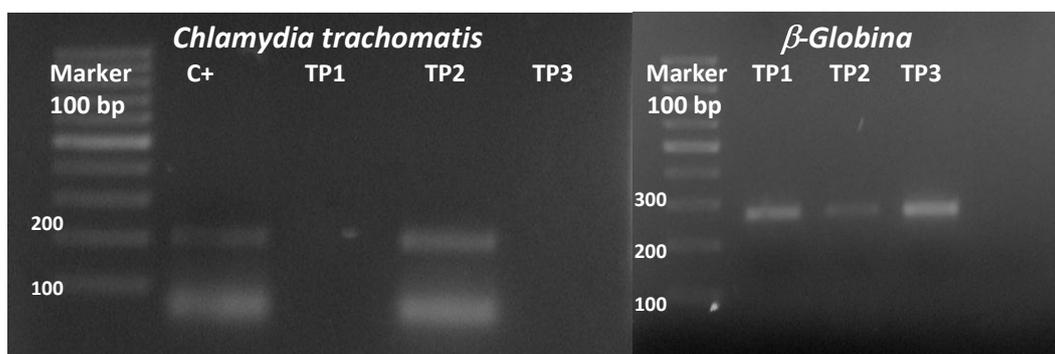


Fig. 38- PCR CHL

La figura 38 mostra altri ampliconi di *Chlamydia trachomatis* e i corrispondenti di  $\beta$ -globina, amplificati con il kit Phusion: i campioni corrispondono a 3 Thin Prep di pazienti che hanno richiesto sia la ricerca di CHL che di HPV (Papillomavirus).

I campioni TP1 e TP3 sono risultati negativi per CHL, ma TP1 è risultato positivo a due ceppi di HPV (HPV 6 a basso rischio oncogeno e HPV 33 ad alto rischio oncogeno) e TP3 è risultato positivo a un ceppo di HPV 68 ad alto rischio oncogeno.

Di particolare interesse è il campione TP2, corrispondente ad una paziente che ha richiesto uno screening completo (tampone cervicale colturale per batteri, miceti e micoplasmi, Chlamydia in PCR, tipizzazione HPV e PAP TEST), segnalando solamente un leggero prurito.

La paziente è risultata positiva a *Chlamydia trachomatis* (Fig. 38 banda TP2 a 200 bp, più intensa di quella del controllo positivo), positiva a 3 ceppi di HPV (HPV 16, 18 e 45 ad alto rischio oncogeno) e positiva anche a *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. Successivamente si è quindi sottoposta a visita ginecologica, che ha appurato una lesione cervicale, per cui, successivamente, è stata sottoposta a colposcopia.

La PCR Phusion si è dimostrata sensibile anche in caso di DNA impuro e parzialmente degradato, come mostrato nella figura 39, in cui, nonostante la presenza di un forte smear, la banda a 200 bp (Tvp1) per *Chlamydia trachomatis* è comunque ben visibile, mentre con il kit commerciale (Tvk1) non è assolutamente distinguibile. Il campione Tvp2 invece ha dato una banda leggerissima con la PCR Phusion e inesistente con il kit.

Questi due campioni corrispondono a tamponi vaginali di controllo su pazienti positive a CHL, effettuati presso un ambulatorio esterno e consegnati dalle pazienti 3 giorni dopo, mal conservati; ed essendo leggermente ematici, al momento della consegna, si presentavano fortemente decomposti e maleodoranti; in condizioni normali non sarebbero stati accettati, ma sono stati una buona occasione per testare la sensibilità della metodica.

### *Chlamydia trachomatis*

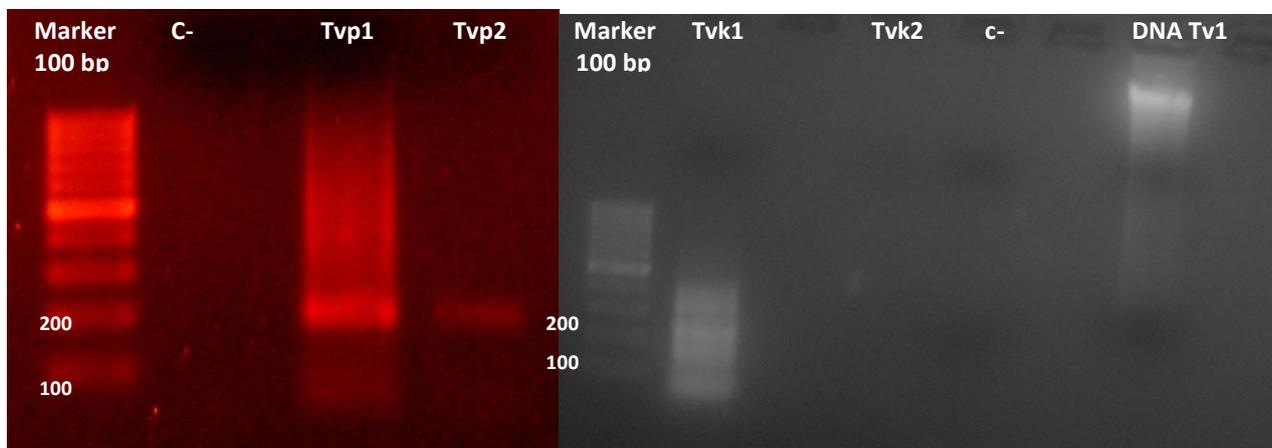


Fig. 39 - PCR CHL Phusion e commerciale su DNA impuro

Un altro esempio [Fig. 40] di tamponi, in questo caso cervicali (Tc1 e Tc2), mal conservati e consegnati dopo diversi giorni, in oltre il campione Tc1p è stato correttamente raccolto a secco, mentre il campione Tc2p è stato inserito in terreno di trasporto. Anche in questo caso, però, la PCR phusion per Clamidia si è dimostrata decisamente più efficiente del kit commerciale, come si vede chiaramente il campione Tc1p, a secco, ha dato una banda nitida a 200 bp, e il campione Tc2p, in terreno, ha presentato un forte smear, ma in cui è comunque distinguibile la banda netta a 200 bp; mentre con il kit commerciale il campione Tc1k ha dato una leggerissima banda a 201 bp, quasi indistinguibile, mentre per il campione Tc2k non è proprio stata rivelata nessuna banda; per cui con il kit commerciale sarebbe stato un falso negativo.

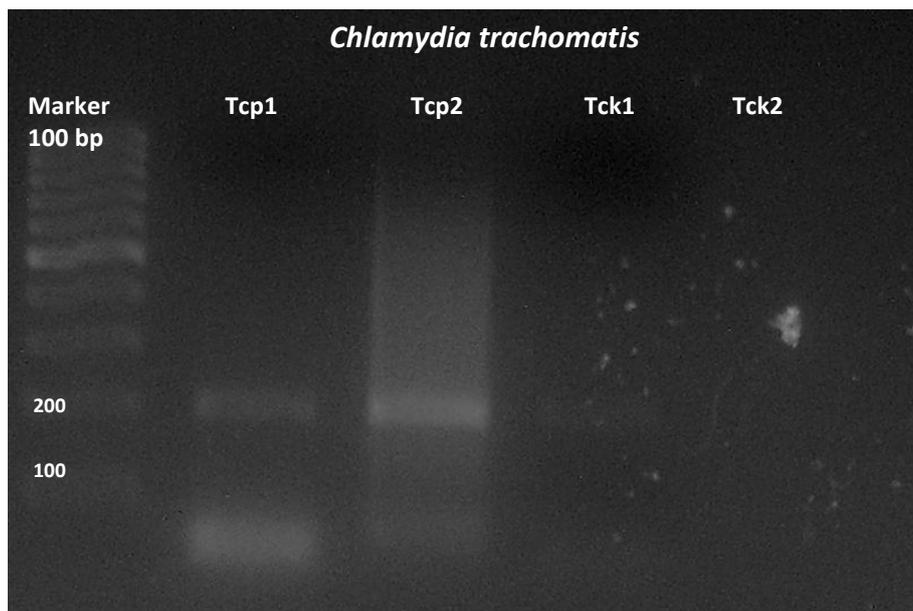


Fig. 40 – PCR Phusion e commerciale per campioni mal conservati

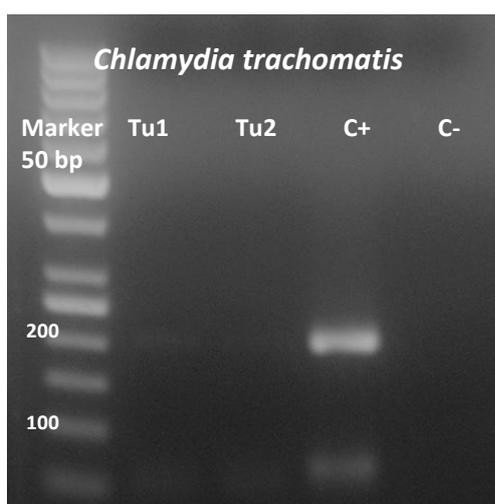


Fig. 41 – PCR Phusion Tamponi uretrali

In questo esempio [Fig.41] sono stati fatti correre su gel d'agarosio al 3% due ampliconi per clamidia, ottenuti con PCR Phusion da tamponi uretrali, che erano risultati negativi con il kit immunocromatografico, ma che mostrano invece una leggera banda a 200 bp. Ai pazienti è stato richiesto di ripetere il tampone [Fig. 42], che ha confermato il risultato positivo precedente.

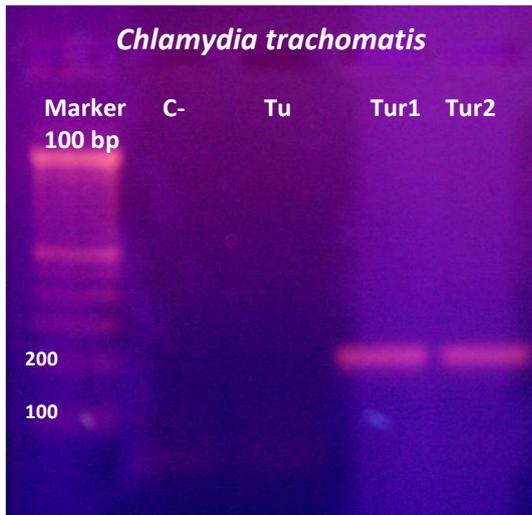


Fig. 42 – PCR Phusion Tamponi uretrali ripetuti

In questa ripetizione gli ampliconi sono stati caricati in un gel meno concentrato (2%) con il controllo negativo e un nuovo campione uretrale (Tu). Il nuovo campione Tu è risultato negativo, mentre entrambi i tamponi uretrali ripetuti (Tur1 r Tur2) sono risultati evidentemente positivi, con la presenza di una banda netta a 200 bp.

Un esempio significativo per *Mycoplasma* è dato dalla figura 43, che rappresenta un gel al 3%, in cui sono stati caricati gli ampliconi di una PCR Phusion per la ricerca di *Mycoplasma hominis* in liquido seminale. Il campione (Sx) ha dato una banda molto intensa (152 bp) corrispondente al controllo positivo (meno intenso), ma con un leggero smear di aspecifici, sia nel campione che nel controllo.



Fig. 43 – PCR Phusion MYC - Liquido seminale

Gli ampliconi del campione e del controllo sono stati purificati e sequenziati, ottenendo il frammento specifico corretto di *Mycoplasma hominis*, probabilmente gli smear sono dati da impurezze residue nella purificazione del campione, che nel caricare il gel ha contaminato il pozzetto del controllo positivo, perché assenti nel controllo negativo.

Il DNA del campione è stato nuovamente purificato e sono state fatte tre amplificazioni [Fig. 44]: la prima con gli stessi reagenti della precedente (Sx1 e C+1), la seconda con una Taq nuova (Sx2 e c+2), la terza con primer nuovi (Sx3 e C+3), si sono ottenute bande identiche tra loro, ma più pure delle precedenti, pertanto la causa dell'impurezza era del campione, non di reagenti contaminati, quindi con l'ulteriore purificazione del campione sono stati rimossi i contaminanti presenti.

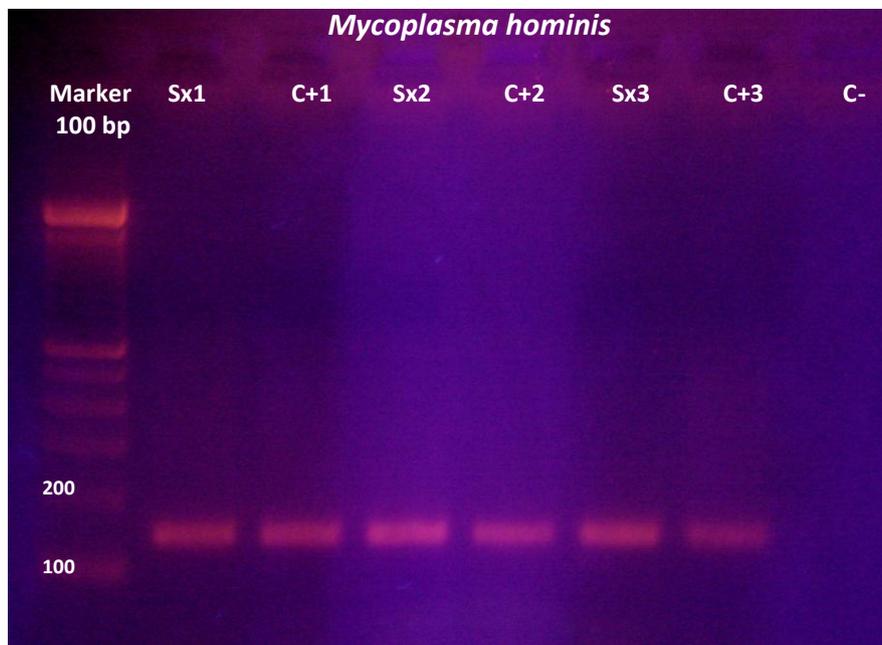


Fig. 44 – PCR Phusion MYC- Liquido seminale: DNA purificato

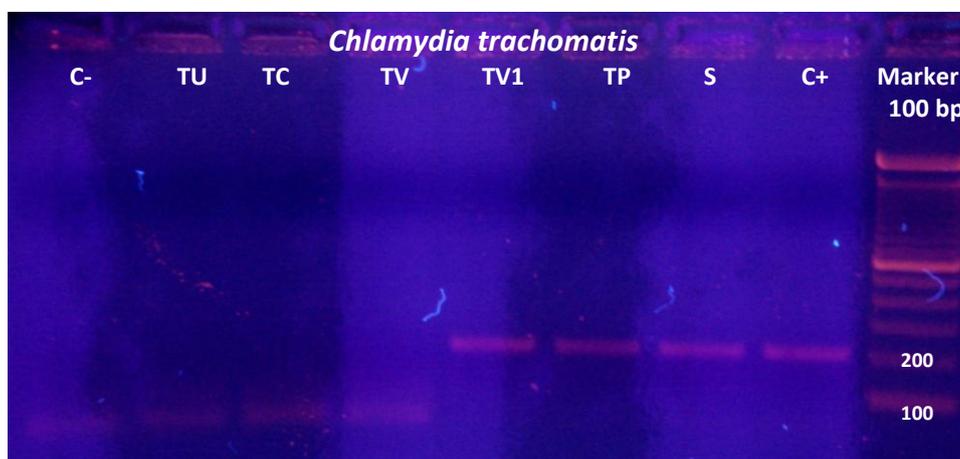


Fig. 45 – PCR Phusion CHL di vari campioni

L'immagine [Fig. 45] mostra un altro esempio di rivelazione su gel d'agarosio al 2% di campioni amplificati con PCR Phusion per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*; purtroppo si vedono di sfondo le lampade UV, che rendono la fotografia non molto nitida. Il DNA è stato estratto da: tampone uretrale (TU), cervicale (TC), vaginale (TV e TV1), ThinPrep (TP) e liquido seminale (S). I campioni TU, TC e TV sono risultati negativi, mentre i campioni TV1, TP e S sono risultati positivi, con una banda di intensità pari al controllo positivo (200 bp).

Un altro esempio di sensibilità della PCR Phusion [Fig. 46], per cui sono stati amplificati campioni di DNA estratti da un campione ThinPrep (TP) e da vari tamponi (TV: vaginale, TC: cervicale, TU: uretrale), erroneamente conservati in terreno di trasporto.

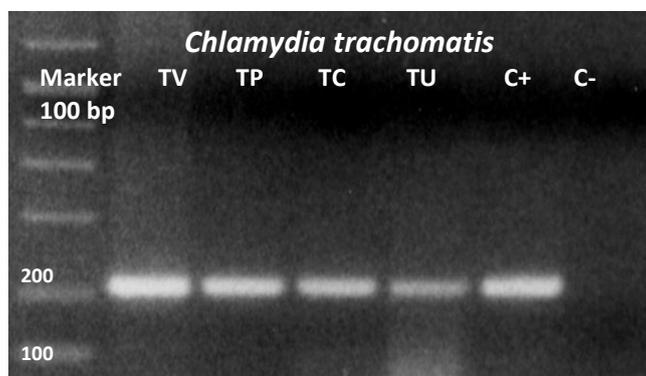


Fig. 46 – PCR Phusion CHL di vari campioni

Questi quattro campioni appartengono a pazienti con infezione cronica, asintomatica, da *Chlamydia trachomatis*, diagnosticata nei mesi precedenti da altri centri diagnostici, per cui è stato richiesto un controllo dopo terapia antibiotica.

Il DNA è stato correttamente estratto dai campioni, nonostante la conservazione in terreno di trasporto; il DNA è stato amplificato con PCR Phusion, che ha mostrato ancora positività dei campioni, con bande a 200 bp di intensità paragonabile al controllo positivo. Il Tampone vaginale (TV) e quello uretrale (TU) mostrano un leggero smear, probabilmente causato da contaminanti presenti nel terreno di trasporto, difficile da purificare.

Gli ottimi risultati delle PCR singole per *Mycoplasma hominis* (MYC) e *Chlamydia trachomatis* (CHL) hanno consentito di mettere a punto una multiplex che li comprendesse entrambi, in modo da ridurre ulteriormente i tempi di risposta.

Per la messa a punto della multiplex sono stati utilizzati i DNA di campioni precedentemente risultati positivi con le PCR singole.

In questo primo esempio [Fig. 47] sono stati caricati su gel d'agarosio al 2% i campioni precedentemente amplificati (tampone cervicale TC, vaginale TV e ThinPrep TP) e gli stessi campioni amplificati nella multiplex che comprende i primers per CHL, MYC e  $\beta$ -Globina.

### PCR PHUSION MULTIPLEX

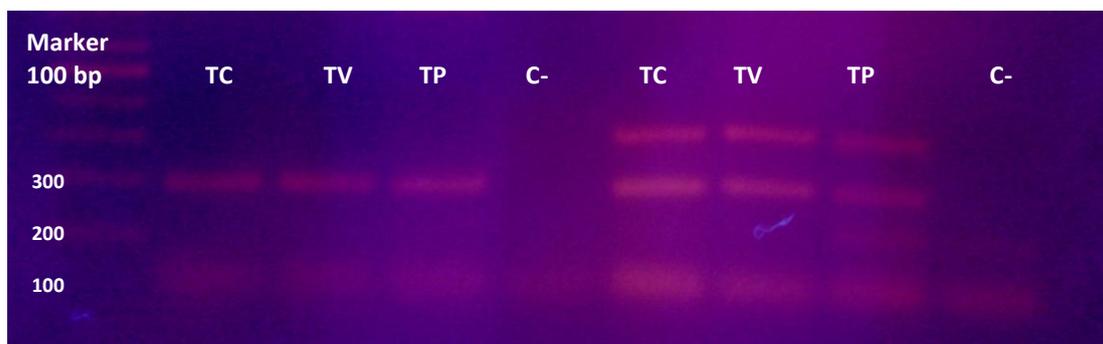


Fig. 47– PCR Phusion: CHL e MULTIPLEX  $\beta$ -GLO/CHL/MYC

Il gel è corso poco e le bande non si sono ben separate, comunque sono sufficientemente distinguibili: tutti e tre i campioni TC, TV e TP mostrano sia la banda  $\beta$ -GLO a 268 bp che la banda di CHL a 200 bp, inoltre TP mostra anche una banda piú leggera corrispondente a MYC (152 bp), anche se non è netta.

Un altro esempio [Fig. 48] mostra una multiplex (ancora in corso di messa a punto) in cui sono stati inseriti anche dei primers per *Ureaplasma urealyticum* (URE: banda 240 bp).



Fig. 48 – PCR Phusion: MULTIPLEX MYC /CHL/URE/ $\beta$ -GLO

In questa messa a punto sono stati utilizzati DNA di campioni precedentemente analizzati, in particolare:

- TP: Thin Prep positivo a CHL in PCR Phusion e a MYC e URE in coltura.
- Tv e Tu: tampone vaginale e uretrale, della stessa paziente, risultati positivi a CHL, in PCR Phusion e a URE in coltura.
- Tc: tampone cervicale positivo a URE in coltura.

Oltre che tre mix preparate con diversi DNA precedentemente analizzati:

- mix1: DNA positivo a CHL + DNA da Tampone uretrale positivo in coltura a MYC e URE,
- mix2 e mix 3: DNA positivo a CHL + DNA negativo a tutti e tre i patogeni.

Come si vede chiaramente TP e la mix 1 mostrano tutte le bande, a conferma dei risultati precedentemente ottenuti. I campioni Tv e Tu confermano il risultato ottenuto per URE, mentre Tc mostra uno strano sdoppiamento della banda di  $\beta$ -globina, oppure potrebbe essere una banda troppo intensa, il campione dovrà essere comunque studiato piú approfonditamente.

Mentre nelle mix 2 e 3 è visibile una banda intensa a 200 bp corrispondente all'amplicone di CHL e una banda alta corrispondente al DNA negativo, quindi non amplificato, stranamente però non è presente la banda di  $\beta$ -globina, anche queste mix andranno studiate.

Resta quindi da approfondire la messa a punto di questa multiplex, in particolare andranno disegnati dei primers per *Ureaplasma* per amplificare un frammento di dimensioni diverse, in quanto troppo vicino alle dimensioni del frammento di  $\beta$ -globina, creando problemi nella distinzione delle bande gel d'agarosio.

Una volta completata la messa a punto della multiplex potrebbe essere tale metodica alla rivelazione su strip, che consente una migliore risoluzione e distinzione delle bande specifiche. Oltre che allo studio di una multiplex per la verifica dell'antibiotico-resistenza dei campioni positivi.

Nello studio approfondito di *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis* è emerso che la resistenza agli antibiotici potrebbe essere uno sviluppo interessante dell'applicazione della PCR Rapida Phusion. A tale scopo si è studiata la letteratura in merito, per identificare gli eventuali target, come i plasmidi che portano i geni per l'antibiotico-resistenza o eventuali mutazioni che rendono i batteri resistenti.

### TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE DA CLAMIDIA e RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

L'infezione da *Chlamydia trachomatis* è trattabile con antibiotici, ma, vista la morfologia di questo particolare batterio, è insensibile al trattamento con antibiotici attivi sulla parete, essendone privo, ma sono preferibili quelli per batteri intracellulari, in quanto più "robusti" e aggressivi dato che devono penetrare nelle cellule dell'ospite per poter debellare l'infezione.

Gli schemi terapeutici raccomandati prevedono l'uso per via orale di azitromicina o di una tetraciclina; in alternativa, di eritromicina (ormai superata) o di un chinolone sempre per via orale. In gravidanza sono indicate amoxicillina o eritromicina, oppure clindamicina. Vanno trattati anche i partner sessuali.

Tetracicline e eritromicina sono stati utilizzati per decenni per trattare le infezioni da clamidia, e sono ancora in ampio uso, per ora sembra che la resistenza non sia ancora un grosso problema.

L'efficacia dei macrolidi, come l'eritromicina, o azalides, come l'azitromicina è data probabilmente dalla loro capacità di raggiungere elevate concentrazioni intracellulari, in particolare nei macrofagi [Labro, 1996; Tulkens, 1991].

I macrolidi si distribuiscono uniformemente nel citoplasma delle cellule e nei lisosomi, mentre azalides tendono a concentrarsi nei fagosomi. La Tetraciclina entra nelle cellule, ma la sua posizione intracellulare è scarsamente definita [McOrist, 2000].

Gli antibiotici beta-lattamici (penicilline e cefalosporine) o amino-glicosidi (gentamicina) penetrano lentamente nelle cellule e quindi sono scarsamente attivi contro la clamidia.

Le difficoltà tecniche nel misurare la resistenza agli antibiotici di *Chlamydia trachomatis* sono notevoli: Suchland et al, in uno studio del 2003 riportano che le concentrazioni minime inibenti (MIC) di vari antibiotici contro le diverse specie di *Chlamydia* dipendevano dalla linea cellulare di laboratorio utilizzata per gli esperimenti, il tempo tra l'infezione e l'aggiunta di antibiotico, la concentrazione dell'inoculo e la strategia prescelta. In generale, la resistenza in vitro non correlava bene con l'esito clinico apparente del paziente.

La resistenza è un problema clinico rilevante per molti antibiotici, e molto grave se si realizza verso i macrolidi. Alcuni studi recenti hanno evidenziato alcuni casi (pochi al momento) di ceppi di *Chlamydia trachomatis* diventati resistenti ai macrolidi.

I macrolidi sono costituiti da un anello lattonico macrociclico e agiscono come antibiotici, in quanto si legano in modo irreversibile alla subunità 50S del ribosoma batterico, inibendo così la sintesi proteica.

La resistenza sembrerebbe attuarsi in tre modi diversi:

- Il batterio, essendo all'interno delle cellule dell'ospite, riceve una minor quantità di farmaco, per cui l'antibiotico non raggiunge la concentrazione critica per essere efficace.
- Il recettore a livello del ribosoma è mutato, così che al ribosoma si lega una minor quantità di farmaco.
- Il batterio può sviluppare una esterasi in grado di aprire il lattone, inattivandolo.

In generale i batteri intracellulari obbligati, come *Chlamydia*, hanno modelli simili di sensibilità agli antibiotici.

Nel 1998 uno studio ha descritto un ceppo di *C. trachomatis* resistente a tetraciclina [Lefevre & Lepargneur, 1998].

Somani et al., in uno lavoro del 2000, hanno descritto tre ceppi isolati di *C. trachomatis*, che hanno mostrato resistenza alla doxiciclina, azitromicina e ofloxacina a concentrazioni superiori a 4 µg /ml. Uno studio del 2001 ha mostrato che in Israele il 44% dei ceppi clinici isolati, sono risultati relativamente resistenti alla doxiciclina o alla tetraciclina di cui dal 4 all'8% dei ceppi resistenti alla concentrazione di 4 µg /ml [Samra et al., 2001].

E' stato suggerito che i batteri che risiedono quasi sempre all'interno di altre cellule possono essere facilmente in grado di acquisire geni di resistenza agli antibiotici da altri patogeni.

*C. trachomatis* porta plasmidi, che potrebbero teoricamente essere in grado di trasportare geni di resistenza agli antibiotici. Tuttavia, la loro funzione è tuttora sconosciuta. I vari geni di resistenza agli antibiotici presenti su plasmidi, in genere potrebbero non essere disponibili per la clamidia, ma sembrano avere ottenuto geni traslocati da piante, suggerendo che il trasferimento orizzontale di geni estranei alla clamidia è fattibile [Koonin et al., 2001].

Inoltre, i batteri intracellulari che trasportano geni di resistenza agli antibiotici, potrebbero aver ridotto l'attività [Jones et al., 1990], come indicato in un rapporto (non confermato) della resistenza alla tetraciclina in *C. trachomatis*.

Lo sviluppo di resistenza alla tetraciclina o ai macrolidi nei batteri extracellulari richiede notevole energia metabolica. Questa energia potrebbe non essere così prontamente disponibile per i batteri intracellulari obbligati [McOrist, 2000].

Sono state studiate acquisizioni progressive della resistenza agli antibiotici causate da mutazioni minori, come ad esempio, della RNA polimerasi per la rifampicina, o della DNA girasi per i chinoloni.

In particolare uno studio del 1998 [DeSUS-Babus et al.] e uno del 2002 [Morrissey et al.] hanno evidenziato, mediante colture cellulari, come la resistenza di *C. trachomatis* L2 ai vari fluorochinoloni è stata aumentata fino a 1000 volte da una mutazione nel gene *GyrA* che porta ad una sostituzione di Ser 83 con Ile nella DNA girasi.

## TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE DA MYCOPLASMA E LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Per quanto riguarda le scelte terapeutiche, non avendo parete cellulare, i micoplasmi sono naturalmente resistenti a penicilline, cefalosporine e rifampicina.

Secondo le linee guida, gli antibiotici utilizzati per la terapia sono quelli che interferiscono con la sintesi proteica ed appartengono alla famiglia dei macrolidi, delle tetracicline e dei fluorochinoloni. Questi antibiotici bloccano l'adesione dei micoplasmi alle cellule inibendo la sintesi delle proteine che hanno un ruolo fondamentale nella fase iniziale del contatto cellulare. *M. hominis* è resistente naturalmente all'eritromicina, mentre la resistenza ai fluorochinoloni è associata ad una mutazione del gene *GyrA*. La resistenza di *M. hominis* e *U. urealyticum* alle tetracicline è legata alla presenza del gene *TetM*. Questo carattere è stato ritrovato anche in altri batteri tipici dell'apparato genitale, come streptococchi di gruppo B, *Gardnerella vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

I farmaci elettivi nel trattamento delle infezioni da micoplasmi sono l'azitromicina e la doxiciclina, in quanto gli altri antibiotici hanno una più bassa sensibilità. La durata della terapia con l'azitromicina è più breve rispetto alla doxiciclina ma comporta una maggiore incidenza di recidive. In quelle situazioni, come la gravidanza, che non consente l'utilizzo dei fluorochinoloni e delle tetracicline, o in presenza di ceppi che presentano multiresistenze è fondamentale poter disporre di un test di sensibilità agli antibiotici più ampio per le più opportune scelte terapeutiche .

### Studi riguardanti l'antibiotico-resistenza

Uno dei primi studi sull'antibiotico resistenza di *M. hominis* [Roberts M.C. et al., 1985] ha mostrato come isolati clinici di *Mycoplasma hominis* resistente ad alti dosi di tetraciclina, contenevano sequenze di DNA omologhe al gene per la resistenza alla tetraciclina streptococcica (*tetM*); mentre, nessuno dei *M. hominis* sensibili portava questo gene.

Questo studio è stato la prima descrizione di *TetM* in un genere estraneo, suggerendo così la diffusione di *TetM* da *Streptococcus spp.* a *Mycoplasma spp.*

Uno studio di Karabay et al. del 2006, svolto presso un ospedale universitario in Turchia su 382 donne risultate positive a *M. hominis*, mediante esame colturale, ha mostrato che le resistenze più diffuse nella popolazione analizzata sono risultate nei confronti di eritromicina (88%) e ofloxacina (41%), a seguire ciprofloxacina (17,6%), tetraciclina (11,8%), doxiciclina, iosamicina, pristinamicina (5,9%).

In uno studio del 1997 [Bebear et al.] sono stati isolati mutanti di *Mycoplasma hominis* resistenti ai Fluorochinoloni, selezionati in vitro da un ceppo di riferimento sensibile, con concentrazioni crescenti di fluorochinoloni, o con una selezione su terreno agarizzato con ofloxacina.

Sono state amplificate mediante PCR le "quinolone resistance-determining regions" (QRDR) (regioni che determinano la resistenza ai chinoloni) presenti in geni strutturali delle subunità A e b della DNA-girasi, che sono state confrontate con le sequenze nucleotidiche di otto ceppi resistenti. Quattro mutanti fortemente resistenti, selezionati su norfloxacina o ofloxacina, contenevano una mutazione C → T nella QRDR del *GyrA*, che comporta la sostituzione di Ser-83 in Leu nella proteina *GyrA*.

L'analisi della sequenza del QRDR di *GyrB* degli otto mutanti selezionati non ha rivelato alcuna differenza rispetto a quella della QRDR *GyrB* del ceppo di riferimento di *M. hominis* sensibile.

Questi risultati suggeriscono che in *M. hominis*, come in altre specie batteriche, una mutazione di *gyrA* a livello di Ser-83 è associata alla resistenza ai fluorochinoloni.

Quindi la mutazione della regione QRDR di *GyrA*, potrebbe essere oggetto di studio per verificare la resistenza ai fluorichinoloni mediante PCR rapida.

Diversi studi in vitro hanno mostrato come *M. hominis* sia spesso resistente ad alcuni macrolidi (eritromicina, roxitromicina, claritromicina, azitromicina), mediante analisi PCR hanno mostrato come il meccanismo di resistenza all'eritromicina sia associato a una mutazione puntiforme (trasposizione G→A) nel sito 2057 situato nel loop del dominio V dell'rRNA 23S, mentre la resistenza alla josamicina sia legata a due mutazioni puntiformi (A2062G e A2062T) nel dominio V dell'rRNA 23S. Da questi studi si deduce che la resistenza ai macrolidi in *M. hominis* sia causata da mutazioni nell'rRNA 23S. Uno studio del 2004 [Karamova et al.] mostra l'incidenza di mutazioni nell'rRNA 23S di *M. hominis*, responsabili della resistenza ai macrolidi in campioni clinici.

Uno studio del 2006 [Pereyre et al.] avvalorava l'ipotesi che *Mycoplasma hominis* sia intrinsecamente resistente ai macrolidi costituiti da un anello lattonico a 14 o 15 termini (eritromicina, oleandomicina, claritromicina, fluritromicina e azitromicina) e alla telitromicina ketolide, ma è suscettibile alla iosamicina, un macrolide a 16 termini e ai lincosamidi (clindamicina e licomicina).

Lo studio si basa sui precedenti, infatti la selezione dei mutanti resistenti ai macrolidi è stato eseguito da passaggi seriali di *M. hominis* PG21 in terreno contenente concentrazioni di clindamicina, pristinamicina, quinupristina/dalfopristina e telitromicina. Inoltre è stata eseguita una graduale selezione di mutanti resistenti alla iosamicina su terreno agar contenente concentrazioni crescenti di iosamicina.

I mutanti resistenti sono stati caratterizzati mediante PCR e il sequenziamento del DNA dell'rRNA 23S, dei geni codificanti per le proteine ribosomiali L4 e L22.

Sono state evidenziate varie mutazioni nel dominio II o V dell'rRNA 23S in presenza di ogni antibiotico e sono stati associati a diversi fenotipi di resistenza.

La resistenza alla josamicina è stata l'unica ad essere associata alla mutazione di un solo amminoacido delle proteine ribosomiali L4 e L22.

La transizione C2611U evidenziata in presenza di clindamicina e della combinazione quinupristina/dalfopristina è stata associata ad una diminuzione della MIC (Concentrazione Minima Inibente) di eritromicina, azitromicina e telitromicina, portando ad una perdita della resistenza intrinseca di *M. hominis* a eritromicina e azitromicina.

Questo studio, ha quindi dimostrato che le mutazioni ribosomiali di *M. hominis* erano associate alla resistenza ai macrolidi e ad alcuni antibiotici connessi, inoltre, alcuni mutanti hanno mostrato una perdita della resistenza intrinseca alla eritromicina e azitromicina.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Di particolare interesse è stato lo studio della normativa inerente l'accreditamento istituzionale delle strutture sanitarie e la UNI EN ISO 9001/2008 per la progettazione e realizzazione *ex novo* del laboratorio analisi.

Entrambe le normative sono estremamente rigorose e dettagliate e non è stato semplice applicarle all'organizzazione quotidiana del laboratorio.

Un laboratorio di diagnostica medica può comprendere diversi settori, tra cui, come nel caso del Poliambulatorio Dalla Rosa Prati, il laboratorio di base (biochimica clinica, siero-immunologia, tossicologia, ecc), la microbiologia e la biologia molecolare.

Le tre specialità devono interfacciarsi in armonia e in stretta collaborazione, in quanto spesso, le richieste dei medici comprendono esami di tutti i settori, quindi è necessario prelevare meno campioni possibili, soprattutto in caso di prelievi difficoltosi, e cercare di unificare i tempi di risposta.

Per organizzare al meglio la gestione quotidiana del laboratorio sono state redatte molte procedure operative, dettagliate e di semplice interpretazione da parte di tutti gli operatori, in modo da rendere riproducibile il sistema da chiunque subentri, per poter verificare la corretta applicazione delle metodiche, e per garantire ai pazienti il massimo grado di qualità, pubblicando la "Carta dei Servizi" del Poliambulatorio Dalla Rosa Prati, in cui sono stati inseriti i parametri di riferimento e gli indicatori di qualità adottati dal poliambulatorio.

La tempistica dedicata al progetto di ricerca è stata, quindi, ristretta, ma si è comunque riusciti ad applicare una metodica di PCR rapida, sia singola che multiplex, basata sulla tecnologia Phusion High Fidelity della ditta Finnzymes, all'identificazione di due patogeni: *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*.

All'inizio del progetto la ditta Euroclone in collaborazione con Finnzymes, prima di commercializzare il kit diagnostico per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, ha eseguito delle indagini di mercato, in seguito alle quali, a causa della crisi economica mondiale in atto in questi anni, ha deciso di non dare seguito alla produzione del kit.

Il progetto è proseguito ugualmente e la sua buona riuscita suggerisce l'applicazione di questa metodica anche ad altri patogeni, e di perfezionarla, rendendola più accurata e competitiva rispetto alle tecniche convenzionali.

L'ultimo studio effettuato ha riguardato l'utilizzo di una PCR multiplex per l'identificazione contemporanea di *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*, in quanto quest'ultimo è un batterio della famiglia *Mycoplasmataceae*, spesso associato a *M. hominis*.

La PCR rapida mediante la Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) ha mostrato dei vantaggi rispetto al kit commerciale di confronto: è notevolmente più rapida (40 minuti anziché 3 ore), richiede una quantità notevolmente inferiore di DNA estratto ed è risultata più efficiente, fornendo una maggiore resa di amplicone.

Gli svantaggi di tale metodica sono derivati dalla fase di messa a punto, in quanto sono richiesti primers specifici, con caratteristiche dedicate, in modo tale da avvicinare il più possibile la temperatura di annealing a quella di estensione, riducendo così ulteriormente i tempi, per cui è risultato piuttosto difficile adattare i primers disegnati per una metodica classica.

La tempistica ristretta del progetto, non ha reso possibile la validazione con un maggior numero di campioni, e quindi una analisi statistica che appuri la specificità e la sensibilità di tale metodica.

La PCR rapida Phusion, inoltre, è stata associata solo alla rivelazione su gel d'agarosio, ma sarebbe di particolare interesse adattare la metodica ad altri sistemi di rivelazione [Tab. 5].

| Sistemi di rivelazione della PCR Multiplex: | Qualitativo/ Quantitativo      | Tempi stimati (PCR + Rivelazione) | Primers /probes | Costi stimati (PCR + rivelazione) escluso costo strumenti |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|---|
| Gel d'agarosio                              | Qualitativo/ semi-quantitativo | 60-90 minuti                      | Primers         | 25-30 €/campione  |
| Lateral Flow Strip                          | Qualitativo/ semi-quantitativo | 40-50 minuti                      | Primers         | 30-35 €/campione  |
| Sybr Green                                  | Qualitativo/ Quantitativo      | 60-90 minuti                      | Primers         | 40-50 €/campione  |
| TaqMan                                      | Qualitativo/ Quantitativo      | 60-90 minuti                      | Probes          | 50-60€/campione   |
| High Resolution Melting                     | Qualitativo                    | 60-120 minuti                     | Primers         | 100-120€/campione   |

Tab. 5 – Possibili opzioni per la diagnosi molecolare di infezione da parte dei patogeni *C. trachomatis* e *M. hominis*

La PCR Phusion abbinata alla rivelazione su gel d'agarosio, apparentemente è l'opzione più economica, ma ha diversi svantaggi: richiede troppi passaggi da parte dell'operatore e quindi un maggiore rischio di errore rispetto agli altri sistemi, o di contaminazione; il gel non consente una buona interpretazione dei risultati, soprattutto per campioni scarsi; tale metodica necessita di Etidio Bromuro, cancerogeno, per marcare il DNA e poter rivelare gli ampliconi su transilluminatore. A causa dell'impiego di EtBr e del transilluminatore UV, si rende necessario l'utilizzo da parte dell'operatore, di dispositivi di protezione individuale specifici e di particolari precauzioni e attenzioni.

Esistono in commercio agenti intercalanti diversi da EtBr (ad esempio il Sybr) abbinati a transilluminatori a luce bianca o blu, che sono stati utilizzati all'inizio del progetto, ma che non consentivano di rivelare le bande, invece presenti con EtBr e UV.

La rivelazione mediante Lateral Flow Strip potrebbe essere un buon sistema se abbinata a dei primers marcati in modo tale da poter inserire direttamente la strip nel prodotto di PCR, senza dover effettuare doppia-ibridazione, consentendo di visualizzare il risultato al termine della PCR in pochi minuti, anziché dopo circa 2 ore. I costi stimati sono relativamente contenuti (30-35 € a campione) e pone meno rischi per la sicurezza dell'operatore.

L'adattamento della metodica in RealTime PCR potrebbe essere interessante, in quanto permetterebbe di verificare in tempo reale i risultati. La Real-Time, con sonde TaqMan, è preferibile rispetto all'utilizzo del Sybr Green, perché maggiormente sensibile e basata su sonde specie-specifiche, che permettono l'applicazione di una multiplex per distinguere tra più patogeni. La PCR RealTime consente, inoltre, di ottenere anche una risposta quantitativa, sulla base del ciclo soglia della curva di amplificazione. A livello di diagnosi di infezione, la quantificazione così ottenuta non è sempre necessaria, perché strettamente legata al metodo di campionamento, non è quindi paragonabile alla carica batterica ottenuta mediante le colture tradizionali.

Di particolare interesse è la High Resolution Melting, abbinata alla PCR, che, marcando i primers con particolari fluorofori, esegue una curva di melting ad alta risoluzione al termine della PCR, in modo da ottenere una risposta in 10-15 minuti; attualmente viene impiegata per le genotipizzazioni o per il sequenziamento. Potrebbe essere utile applicarla alla multiplex studiata per *Chlamydia* e *Mycoplasma*, o per discriminare tra i sierotipi di *Chlamydia*.

Il grande svantaggio per un laboratorio diagnostico è, però, legato ai costi elevati della strumentazione, probabilmente ammortizzabili in un centro che si occupa anche di ricerca, ma al momento difficile da utilizzare solamente a scopo diagnostico.

Parallelamente alla messa a punto delle metodiche di PCR, sono stati studiati i lavori riportati in letteratura riguardanti l'antibiotico-resistenza da parte di *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*, in modo da verificare l'applicabilità della metodica di PCR anche all'identificazione di geni o mutazioni responsabili della resistenza agli antibiotici per i patogeni studiati.

| Patogeni:                           | Antibiotico Resistenza | Vettori                 | Possibili Target                                     | Tempi antibiotogramma | Tempi molecolare |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------|--|-----------------------|------------------|
| <b><i>Chlamydia trachomatis</i></b> | Rifampicina            | DNA genomico            | Mutazione nel gene <i>Rpo</i> (RNA polimerasi)       |                       | 30-60 minuti     |
|                                     | Chinoloni              | DNA genomico            | Mutazione puntiforme in <i>GyrA</i> (DNA girasi)     |                       |                  |
|                                     | Macrolidi              | DNA genomico o Plasmidi | Mutazioni dei recettori sui ribosomi                 |                       |                  |
| Produzione di esterasi              |                        |                         |  |                       |                  |
| <b><i>Mycoplasma hominis</i></b>    | Eritromicina           | rRNA                    | Mutazione puntiforme G2057A in rRNA 23S              | 18-24 h               | 30-60 minuti     |
|                                     | Chinoloni              | DNA genomico            | Mutazione puntiforme in <i>GyrA</i> (DNA girasi)     |                       |                  |
|                                     | Tetraciclina           | Plasmidi o DNA genomico | Presenza del gene <i>TetM</i>                        |                       |                  |
|                                     | Josamicina             | rRNA                    | Due mutazioni puntiformi A2062G e A2062T in rRNA 23S |                       |                  |

Tab. 6 – Possibili opzioni per la diagnosi molecolare di antibiotico-resistenza per *C. trachomatis* e *M. hominis*

Gli studi riguardanti l'antibiotico-resistenza da parte di *Mycoplasma hominis* non sono molti, ma vertono quasi tutti sulla ricerca di mutazioni dell'rRNA 23S, ciascuna delle quali sembra responsabile dell'acquisizione di resistenza da parte del patogeno a diversi antibiotici, in particolar modo ai macrolidi, oltre che al gene *TetM* per la resistenza alla tetraciclina.

Pertanto, sulla base di questi studi, risulta importante mettere a punto una PCR multiplex rapida per verificare la resistenza agli antibiotici per *Mycoplasma hominis*, basandosi sulle mutazioni rRNA 23S descritte in letteratura e alla presenza del gene *TetM*.

Ciò consentirebbe di fornire al medico un referto completo per la ricerca di *Mycoplasma hominis*, e nel caso risultasse positiva la ricerca del patogeno, si potrebbe fornire anche una sorta di "antibiogramma molecolare", specificando quali mutazioni sono presenti nel patogeno e di conseguenza a quali antibiotici "potrebbe" essere resistente e quindi consentire al medico di scegliere una terapia mirata e specifica, accelerando così i tempi di guarigione del paziente ed evitando la cronicizzazione dell'infezione, come invece avviene spesso.

Al momento le comunità scientifiche internazionali, ritengono, invece, che la resistenza agli antibiotici utilizzati per il trattamento delle infezioni acute da *Chlamydia* non sia un problema significativo, infatti non sono attivi molti studi in questo settore.

L'impiego continuo di antibiotici ha, però, mostrato, in altri microrganismi (tra cui l'emergenza recente su ampia scala nei suini di *C. suis* resistente alla tetraciclina) come l'insorgenza di resistenze sia da tenere in forte considerazione e quindi i medici dovrebbero essere attenti nella prescrizione degli antibiotici, le comunità scientifiche e le case farmaceutiche dovrebbero prestare maggiore attenzione a questi patogeni, individuando nuovi target terapeutici, diversi dagli antibiotici.

Per quanto riguarda *Chlamydia trachomatis*, un target di studio per una possibile terapia, è senz'altro la Triptofano-sintasi, che si è visto essere un meccanismo di difesa che il patogeno ha adottato nei confronti del nostro sistema immunitario.

In entrambi i patogeni sembra che la resistenza ai chinoloni sia dovuta all'insorgenza di diverse mutazioni puntiformi nel gene *GyrA* che codifica per la DNA girasi, altro interessante possibile target per la verifica dell'antibiotico-resistenza.

Da questa esperienza si evince quello che può essere il contributo del biotecnologo nello specifico contesto del laboratorio di diagnostica medica.

Il confronto fra le differenti metodologie di analisi cliniche utilizzate, ha permesso di evidenziarne gli aspetti positivi e negativi, di individuare le possibilità di miglioramento, di ampliarne le eventuali capacità di utilizzo per renderle più innovative e competitive. Per ottenere dei risultati appare indispensabile la collaborazione fra i centri Clinici Privati, l'industria di settore e l'Università.

In particolare, nel caso di un laboratorio diagnostico ad alta specializzazione, la figura del biotecnologo riveste un ruolo di fondamentale importanza soprattutto nel settore di biologia molecolare che è in continua evoluzione e trasformazione.

È suo compito mantenersi in costante aggiornamento, per poter contribuire al miglioramento delle tecnologie presenti in laboratorio, scegliere le metodiche, i kit e i reagenti più adatti alle necessità, verificare quali tecniche e strumentazioni devono essere sostituite, perché obsolete, non più in grado di garantire agli utenti un servizio efficiente.

In questi anni di dottorato, presso il Poliambulatorio Dalla Rosa Prati, ho potuto verificare come il biotecnologo sia importante per il supporto, la collaborazione con i medici, nell'applicazione e nell'utilizzo delle tecnologie molecolari più avanzate in tutti i possibili ambiti, diagnostici e terapeutici. I continui progressi in questo settore, soprattutto in campo oncologico, ostetrico-ginecologico, medico legale e cardiaco, aprono nuovi e interessanti scenari dove la collaborazione tra biotecnologi, clinici e ricercatori può svolgere compiti sempre più importanti.

Il laboratorio diagnostico inoltre potrebbe collaborare strettamente con l'Università e i Centri di Ricerca per la sperimentazione di tecnologie innovative e per la produzione di kit diagnostici, perché avvantaggiato da un'utenza ampia che copre tutte le età, i sessi e le specialità mediche. Il costante aumento dei costi sanitari, dovuto alla crescita della domanda di salute e alla diffusione delle tecnologie avanzate, sempre più costose, orientano verso l'utilizzo dell'offerta delle strutture cliniche e delle compagnie assicurative private dove l'efficienza e il rapporto costi/qualità sono necessariamente molto controllati aprendo nuovi orizzonti per la figura del biotecnologo.

In quest'ottica il biotecnologo funge da tramite, tra le varie figure interessate nella scelta, in base alla richiesta di medici e utenti, di quali esami si possono eseguire con metodiche molecolari anziché con quelle tradizionali e, quindi, collaborare con i centri di ricerca industriali e universitari per la produzione di nuovi kit diagnostici.

Lo studio ha, inoltre evidenziato alcune criticità come ad esempio il dover conciliare il lavoro di routine con l'attività di ricerca, il che non è semplice considerando il grande carico di lavoro soprattutto nei mesi invernali, da dedicare alle analisi più routinarie.

Un'altra difficoltà che è stata riscontrata è stata quella di dover realizzare *ex novo* un laboratorio di analisi molecolari che fosse in grado di svolgere tutte le funzioni richieste da una struttura medica all'avanguardia, in una situazione in cui non erano ancora chiare le potenzialità di sviluppo e i rischi economici da sopportare.

La possibilità di organizzare dall'inizio un laboratorio, è stata un'esperienza molto importante e gratificante, che ha permesso di lavorare a stretto contatto con i medici e con la direzione sanitaria, condividendone le responsabilità e le scelte, e di apprendere anche la complessa normativa in materia, applicandola direttamente al lavoro quotidiano. Questo lavoro ha avuto un riscontro positivo da parte della Commissione Regionale per la Qualità e l'Accreditamento che ha promosso la struttura tra i centri accreditati dell'Emilia Romagna con tutte le sue branche specialistiche.

Tutto questo è stato reso possibile e facilitato dal curriculum di studi universitari e dal dottorato in Biotecnologie, che già comprendeva una formazione specifica in questo settore.

Dalla pratica quotidiana, e dalla stretta collaborazione con i medici di diverse specialità, è emersa la necessità e l'interesse, ad approfondire lo studio di questi due patogeni, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*, in gran parte sconosciuti, e di evidenziarne l'importanza clinica ed epidemiologica, adottandoli come oggetto di ricerca.

Da questo studio è emersa anche la necessità di una più attenta e diffusa opera d'informazione sulla necessità della prevenzione delle infezioni da *Chlamydia trachomatis* e da *Mycoplasma hominis* mediante l'utilizzo di biotecnologie molecolari nei programmi di screening.

## BIBLIOGRAFIA

- Requisiti specifici per l'accreditamento delle strutture di patologia clinica (laboratori di analisi), pubblicati nell'Allegato n. 3 alla DGR 327/2004 - Regione Emilia-Romagna; 2004
- Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute: <http://www.epicentro.iss.it>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- World Health Organization (OMS): <http://www.who.int>
- Istituto Superiore di Sanità: <http://www.iss.it>
- Wang Y. *et al.* (2004)- A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro* - *Nucleic Acids Research* 32(3): 1197-1207.
- Gilje B. *et al.* (2008) - High-Fidelity DNA Polymerase Enhances the Sensitivity of a Peptide Nucleic Acid Clamp PCR Assay for K-ras Mutations.- *J Mol Diagn* 10(4): 325-331.
- Watson, M.W., Lambden, P.R., Ward, M.E. and Clarke, I.N.- *Chlamydia trachomatis* 60 kDa cysteine rich outer membrane protein: sequence homology between trachoma and LGV biovars - *JOURNAL FEMS Microbiol. Lett.* 53 (3), 293-297 (1989)
- Peuchant O *et al.* (2010) - The effects of antibiotics on *Chlamydia trachomatis* viability as determined by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.*
- Misyurina OY *et al.* (2002) - Evaluation of antibiotic sensitivity of *Chlamydia trachomatis* using RT-PCR. - *Bull Exp Biol Med.*;133(3):308-10.
- Cross NA *et al.* (1999) - Antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis* using a reverse transcriptase PCR-based method. - *Antimicrob Agents Chemother.*;43(9):2311-3.
- Cochrane M *et al.* (2010) - Towards a *Chlamydia trachomatis* vaccine: how close are we? - *Future Microbiol.*; 5:1833-56.
- Beagley KW, Timms P. (2000) - *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. - *J Reprod Immunol.*;48(1):47-68.
- Howie SE *et al.* (2011)- Immunity and vaccines against sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infection. - *Curr Opin Infect Dis.*;24(1):56-61.
- Capmany A, Damiani MT. (2010) - *Chlamydia trachomatis* intercepts Golgi-derived sphingolipids through a Rab14-mediated transport required for bacterial development and replication. - *PLoS One.*;5(11):e14084.
- Fresse AS, Sueur JM, Hamdad F (2010) - Diagnosis and follow-up of genital chlamydial infection by direct methods and by detection of serum IgG, IgA and secretory IgA. - *Indian J Med Microbiol.*;28(4):326-31.
- Patel AL *et al.* (2010)- Prevalence of *Chlamydia* infection among women visiting a gynaecology outpatient department: evaluation of an in-house PCR assay for detection of *Chlamydia trachomatis*. - *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*; 8;9:24.
- R. Roosendaal *et al.* (1993)- Comparison of different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction - *J Med Microbiol* 38, 426-433;
- Schaeffer A, Henrich B (2008) - Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* and Typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR - *BMC Infectious Diseases*, 8:56
- Brunham RC, Rey-Ladino J (2005) - Immunology of Chlamydia infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine" - *Nature Reviews Immunology* 5, 149-161

- Peeling RW et al. (2006) - Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? - *Nature Reviews Microbiology* 4, S7-S19
- Gaydos CA et al. (2010) Sex Transm Dis. - *Chlamydia trachomatis* Age-Specific Prevalence in Women Who Used an Internet-Based Self-Screening Program Compared to Women Who Were Screened in Family Planning Clinics.
- Srivastava P, et al. (2008) - In infertile women, cells from *Chlamydia trachomatis* infected sites release higher levels of interferon-gamma, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha upon heat-shock-protein stimulation than fertile women. *Reprod Biol Endocrinol.*;6:20.
- Quinn TC, et al. (1996) - Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. *JAMA.* ;276(21):1737-42.
- [Guideline] Centers for Disease Control and Prevention. Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2007;56(14):332-6.
- Centers for Disease Control and Prevention. Availability of cefixime 400 mg tablets--United States, April 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57(16):435.
- Bell TA, et al. (1982) - Treatment of *Chlamydia trachomatis* in pregnancy with amoxicillin. In: Mardh PA, Holmes KK, Oriel JD, Piot P, Schachter J, eds. *Chlamydial Infections*. New York, NY: Elsevier Biomedical; 221-4.
- Bowie WR. (1984) - Nongonococcal urethritis. *Urol Clin North Am.* ;11(1):55-64.
- Cook RL, Hutchison SL, Østergaard L, et al. (2005) - Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med.* ;142(11):914-25.
- Donders GG. (2006) -Management of genital infections in pregnant women. *Curr Opin Infect Dis.* 6;19(1):55-61.
- Dorman SA, Danos LM, Wilson DJ. (1983)- Detection of chlamydial cervicitis by Papanicolaou stained smears and culture. *Am J Clin Pathol.* ;79(4):421-5
- Ehret JM, Judson FN. (1988) - Susceptibility testing of *Chlamydia trachomatis*: from eggs to monoclonal antibodies. *Antimicrob Agents Chemother.* ;32(9):1295-9.
- Hook EW 3rd, Smith K, Mullen C. (1997)- Diagnosis of genitourinary *Chlamydia trachomatis* infections by using the ligase chain reaction on patient-obtained vaginal swabs. *J Clin Microbiol.* ;35(8):2133-5.
- Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, et al, (1998) - Chlamydial Infections, Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection. San Francisco, Calif: International Chlamydial Symposium; :35-8.
- Magat AH, Alger LS, Nagey DA. (1993) - Double-blind randomized study comparing amoxicillin and erythromycin for the treatment of *Chlamydia trachomatis* in pregnancy. *Obstet Gynecol.* ;81(5(Pt1)):745-9.
- Martin DH, Mroczkowski TF, Dalu ZA. (1992) - A controlled trial of a single dose of azithromycin for the treatment of chlamydial urethritis and cervicitis. The Azithromycin for Chlamydial Infections Study Group. *N Engl J Med.* ;327(13):921-5.
- Rahman MU, Hudson AP, Schumacher HR Jr. (1992) - *Chlamydia* and Reiter's syndrome (reactive arthritis). *Rheum Dis Clin North Am.*;18(1):67-79.
- Stamm WE. (1999) - *Chlamydia trachomatis* infections: progress and problems. *J Infect Dis.* Mar 1999;179 Suppl 2:S380-3.
- Wehbeh HA, Rugeirio RM, Shahem S. (1998) - Single-dose azithromycin for *Chlamydia* in pregnant women. *J Reprod Med.* ;43(6):509-14.

- Witkin SS, Jeremias J, Grifo JA, Ledger WJ (1993) - Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen by the polymerase chain reaction in male members of infertile couples. Am J Obstet Gynecol 168: 1457
- Munoz MG, Witkin SS (1995) - Autoimmunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. Hum Reprod 10: 1070
- Taylor-Robinson D (1996) - Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An update. Clin Infect Dis 23: 671
- McCormack WM, Rosner B, Alpert S et al (1986) - Vaginal colonization with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. Sex Transm Dis 13: 67
- Kovacs GT, Wescott M, Rusden J et al (1988) - Microbiological profile of the cervix in 1,000 sexually active women. Aust N Z J Obstet Gynecol 28: 216
- Witkin SS, Kligman I, Grifo JA, Rosenwaks Z (1995) - *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* detected by the polymerase chain reaction in the cervixes of women undergoing *in vitro* fertilization: Prevalence and consequences. J Assist Reprod Genet 12: 610
- Gump DW, Moore M, Askikaga T (1984) - Lack of association between genital mycoplasmas and infertility. N Engl J Med 310: 937
- Cassell GH, Younger JB, Brown MB et al (1983) - Microbiologic study of infertile women at the time of diagnostic laparoscopy: Association of *Ureaplasma urealyticum* with a defined subpopulation. N Engl J Med 308: 502
- Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M et al (1996) - Bacterial vaginosis in pregnancy: Distribution of bacterial species in different Gram stain categories of the vaginal flora. J Med Microbiol 44: 1
- Moller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM et al (1985) - Serological evidence that *Chlamydiae* and *Mycoplasmas* are involved in infertility of women. J Reprod Fertil 73: 237
- Rose BI, Scott B (1994) - Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. Fertil Steril 61: 341
- Herrmann B, Egger M (1995) - Genital *Chlamydia trachomatis* (Ct) infections in Uppsala County, Sweden 1985-1993: declining rates for how much longer? Sex Transm Dis 22: 253
- Oh MK, Richey CM, Pate MS et al (1997) - High prevalence of *Chlamydia trachomatis* infections in adolescent females not having pelvic examinations: utility of PCR-based urine screening in urban adolescent clinic setting. J Adolesc Health 21: 80
- Addiss DG, Vaughn ML, Ludka D et al (1992) - Decreased prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection associated with a selective screening program in family planning clinics in Wisconsin. Sex Transm Dis 20: 24
- Chernesky MA and Mahony JB (1999) -Molecular Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections by Probe Hybridization, PCR, LCR,TMA, and Q-β Replicase - Sexually Transmitted Diseases Methods in Molecular Medicine, Volume 20, II, 33-46
- Roblin et al. (2003) - In Vitro Activities of Rifamycin Derivatives ABI-1648 (Rifalazil, KRM-1648), ABI-1657, and ABI-1131 against *Chlamydia trachomatis* and Recent Clinical Isolates of *Chlamydia pneumoniae* - ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 2003, p. 1135–1136
- Misyurina OY et al. (2004) - Mutations in a 23S rRNA Gene of *Chlamydia trachomatis* Associated with Resistance to Macrolides- ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Apr. 2004, p. 1347–1349 Vol. 48, No. 4
- Kutlin A. et al. (2005), Emergence of Resistance to Rifampin and Rifalazil in- *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* - ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 2005, p. 903–907 Vol. 49, No. 3

- Caldwell H.D. et al. (2003) - Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates - The Journal of Clinical Investigation , Volume 111, Number 11
- Werringloer U.D. et al. (2003) - Detection of Nucleotide Variability in *rpoB* in both Rifampin-Sensitive and Rifampin-Resistant Strains of *Chlamydia trachomatis*- ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, July 2003, p. 2316–2318 Vol. 47, No. 7
- Suchland R. J. Et al. (2005) - Rifampin-Resistant RNA Polymerase Mutants of *Chlamydia trachomatis* Remain Susceptible to the Ansamycin Rifalazil - ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, p. 1120–1126 Vol. 49, No. 3
- Verbeke P. et al. (2006)- Recruitment of BAD by the *Chlamydia trachomatis* Vacuole Correlates with Host-Cell Survival-PLoS Pathogens , 0408, Volume 2, Issue 5 , e45
- Muschiol s. et al. (2006) - A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis* - PNAS , vol. 103, no. 39
- DeMars R. et al. (2007) - Lateral Gene Transfer In Vitro in the Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* - JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 991–1003 Vol. 189, No. 3
- Binet R., Maurelli a. T. - Frequency of Development and Associated Physiological Cost of Azithromycin Resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC and *C. trachomatis* L2 - ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, p. 4267–4275 Vol. 51, No. 12
- Moelleken K. , Hegemann J.H. (2008) - The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding - Molecular Microbiology 67(2), 403–419
- DeMars R., Weinfurter J. (2008)- Interstrain Gene Transfer in *Chlamydia trachomatis* In Vitro: Mechanism and Significance - JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 1605–1614 Vol. 190, No. 5
- Huston W.M. et al. (2008) - *Chlamydia trachomatis* responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA -BMC Microbiology, 8:190 doi:10.1186/1471-2180-8-190
- Gupta R. et al. (2009)- Host immune responses to chlamydial inclusion membrane proteins B and C in *Chlamydia trachomatis* infected women with or without fertility disorders -Reproductive Biology and Endocrinology, 7:38 doi:10.1186/1477-7827-7-38
- Tietzel I., El-Haibi C., Carabeo R.A. (2009)- Human Guanylate Binding Proteins Potentiate the Anti-*Chlamydia* Effects of Interferon-c -PLoS ONE, Volume 4, Issue 8, e6499
- Hong K. C. et al. (2009) -Lack of Macrolide Resistance in *Chlamydia trachomatis* after Mass Azithromycin Distributions for Trachoma -Emerging Infectious Diseases, Vol. 15, No. 7
- Geisler W. M. et al. (2008) - *Chlamydia trachomatis* *OmpA* Genotyping As a Tool for Studying the Natural History of Genital Chlamydial Infection -Sex Transm Infect; 84(7): 541–545
- Binet R., Maurelli A.T. (2009) - The chlamydial functional homolog of KsgA confers kasugamycin sensitivity to *Chlamydia trachomatis* and impacts bacterial fitness - BMC Microbiology, 9:279
- Carlson J. H. et al. (2006) - *In vivo* and *in vitro* studies of *Chlamydia trachomatis* *TrpR*: DNA Interactions - Mol Microbiol; 59(6): 1678–1691
- Al-Zeer M.A. et al. (2009) -IFN-c-Inducible Irga6 Mediates Host Resistance against *Chlamydia trachomatis* via Autophagy - PLoS ONE, Volume 4, Issue 2, e4588
- Wang S.A. et al. (2005)- Evaluation of Antimicrobial Resistance and Treatment Failures for *Chlamydia trachomatis*: A Meeting Report -The Journal of Infectious Diseases; 191:917–23
- Battle T. J. Et al. (2001) -Evaluation of Laboratory Testing Methods for *Chlamydia trachomatis* Infection in the Era of Nucleic Acid Amplification JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 2924–2927 Vol. 39, No. 8

- Hang Lee S., Vigliotti V. S.V., Pappu S. (2009) - Molecular tests for human papillomavirus (HPV), *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in liquid-based cytology specimen -BMC Women's Health, 9:8
- Karabay O. et al. (2006) - Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in a university hospital in Turkey -Clin Exp Obstet Gynecol 33: 36-8.
- Roberts M. C. et al.(1985) -Tetracycline-Resistant *Mycoplasma hominis* Strains Contain Streptococcal tetM Sequences- ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, p. 141-143 Vol. 28, No. 1
- Bebear CM et al. (1997) - Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones - Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 269-273, Vol 41, No. 2
- Karamova A. E. et al. (2004) - Detection of Mutant *Mycoplasma hominis* Strains Resistant to 16-Membered Macrolide Antibiotic Josamycin in Clinical Samples -Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Volume 137, Number 5, 483-484
- Pereyre S. et al. (2006) - Emergence of a 23S rRNA mutation in *Mycoplasma hominis* associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin - Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 57, issue 4, 753-756
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) - High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics – Pharmacogenomics- **8** (6): 597–608.