

**ALMA MATER STUDIORUM**  
**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

---

**Dottorato di Ricerca in Biochimica**

**XVIII ciclo**

**Sede amministrativa: Università di Bologna**

**Coordinatore: Prof. Giorgio Lenaz**

**APPLICAZIONE DI METODI MOLECOLARI  
NELLA DIAGNOSI DI ALCUNE INFEZIONI  
BATTERICHE**

**Tesi di Dottorato**

**SSD: BIO/12**

Presentata da:  
**Dott.ssa Elisa Storni**

Docenti guida:  
**Prof. Claudio Stefanelli**  
**Prof. Vittorio Sambri**

---

**Anno dell'esame finale: 2007**

## INDICE

<b>CAPITOLO 1</b>	<b>pag. 4</b>
<b>LA PCR REAL-TIME NELLA DIAGNOSI DI SEPSI NEL PAZIENTE ONCOEMATOLOGICO</b>	
<b>PREMESSA</b>	<b>pag. 4</b>
<b>1. SEPSI</b>	<b>pag. 7</b>
1.1. Definizione	pag. 7
1.2. Patogenesi della sepsi	pag. 7
1.3. Epidemiologia della sepsi	pag. 11
1.4. Quadro clinico della sepsi	pag. 13
1.5. Diagnosi di sepsi	pag. 14
1.5.1. Esami chimico clinici	pag. 14
1.5.2. Analisi microbiologiche: l'emocoltura	pag. 14
1.5.3. Diagnosi molecolare	pag. 17
1.6. Cenni di terapia	pag. 21
<b>2. OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	<b>pag. 23</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 25</b>
3.1. I pazienti	pag. 25
3.2. Emocolture	pag. 26
3.3. PCR real-time	pag. 27
3.3.1. LightCycler® SeptiFast Test M <sup>GRADE</sup>	pag. 31
3.4. Analisi statistica	pag. 35
<b>4. RISULTATI</b>	<b>pag. 36</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 42</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 45</b>

## INDICE

<b>CAPITOLO 2</b>	<b>pag. 52</b>
<b>ANALISI COMPARATIVA DEL GENE PLASMIDICO <i>ORF3</i> DI <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Chlamydia psittaci</i> MEDIANTE RFLP-PCR</b>	
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 52</b>
1.2. Classificazione e definizione	pag. 52
1.3. Ciclo di sviluppo	pag. 54
1.4. La cellula batterica	pag. 55
1.5. Genoma	pag. 57
1.6. Struttura antigenica	pag. 59
1.7. Infezioni	pag. 60
1.8. Diagnosi di laboratorio	pag. 61
1.9. Cenni di terapia	pag. 63
<b>2. OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	<b>pag. 64</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 65</b>
3.1 Ceppi batterici	pag. 65
3.2. Colture cellulari	pag. 65
3.3. Estrazione del DNA	pag. 67
3.4. PCR del gene <i>orf3</i> e analisi del polimorfismo dei siti di restrizione (RFLP)	pag. 67
3.5. Clonaggio di ORF3 e determinazione della sequenza nucleotidica	pag. 68
3.6. Espressione e purificazione della proteina <i>pgp3</i> ricombinante di <i>C. psittaci</i> .	pag. 69
3.7. SDS-PAGE e Western Immunoblotting	pag. 76
<b>4. RISULTATI</b>	<b>pag. 77</b>
4.1. RFLP PCR-based del gene <i>orf3</i>	pag. 77

<b>4.2. Analisi della sequenza del gene <i>orf3</i></b>	<b>pag. 77</b>
<b>4.3. Analisi WB</b>	<b>pag. 77</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 79</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 85</b>

# CAPITOLO 1

## LA PCR REAL-TIME NELLA DIAGNOSI DI SEPSI NEL PAZIENTE ONCOEMATOLOGICO

### PREMESSA

La diagnostica di laboratorio ha subito, a partire dagli anni novanta, importanti cambiamenti sia di tipo tecnologico che organizzativo in seguito all'avvento delle tecniche di *Biologia Molecolare*<sup>1</sup>. Il successo nel trattamento di un paziente con un'infezione batterica richiede una rapida e specifica identificazione dell'agente eziologico. L'identificazione dei batteri patogeni mediante i metodi tradizionali basati sull'espressione fenotipica di antigeni o sui prodotti biochimici del metabolismo è ancora un elemento cruciale nel processo diagnostico. I metodi di coltura e sottocolture dei batteri, specialmente nel caso di batteri esigenti (lunghi tempi di replicazione, esigenze nutrizionali complesse, mancanza di terreni idonei alla crescita in vitro) e dopo inizio di una terapia antibiotica, possono, tuttavia, dimostrarsi fallimentari e prolungare la diagnosi definitiva e il trattamento del paziente. Contemporaneamente al miglioramento delle tecniche tradizionali come l'introduzione dell'automazione delle emocolture, il laboratorio di microbiologia clinica ha progressivamente introdotto i test basati sugli acidi nucleici (NATs: nucleic acid-based tests) per l'identificazione dei patogeni in modo rapido ed affidabile (tabella 1). In virologia le tecniche molecolari hanno aperto una via diretta alla diagnosi e hanno consentito il monitoraggio dell'attività replicativa virale durante la storia naturale dell'infezione e in seguito a terapia oltre ad essere utilizzate nei test di farmacoresistenza e genotipizzazione<sup>2,3,4</sup>. Non mancano applicazioni nella diagnostica parassitologica e nel campo della micologia relativamente alle sempre più diffuse infezioni da lieviti e funghi filamentosi nei pazienti neutropenici<sup>5,6</sup>. La Polymerase Chain Reaction (PCR), a partire dalla sua introduzione nei laboratori nel 1986, è la tecnica di amplificazione degli acidi nucleici più largamente usata nel laboratorio microbiologico e ormai ha sorpassato l'applicazione dei metodi basati sul principio dell'ibridazione e quelli basati sul principio dell'amplificazione del segnale. Dopo il primo test NAT approvato nel 1988 dalla Food and Drug Administration per la *Chlamydia trachomatis* e la *Neisseria gonorrhoeae*, oggi si stanno sviluppando metodiche NATs capaci di rilevare virtualmente ogni batterio patogeno. Il vantaggio dei metodi NATs rispetto ai metodi microbiologici include la possibilità di avere

risultati in tempi rapidi, specifici e con un'elevatissima sensibilità. Nell'ambiente ospedaliero il fattore tempo è estremamente importante per la somministrazione tempestiva di un trattamento adeguato oltre a consentire, potenzialmente, una riduzione dei tempi di degenza. Le epidemie in comunità e le infezioni nosocomiali potrebbero essere meglio controllate se una rapida identificazione del agente patogeno consentisse un immediato isolamento del paziente e la profilassi dei contatti. Inoltre, i programmi di controllo delle infezioni ospedaliere e quelli epidemiologici hanno tratto largo beneficio dall'uso dei NATs per la tipizzazione dei batteri e l'individuazione dei geni di resistenza agli antibiotici (tabella 2)<sup>7,8</sup>.

**Tabella 1.** Esempi di applicazione dei metodi molecolari nella diagnosi di malattie infettive.

Settore	Esempi
Virologia	Virus Herpes Simplex, Varicella Zoster, Herpes Virus Umano tipo 6, 7, 8, Citomegalovirus, Virus di Epstein-Barr Virus Respiratori ( Influenza, Virus Respiratorio Sinciziale, Parainfluenza Virus Adenovirus ), *SARS-CoV, Virus dell'Influenza Aviaria HIV, HBV, HCV Papillomavirus, enterovirus
Batteriologia	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , micoplasmi genitali <i>B. pertussis</i> , <i>M. tuberculosis</i> , MOTT, <i>T. whipplei</i> , <i>B. henselae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , <i>Legionella spp.</i> <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Parassitologia	<i>Plasmodium spp</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>
Micologia	<i>P. jiroveci</i> , <i>Aspergillus spp.</i> <i>Candida spp.</i>

\* Severe acute respiratory syndrome-coronavirus.

Le metodiche NATs possono essere impiegate per rilevare la presenza del microrganismo direttamente nel campione clinico o in coltura abbreviandone i tempi di incubazione oppure ancora in campioni la cui coltura è risultata negativa, infatti, non è necessario che i batteri mantengano la capacità di moltiplicarsi essendo il materiale genomico di questi il bersaglio del test. Nel caso delle meningiti batteriche la mancanza di una diagnosi precoce e per la somministrazione di una corretta terapia antibiotica nel paziente e per la chemioprolifassi dei contatti può avere conseguenze devastanti. I metodi PCR possono fornire un risultato nello

stesso giorno a partire dal campione di liquor cefalo rachidiano. In alcuni laboratori è già possibile procedere routinariamente alla ricerca di *Neisseria meningitidis* nei casi clinici sospetti e risalire al genotipo per i sierogruppi B e C. PCR multiplex sono state sviluppate per la rapida individuazione dei batteri comune causa di meningiti: insieme con la *N. meningitidis*, lo *Streptococcus pneumoniae* e l'*Haemophilus influenzae* tipo B da soli sono responsabili del 90% delle meningiti batteriche <sup>9</sup>.

L'isolamento dei batteri dal sangue ha sempre avuto un ruolo importante nella diagnosi per i pazienti febbrili: per stabilire la presenza di un'infezione e perciò escludere una causa di febbre di origine non infettiva, per rassicurare il clinico rispetto alla scelta della terapia empirica e per ottimizzare la terapia antibiotica dopo aver saggiato la sensibilità del batterio isolato ai farmaci. Le emocolture hanno avuto un ruolo centrale nei laboratori microbiologici come "gold standard" per rilevare un'infezione del torrente circolatorio in pazienti febbrili. Nei decenni trascorsi, vari metodi sono stati proposti per ottimizzare la diagnosi di infezione batterica e/o fungina del sangue che, in particolare, rimane una sfida aperta in pazienti critici quali sono i pazienti immunocompromessi, come i pazienti con neoplasia in cui approssimativamente la metà delle emocolture rimane negativo.

**Tabella 2.** Esempi dell'uso dei metodi molecolari nel laboratorio di microbiologia clinica diversi dall'identificazione dei microrganismi.

Test	Esempi
Monitoraggio del carico virale	Citomegalovirus, Epstein-Barr Virus HBV, HCV, HIV
Genotipizzazione virus	HIV, HBV, HCV, Papillomavirus
Genotipizzazione batteri	<i>M. tuberculosis</i> , <i>N. meningitidis</i>
Farmacoresistenze	*MRSA, °VRE, #ESBL, <i>M. tuberculosis</i>
PCR a largo spettro	Endocarditi infettive, meningiti batteriche

\* *S. aureus* meticillino resistenti

° Enterococchi vancomicina resistenti

# beta-lattamasi ad ampio spettro

# 1. SEPSI

## 1.1. Definizione

Per circa un secolo, la sepsi è stata definita come una risposta infiammatoria sistemica dell'ospite ad un'infezione. L'infiammazione durante la sepsi dà origine ad una sindrome sistemica con numerose manifestazioni, come il danno tissutale, l'aumento della permeabilità vascolare fino alla disfunzione di molti organi e allo shock. Originariamente, la sepsi si riteneva essere associata alla presenza di batteri nel torrente circolatorio (batteriemia), ed il termine "sepsi" e "setticemia" erano rispettivamente intercambiabili sul piano clinico <sup>10</sup>.

Nel 1989, Bone et al. stabilirono una semplice definizione per la sindrome settica basata su specifici sintomi clinici che includeva una sorgente di infezione accertata <sup>11</sup>. La sintomatologia clinica, tuttavia, era presente frequentemente anche in pazienti caratterizzati da pancreatite o da trauma. Questa discrepanza fu tenuta in considerazione dalla Consensus Conference del 1992, quando fu coniato il termine "Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica" (SIRS), che non richiede la presenza di infezione. Inoltre, furono introdotti i termini di "sepsi severa" e di shock settico" per differenziare diversi stadi della malattia (tabella 3) <sup>12</sup>.

Attualmente è stato proposto il sistema di stratificazione PIRO che descrive lo stadio della sepsi sulla base della **P**redisposizione genetica, del tipo e della fonte di **I**nfezione, della **R**isposta dell'ospite e dell'**I**nsufficienza d'**O**rgano <sup>11</sup>. Questa classificazione prende in considerazione lo stato clinico del paziente e le analisi cliniche ed è un sistema più preciso per classificare i disordini correlati alla sepsi.

## 1.2. Patogenesi della sepsi

La risposta infiammatoria sistemica si basa su un sistema di attivazione cellulare con rilascio di mediatori pro ed antinfiammatori che contribuiscono alla insorgenza di quadri clinici a gravità crescente: SIRS>Sepsi>Sepsi grave>Disfunzione d'organo>Shock settico. L'evento chiave è la rapida attivazione della cascata dei sistemi umorali (complemento, coagulazione, sistema callicreina-chinine) e delle cellule che sostengono la risposta infiammatoria (granulociti, monociti, linfociti, macrofagi, cellule endoteliali) <sup>13</sup>. Queste cellule, una volta attivate, producono e rilasciano i mediatori della risposta infiammatoria e molecole vasoattive o citotossiche. Questo processo è caratterizzato da interazioni sinergiche e antagonistiche a volte ridondanti e una netta differenziazione tra mediatori ed effettori è impossibile a causa



delle numerose funzioni pleiotropiche di queste sostanze. Al centro del processo si pone la reazione immunologica alle tossine microbiche.

**Tabella 3.** Definizione clinica di sepsi

<b>SIRS</b> (sindrome da risposta infiammatoria sistemica)	Temperatura >38,3°C o <36°C Velocità del cuore >90 battiti/minuto Velocità respiratoria > 20 respiri/minuto o PaCO <sub>2</sub> <32 mmHg Numero di cellule bianche nel sangue >12*10 <sup>9</sup> /l, o >10% delle forme immature
<b>Sepsi</b>	Risposta sistemica all'infezione, che si manifesta mediante due o più condizioni caratteristiche della SIRS (SIRS + infezione accertata)
<b>Sepsi severa</b>	Sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione compresa acidosi lattica, oliguria, o alterazioni acute dello stato mentale
<b>Shock settico</b>	Ipotensione indotta da sepsi (es: pressione sistolica <90 mmHg) nonostante l'utilizzo di infusioni di liquido. Può comprendere acidosi lattica, oliguria, alterazioni acute dello stato mentale.
<b>MODS</b> (sindrome della disfunzione multi-organo)	Presenza di disfunzione d'organo in un paziente acuto in cui l'omeostasi non può essere mantenuta senza interventi.

I patogeni classicamente responsabili di sepsi severa sono i batteri Gram-negativi e le loro endotossine [lipopolisaccaride (LPS)]. Inoltre, è stato dimostrato che anche il componente della parete batterica dei Gram-positivi (peptidoglicani, acido teicoico) o dei funghi e le esotossine [tossina 1 della sindrome da shock tossico (TSST-1)] possono attivare la cascata infiammatoria<sup>14</sup>. Queste molecole legano recettori sulla membrana cellulare e recettori solubili [CD14, MBP (mannose binding protein), TLR (toll-like receptor)], inducendo un'eccessiva produzione e rilascio di mediatori pro-infiammatori come il TNF-alfa (tumor necrosis factor), Interleuchina-1 (IL-1) Interleuchina-6 (IL-6) ed altri (tabella 4)<sup>15</sup>. Il primo organo bersaglio nell'attivazione di uno stato settico è proprio l'endotelio vascolare; l'azione sulle cellule endoteliali mediata da citochine e dall'adesione dei batteri all'endotelio stesso

porta all'espressione di molecole cui si legano i neutrofili circolanti con lo scopo di fagocitare i batteri adesi alla parete vascolare <sup>16</sup>.

**Tabella 4.** Mediatori prodotti da cellule del sistema immunitario implicati nella patogenesi della sepsi.

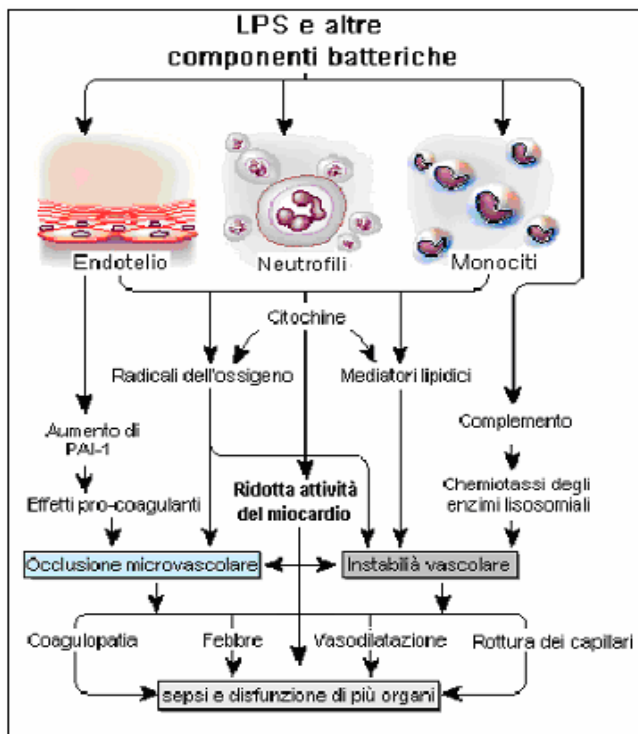
Mediatori	Effetti tipici
Citochine IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIF, HMGB1, IL-10	attivano i neutrofili, i linfociti e l'endotelio vascolare; stimolano le molecole di adesione cellulare; inducono le prostaglandine, l'ossido nitrico-sintasi e le proteine della fase acuta; inducono febbre; IL-10 è un regolatore negativo di questi effetti.
Chemochine IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MCP-3	mobilizzano e attivano le cellule infiammatorie; attivano i macrofagi.
Mediatori lipidici Platelet-activator factor, prostaglandine, leucotrieni, trombossani, fattore tissutale	attivano l'endotelio vascolare; regolano il tono vascolare; attivano la cascata estrinseca della coagulazione
Radicali dell'ossigeno Radicale superossido e idrossile; ossido nitrico.	hanno proprietà antimicrobiche; regolano il tono vascolare

La fagocitosi di cellule batteriche presenti sulla parete vascolare è poi causa di danno alla parete stessa, con fenomeni quali l'uscita di liquidi, la deplezione del volume intravascolare, l'adesione delle piastrine con riduzione delle piastrine circolanti (piastrinopenia) e conseguente attivazione dei processi coagulativi (allungamento del tempo di protrombina, D-Dimero elevato). La compromissione dell'integrità dell'endotelio vascolare induce alterazioni nel trasporto di ossigeno e CO<sub>2</sub> dalle cellule, con conseguente ipossiemia, aumento di acido

lattico e acidosi metabolica.

Mentre la fase precoce della sepsi è caratterizzata da una eccessiva reazione iper-infiammatoria del sistema immunitario, successivamente il rilascio di effettori anti-infiammatori (IL-4, IL-10, IL-13, cortisolo ect, ) può indurre una sindrome compensatoria anti-infiammatoria<sup>17</sup>. A seguito di questa reazione compensatoria possono manifestarsi anergia o immunosoppressione. E' stato infatti osservato anche un esteso processo apoptotico a carico dei linfociti confermato anche da studi su animali. I pazienti con sepsi sono generalmente linfopenici e dall'analisi autoptica di alcuni tessuti si osserva una riduzione selettiva dei linfociti B e linfociti T CD4<sup>+</sup>. Questo processo e le sue conseguenze funzionali determinano uno stato generale di immunosoppressione, che può essere considerato come una risposta non equilibrata allo stato pro-infiammatorio iniziale, responsabile, in ultima analisi, della inadeguata risposta dell'ospite nel combattere l'infezione e della progressiva insufficienza di molti organi.

La disfunzione d'organo nella sepsi severa dipende direttamente dall'effetto citotossico dei mediatori dell'infiammazione, dalle tossine batteriche, dalla ipossia tissutale, dalla contemporanea presenza di processi coagulativi e di depressione dei sistemi inibitori la coagulazione stessa che possono evolvere fino ad una vera e propria coagulazione intravascolare disseminata (CID)<sup>18</sup>. La deregolazione dell'attività fibrinolitica induce la formazione di microtrombi che alterano la per fusione d'organo, inducendone la disfunzione. .Lo stato di insufficienza di numerosi organi risulta essere la causa di morte in pazienti con sepsi. Generalmente questi pazienti sviluppano dapprima la disfunzione di un solo organo, che si trasforma rapidamente in Multiple Organ Failure (MOF)<sup>19</sup> (figura 1). Esiste una stretta correlazione tra il numero di organi coinvolti e il rischio di morte: se quattro o cinque organi sono danneggiati la mortalità è superiore al 90%.



**Figura 1.** Patogenesi della sepsi e della disfunzione degli organi.

### 1.3. Epidemiologia della sepsi

La sepsi rappresenta un gravoso onere per la salute pubblica sia in termini di vite umane che di costi. Risulta difficoltoso avere accurati dati epidemiologici sulla sepsi sia relativamente alla distribuzione demografica che rispetto le variazioni temporali di incidenza ed esito a causa dell'eterogeneità dei pazienti e perché spesso la sepsi viene indicata come complicanza di altre malattie e non come sindrome a sé stante.

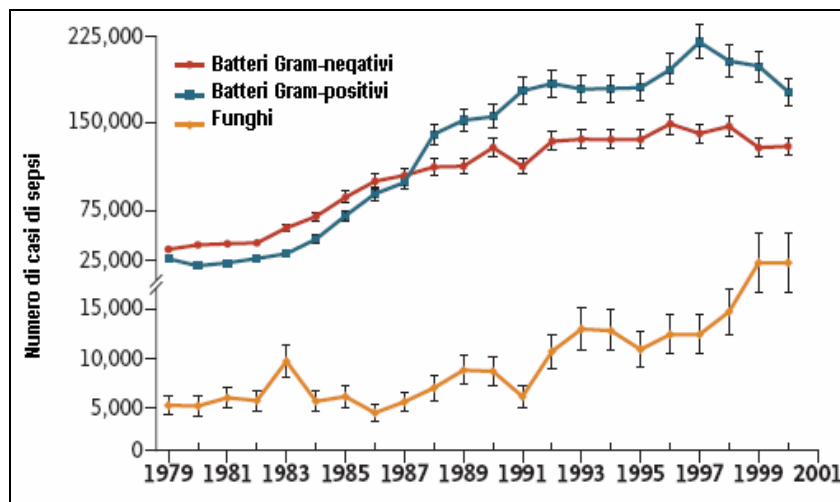
La sepsi è una patologia molto frequente e presenta un'incidenza di circa 1,3-1,5 casi ogni 1000 abitanti in Europa <sup>20,21</sup>, mentre negli USA la sindrome settica colpisce più di 700.000 persone annualmente ed è responsabile di circa 200.000 morti ogni anno. In Italia il tasso di mortalità è piuttosto elevato e compreso fra il 36% della sindrome settica e l'82% in pazienti con shock settico <sup>22</sup>. La mortalità appare fortemente correlata alla gravità del quadro settico del paziente e aumenta progressivamente al progredire della sepsi verso lo shock settico e parallelamente all'aggravarsi dell'insufficienza multiorgano. Secondo le ultime stime l'incidenza sta aumentando a livelli compresi tra 1,5 e 8% ogni anno, probabilmente a causa dell'aumentato impiego di procedure invasive, di farmaci immunosoppressivi, di chemioterapici, di trapianti, dell'emergenza del virus HIV e di un aumento della resistenza microbica ai farmaci <sup>23</sup>. Tale sindrome si colloca al secondo posto quale causa di morte in

pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva e al decimo posto come causa di morte generale negli Stati Uniti. Inoltre è stato dimostrato come la sepsi riduca la qualità della vita in coloro che sopravvivono <sup>24</sup>. La sepsi rappresenta uno dei maggiori aggravati per il sistema sanitario americano con costi che si stimano intorno ai 17 miliardi di dollari ogni anno <sup>23</sup>.

La sindrome settica si sviluppa più tardivamente nel sesso femminile rispetto a quello maschile (figura 3): l'età media tra le donne è di 62,1 anni contro i 56,9 negli uomini.

Per quanto riguarda i microrganismi, principale causa di sepsi, negli ultimi anni si è registrata la prevalenza dei batteri Gram-positivi rispetto ai batteri Gram-negativi (figura 2). Oltre ad un incremento medio annuale del 26,3% a favore delle infezioni sostenute dai batteri Gram-positivi, nel 2000 si registra anche un aumento dell'incidenza delle infezioni fungine del 207%. Questo incremento è da attribuire all'aumento delle infezioni nosocomiali dovute all'impiego di cateteri oppure alla somministrazione di farmaci immunosoppressivi ed è particolarmente allarmante considerando che è in aumento anche il numero di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti isolati da questi pazienti <sup>25</sup>.

I siti primari d'infezione sono il tratto respiratorio (40-44% dei casi), seguito dal tratto genito-urinario (9-18% dei pazienti) e dalle infezioni intra-addominali (9-14%) <sup>23</sup>.



**Figura 2.** Numero di casi di sepsi negli Stati Uniti, distinti a seconda degli organismi responsabili. I punti rappresentano l'incidenza per il determinato anno, le barre mostrano l'errore standard.

Un importante studio epidemiologico su pazienti con sepsi in vari stadi ha dimostrato che l'esito della malattia settica è correlato alla severità della risposta infiammatoria dell'ospite e non solo alla presenza della batteriemia. I punti fondamentali per migliorare la prognosi dei

pazienti con sepsi sono stati individuati come i seguenti: prevenzione delle infezioni nosocomiali, diagnosi tempestiva di sepsi e terapia appropriata di ogni fase <sup>26</sup>.

La compresenza di malattie croniche è una condizione comune tra pazienti con sepsi. Studi epidemiologici mostrano come nel 54-65% di questi pazienti siano presenti co-morbidità. Il cancro è una delle più comuni condizioni di co-morbidità cronica nei pazienti con sepsi <sup>27,28</sup>. A causa del loro stato di immunodepressione sono considerati a maggior rischio per infezioni severe e sepsi. La depressione del sistema immunitario nei pazienti con tumore è dovuto a diversi fattori: chemioterapia, trattamenti specifici con farmaci immunosoppressivi, trapianto di midollo con conseguente spiccata e prolungata neutropenia (neutropenia è definita come una conta di neutrofili  $<500$  cellule/mm<sup>3</sup>), e il cancro stesso. Inoltre sono presenti altri fattori che predispongono i pazienti oncoematologici al rischio di infezioni nosocomiali: la durata dell'ospedalizzazione, l'utilizzo di cateteri vascolari e non, procedure diagnostiche invasive, e trattamenti empirici e prolungati con antibiotici a largo spettro <sup>29</sup>.

#### **1.4. Quadro clinico della sepsi**

Da un punto di vista clinico, l'inizio della sepsi è piuttosto insidioso e può essere caratterizzato dalla comparsa di febbre, uno stato di agitazione e di confusione mentale, ipotensione transitoria, diminuita minzione. Tutti questi sono segni alquanto aspecifici e pertanto la diagnosi si deve sospettare quando queste manifestazioni compaiono in soggetti a rischio di shock, quali i pazienti immunodepressi per qualsivoglia motivo, in soggetti con estese ustioni o politraumatizzati, in pazienti di età molto avanzata, nei diabetici e in tutti i soggetti che abbiano cateteri urinari o intravascolari impiantati da un certo tempo.

Gli esami ematochimici indicano leucocitosi, neutropenia, trombocitopenia, riduzione degli indici di sintesi epatica (albumina, pseudocolinesterasi, attività protrombinica). Questa fase clinica della sepsi può perdurare per lungo tempo, anche se talvolta può presentarsi acutamente, ed è una fase reversibile se si realizza un controllo farmacologico e/o chirurgico del focolaio settico iniziale. Se ciò non si verifica, il processo settico può evolvere fino all'instaurarsi della condizione di shock. In quest'ultimo caso è presente una grave compromissione della coscienza; compaiono segni di scompenso cardiaco (ipotensione, edemi periferici diffusi) che spesso non rispondono ai presidi farmacologici; il paziente è gravemente ipossico e spesso necessita di una ventilazione meccanica per insorgenza della sindrome da difficoltà respiratoria acuta (ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome). Il paziente può presentare una compromissione della funzionalità renale con sviluppo di

iperazotemia; il quadro metabolico è caratterizzato da un'importante acidosi lattica. L'evoluzione è verso una condizione di insufficienza multi-organo. I criteri di leucocitosi, leucopenia, o scostamento a sinistra nella conta differenziale dei globuli bianchi non possono essere applicati nei pazienti neutropenici. Se si riscontrano segnali di reazione sistemica infiammatoria in un paziente neutropenico in assenza di cause oltre che un'infezione, allora è necessario porre diagnosi di sepsi.

## **1.5. Diagnosi di sepsi**

A differenza di altre patologie la sepsi non ha marcatori specifici e può essere estremamente difficile stabilire quando l'infezione è la causa scatenante della risposta infiammatoria sistemica e localizzare il sito di infezione specialmente in pazienti con una batteriemia primaria o in presenza di co-morbidità. La diagnosi si basa su sistemi di classificazione dei sintomi e segni clinici, sull'identificazione di markers correlati alla presenza di sepsi e sull'identificazione del microrganismo responsabile.

### 1.5.1. Esami chimico-clinici

L'elenco di biomarkers associati alla sepsi è piuttosto esteso e include citochine, chemochine, mediatori di adesione, recettori solubili, proteine della fase acuta <sup>30</sup>. Nessun marker attualmente disponibile è specifico di sepsi, tuttavia l'analisi di particolari parametri può facilitare la diagnosi in pazienti con un quadro suggestivo di sepsi. Tra questi i più comunemente studiati sono la proteina C-reattiva, la procalcitonina, IL-6, IL-8 <sup>31,32,33,34</sup>.

La rivelazione dei biomarker può essere effettuata mediante tecniche immunometriche, come il test ELISA o l'analisi immunoluminometrica, o mediante la tecnica della citometria a flusso anche se si tratta di saggi la cui applicazione è piuttosto limitata.

### 1.5.2. Analisi microbiologiche: l'emocoltura

L'emocoltura è tradizionalmente il "gold standard" per la diagnosi di sepsi e ha grande valore diagnostico in quei casi in cui è difficile effettuare una diagnosi microbiologica legata al sito di infezione, come per le endocarditi, per le infezioni endovascolari, del tratto biliare o di origine sconosciuta, ma anche per quelle infezioni fortemente radicate che richiedono procedure invasive per il prelievo del campione.

L'emocoltura, inoltre, costituisce un importante strumento epidemiologico sul quale basare la terapia empirica. Tuttavia, il valore dell'emocoltura come test diagnostico nella diagnosi di batteriemia è notevolmente limitato perché è una tecnica lenta nel fornire risultati (minimo 48h), ha scarsa sensibilità per la ricerca di particolari microrganismi, che spesso sono responsabili di polmoniti acquisite in comunità, quali *Legionella pneumophila*, *Chlamydia*

*pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*, e richiede che il prelievo sia eseguito prima dell'inizio della terapia antibiotica altrimenti perde sensibilità<sup>35</sup>. La positività di una coltura di sangue rappresenta il metodo più certo per la diagnosi. Purtroppo, però, spesso la sintomatologia si manifesta anche in assenza di coltura positiva: negli studi effettuati si osserva che la coltura si positivizza dall'8 al 73% dei pazienti neonati e dall'8 all'88% dei casi adulti<sup>29</sup>. La mancanza di tempestività della diagnosi colturale determina la necessità di intervenire con una terapia antibiotica empirica ad ampio spettro, che a sua volta ha importanti conseguenze sulla gestione delle infezioni nosocomiali. Infatti, le terapie empiriche causano l'aumento della frequenza di infezioni nosocomiali<sup>73</sup> ed inducono l'emergenza di ceppi batterici resistenti agli antibiotici, come *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti ed enterococchi resistenti alla vancomicina<sup>36</sup>. La somministrazione di un farmaco antimicrobico inefficace inoltre determina l'aumento del costo del trattamento perché bisogna intervenire con una terapia antibiotica aggiuntiva e prolungare, così, l'ospedalizzazione.

Pazienti neutropenici febbrili che ricevono una profilassi antibiotica sono a elevato rischio di sviluppare infezioni nel sangue, ma la diagnosi di batteriemia risulta difficile perché l'esame colturale rimane negativo in molti casi<sup>37</sup>. Per superare gli effetti inibitori degli antibiotici sulla crescita dei batteri presenti nel sangue, sono stati sviluppati particolari terreni di coltura contenenti resine che, sequestrando l'antibiotico presente nel sangue, migliorano la sensibilità dell'emocoltura<sup>38,39,40,41</sup>. Un'ulteriore complicazione nell'interpretazione del risultato dell'emocoltura è la presenza di contaminazioni. Il rischio di contaminazione dei campioni di sangue può essere ridotto se si adottano prodotti anti-sepsi per la pelle e un adeguato protocollo di prelievo, ma l'interpretazione di un'emocoltura positiva per un sospetto contaminante rimane difficile, soprattutto in pazienti neutropenici febbrili che spesso hanno un catetere venoso centrale a permanenza.

#### Tempi e modalità di prelievo

L'efficacia ed il significato clinico dell'emocoltura dipendono da molteplici aspetti metodologici e interpretativi. Il risultato ottimale di questo esame, infatti, dipende dal volume del campione, dal momento del suo prelievo e dall'accuratezza con cui questo viene eseguito. Nella fase pre-analitica questi parametri rappresentano elementi di fondamentale importanza per quanto riguarda il rischio di contaminare il campione e di ottenere il prelievo in un momento non idoneo. È così che si possono presentare delle difficoltà nell'interpretazione dei risultati o che si possano generare risultati falsi positivi o falsi negativi.

È necessario effettuare il prelievo ai primi sospetti d'infezione e prima di iniziare qualsiasi terapia antimicrobica; a terapia iniziata è consigliabile sospendere la somministrazione dei



farmaci per alcune ore, ma se ciò non è clinicamente possibile bisogna prelevare il sangue nel momento in cui si presume che la concentrazione di antibiotico sia minima, cioè immediatamente prima di una nuova somministrazione.

Quando la sepsi è di origine endovascolare, il paziente presenta una febbre continua, quindi si consiglia di effettuare quattro prelievi, ciascuno ogni sei ore, al fine di avere maggiore probabilità di isolare il microrganismo responsabile e di stabilire il regime terapeutico più opportuno. Se l'origine della sepsi è extravascolare, la sintomatologia più caratteristica è la presenza di brividi, tremore e di una forte sensazione di freddo accompagnata dal contemporaneo aumento della temperatura corporea in un determinato periodo della giornata. In questi pazienti è necessario che il prelievo sia eseguito quando si genera il brivido e prima di raggiungere l'apice febbrile perché in questo momento la concentrazione batterica è molto elevata e diminuisce progressivamente all'aumentare della febbre e al potenziarsi della risposta immunitaria. In questi pazienti si dovrebbero effettuare anche altri due o tre prelievi nella successiva mezz'ora.

Il prelievo per emocoltura è quello che richiede maggiori precauzioni per evitare la contaminazione; la presenza accidentale di batteri commensali cutanei può dar luogo alla moltiplicazione intensa di questi mascherando od ostacolando la crescita dei patogeni responsabili. Nel prelievo venoso, quindi è necessario porre la massima attenzione ai dettagli tecnici, seguendo una modalità che riduca al minimo la possibilità di contaminazione da microrganismi cutanei (Stafilococchi Coagulasi Negativi –CoNS, Corinebatteri, *Propionibacterium acnes*). Questi, in particolari circostanze (sepsi da catetere endovenoso, endocarditi su valvole artificiali), possono avere un significato patologico, ma molto più spesso sono contaminanti nella fase del prelievo del campione e possono fornire al clinico informazioni fuorvianti.

Il volume di sangue da prelevare è un elemento importante in quanto è in relazione diretta con la possibilità di avere una positività. L'inoculo di tre unità-formanti colonie (cfu) in emocoltura è richiesto per dare il 100% di positività<sup>42</sup>. La concentrazione dei batteri in pazienti adulti è frequentemente inferiore a un microorganismo per millilitro<sup>43</sup>. Per questi motivi il volume da inoculare nei flaconi è una variabile estremamente importante; negli adulti è richiesto un minimo di 10 ml per bottiglia<sup>44,45</sup>, mentre per i campioni pediatrici, che contengono più cfu per millilitro, è sufficiente l'inoculo di 0,5-2 ml di sangue<sup>46</sup>. Una volta introdotto il sangue nel flacone, questo va agitato delicatamente per evitare la formazione di coaguli.

### 1.5.3. Diagnosi molecolare

Studi di genetica dei microrganismi indicano che la ricerca di specifiche sequenze di DNA comuni a tutti i batteri è un possibile strumento diagnostico. Infatti, tra i batteri e i funghi sono state identificate delle sequenze nella porzione di DNA codificante, rispettivamente, per la subunità 16S e 18S dei ribosomi.

Con le tecniche molecolari l'identificazione dei batteri può essere ottenuta in tempi molto ridotti (2-6 h) e direttamente sul campione di sangue oppure dopo crescita in un terreno di coltura. Queste tecniche possono essere distinte in due categorie: quelle basate sul principio dell'amplificazione e quelle che utilizzano il principio dell'ibridazione (figura 3).

Le tecniche di ibridazione si prestano bene all'analisi dei patogeni in colture di sangue positive e comprendono il test di ibridazione con sonde e l'ibridazione fluorescente *in-situ* (FISH). La prima impiega sonde di oligonucleotidi lunghe circa 50 bp marcate con un label chemiluminescente o fluorescente. Vista la corta sequenza, queste sonde sono incapaci di ibridare tra loro, ma sono in grado di legare piccole subunità di rRNA, secondo il principio della complementarità delle basi, e di formare una molecola duplex se la sequenza bersaglio dell'acido nucleico è presente. Il duplex così formato può essere rivelato mediante la sua marcatura. Il DNA non legato viene idrolizzato e perde così la sua chemiluminescenza. Questo saggio permette di identificare il patogeno in 60 minuti a livello di genere, specie o entrambi, a seconda della matrice utilizzata. È possibile anche identificare i responsabili di un'infezione polimicrobica impiegando due diversi pattern chemiluminescenti o comparando il segnale della sonda genere/specie-specifica con il segnale ottenuto con la sonda che marca una sequenza comune a tutti i batteri. Si tratta di una tecnica sensibile e specifica che necessita di ulteriori valutazioni per entrare nella pratica clinica <sup>35</sup>.

Per la tecnica FISH le cellule batteriche cresciute in emocoltura si spottano su vetrini, vengono permeabilizzate e incubate con una sonda oligonucleotidica fluorescente diretta contro una specifica sequenza di rRNA. La fluorescenza è il risultato del legame della sonda all'RNA target ed è visibile ad un microscopio a fluorescenza. In 2-5 ore la FISH permette l'identificazione del 95% dei principali batteri e lieviti che si trovano comunemente nel sangue <sup>47,48,49</sup>. Alcuni batteri sono identificati solo a livello di genere perché non sono disponibili sonde specie-specifiche. In questi saggi è sempre presente come controllo una sonda proveniente dagli eubatteri per identificare la presenza di batteri per i quali nessuna ulteriore identificazione è possibile. Questa precauzione è necessaria a causa dei problemi nel disegnare le sonde per alcuni patogeni, come avviene nel caso degli Stafilococchi coagulasi-negativi per i quali nessuna sonda può essere disegnata sulla base della sequenza ribosomiale

16S, perciò la loro identificazione si ottiene per esclusione quando è presente il segnale fluorescente di una sonda specifica per il genere *Staphylococcus*, ma manca il segnale della sonda specie-specifica dello *Staphylococcus aureus*<sup>50</sup>.

Le tecniche di ibridazione fluorescente in situ sono le più promettenti per l'identificazione di batteri in emocolture positive, però è necessaria la crescita della colonia che può portare via troppo tempo e non essere vantaggiosa nel rapporto costo/efficacia nella gestione del paziente.

Le tecniche di amplificazione comprendono quelle che amplificano un bersaglio (PCR), la reazione a catena della ligasi (LCR), tecniche di amplificazione isotermica e quella del DNA ramificato (bDNA).

La PCR è la tecnica di amplificazione più comune ed è particolarmente utile quando la carica batterica è bassa o la subcultura richiede tempo, come nel caso dei micobatteri e dei funghi. Le colture di sangue positive possono essere analizzate anche mediante una PCR multiplex per identificare diversi generi e diverse specie e ciò risulta estremamente importante nel caso di pazienti affetti da AIDS in cui si ha la possibilità di migliorare l'esito del trattamento. Ma la rivelazione rapida dei patogeni è importante anche per i patogeni invasivi associati ad un elevato tasso di mortalità e morbilità, come gli *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti, per i quali è possibile identificare mediante PCR non solo la specie, ma anche il gene che conferisce la resistenza alla meticillina.

L'identificazione universale dei batteri che crescono in una coltura di sangue è attuabile nella diagnosi mediante l'impiego di una multiplex PCR. È necessario disporre di numerosi set di multiplex PCR perché i batteri coinvolti nelle infezioni del sangue sono numerosi e la scelta del microrganismo da ricercare dipende dalle specifiche condizioni cliniche del paziente. Quindi, i diversi quadri clinici richiedono differenti multiplex PCR affinché abbiano un buon rapporto costo/efficacia.

L'amplificazione batterica universale (broad-range PCR) seguita dall'analisi capillare della sequenza del DNA, o dalla recente tecnica del pirosequenziamento basato sull'emissione di luce, potrebbe fornire l'identificazione del batterio dalle 3 alle 5 ore dopo la coltura. Questo approccio è utile come test di conferma quando dall'emocoltura si isolano delle specie inaspettate o inusuali.

Attualmente l'amplificazione mediante multiplex PCR o mediante amplificazione ad ampio spettro seguita dall'analisi di sequenza dei microrganismi cresciuti in coltura non dà molti benefici clinici né di costo/efficacia rispetto alle tecniche convenzionali perché sono metodiche laboriose che richiedono molto tempo<sup>35</sup>.

La PCR può anche essere applicata per l'amplificazione del DNA batterico direttamente in un

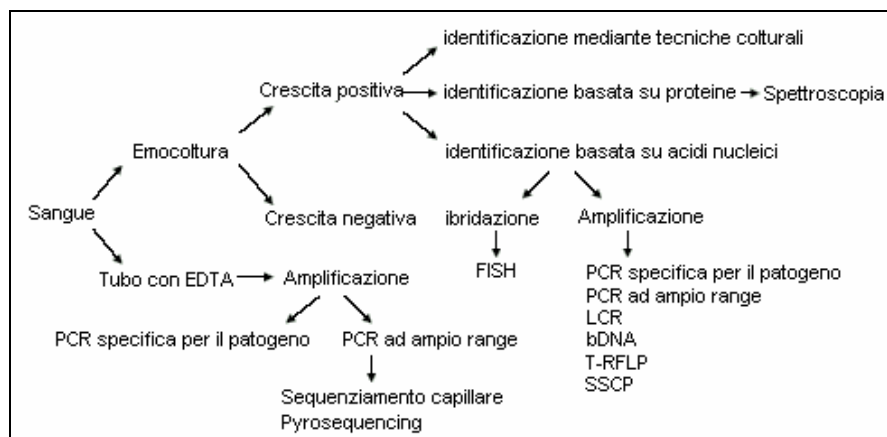
campione di sangue. Il principale vantaggio dell'amplificazione direttamente da sangue è quello di ottenere l'identificazione dei microrganismi in tempi molto rapidi ed è utile soprattutto quando si sospetta un'infezione severa, come quella sostenuta dai funghi *Candida* e *Aspergillus*<sup>51,52,53</sup>. L'analisi di infezioni direttamente su sangue mediante PCR ad ampio spettro (broad-range PCR) può essere applicata anche per la ricerca universale dei patogeni nel sangue sfruttando la possibilità di amplificare il gene per la subunità ribosomiale 16S o 23S dei batteri o 18S dei funghi.

L'interpretazione clinica dei risultati di una PCR ad ampio spettro eseguita direttamente su sangue è piuttosto difficile perché spesso presenta un segnale positivo non confermato dall'emocoltura. La maggiore sensibilità della PCR nel rivelare concentrazioni anche molto piccole di DNA batterico deve essere valutata secondo il contesto clinico del paziente, cioè si deve stimare la probabilità che il risultato sia corretto anche mediante il follow-up del paziente. Il risultato positivo della PCR può essere considerato valido se viene accertata la presenza di un focolaio d'infezione sostenuto dallo stesso patogeno o quando il risultato dell'emocoltura è il medesimo anche a distanza di giorni. La PCR ad ampio spettro identifica DNA microbico presente nel sangue, non distinguendo tra DNA di patogeni vivi e morti e nemmeno quello di microrganismi contaminanti. Se da un lato questa caratteristica aumenta la sensibilità della tecnica, dall'altro ha un importante peso sull'interpretazione clinica. Inoltre, un forte limite alle tecniche molecolari è l'impossibilità di prevedere la suscettibilità agli antibiotici.

Altre tecniche che richiedono un passaggio di amplificazione per la rivelazione dei batteri cresciuti in emocoltura sono: LCR, l'amplificazione isotermica mediata da trascrizione e il saggio del bDNA. Le prime due metodiche sono impiegate per la ricerca della carica virale in infezioni sostenute per esempio dal virus dell'epatite C e da HIV<sup>54-57</sup>. L'analisi del bDNA è ampiamente usata per la ricerca dei virus e la misurazione del titolo virale, ma è anche applicata per la rivelazione del gene che conferisce resistenza alla meticillina in *Staphylococcus aureus*.

Tra le tecniche molecolari per la diagnosi microbiologica, il recente sviluppo della PCR *real-time* quantitativa può sostituire vantaggiosamente tutte le analisi che utilizzano amplificazione del campione. Infatti, la PCR *real-time* consente di amplificare e di rivelare il segnale simultaneamente in un sistema chiuso, evitando anche il rischio di contaminazioni. Questa tecnica è molto più rapida delle tecniche convenzionali e si basa sulla misura del segnale di fluorescenza che si genera ad ogni ciclo di amplificazione. L'intensità del segnale è poi rapportata ad una curva di valori standard di fluorescenza generati dall'amplificazione di

determinate quantità di DNA. Maggiore è la quantità di DNA presente nel campione da analizzare, più precoce sarà il ciclo di amplificazione nel quale è rivelato il segnale di fluorescenza. La determinazione della carica microbica nel sangue permette di monitorare gli effetti della terapia antibiotica o di distinguere tra infezione e contaminazione<sup>58</sup>. Tuttavia, la quantità di DNA non è predittiva della durata dei sintomi e non diminuisce in funzione del trattamento antimicrobico. L' utilizzo di questa metodica nella diagnosi di sepsi rappresenta l'oggetto del nostro studio.



**Figura 3.** Tecniche di laboratorio per la rivelazione delle infezioni del sangue

## 1.6. Cenni di terapia

La terapia della sepsi si basa sull'impiego mirato di antibiotici che sono necessari, ma non sufficienti per il trattamento. L'approccio più comune consiste nell'iniziare subito una terapia antibiotica a largo spettro e mirare successivamente la terapia in base alla positività delle colture. La terapia antibiotica iniziale empirica deve includere uno o più farmaci attivi contro i possibili patogeni (batteri o funghi) e deve essere in grado di penetrare efficacemente i presunti focolai di sepsi. La scelta empirica degli antibiotici dipende dall'anamnesi del paziente (incluse eventuali intolleranze a farmaci), dalle co-morbidità, dalla sindrome clinica ed al tipo di resistenze possedute dai microrganismi presenti nella comunità, nell'ospedale od in altre strutture sanitarie.

Provvedimenti atti a ristabilire rapidamente la funzione cardiovascolare aumentano la sopravvivenza dei pazienti con sepsi: ripristino della volemia, mantenimento di un'adeguata perfusione d'organo vengono eseguiti sotto costante monitoraggio emodinamico<sup>59,60,61</sup>.

Circa il 50% dei pazienti con sepsi severa presenta un quadro di ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome); l'ipossia causata dal danno polmonare va prevenuta per ottimizzare l'ossigenazione tissutale preferibilmente con metodi di ventilazione non invasivi (maschera facciale), altrimenti nei pazienti con un'insufficienza respiratoria da moderata a severa è necessaria la ventilazione meccanica controllata con intubazione endotracheale.

Nei pazienti con sepsi il danno renale è di circa 23% nei casi di sepsi severa e del 51% nello shock settico. I pazienti con sepsi e danno renale acuto necessitano di un immediato ripristino delle funzioni per bilanciare i fluidi, rimuovere le tossine uremiche e controllare gli elettroliti. In pazienti emodinamicamente stabili sono da preferire le procedure di emofiltrazione continua alla dialisi, anche se una meta-analisi su 13 studi diversi non ha potuto dimostrare un netto vantaggio in termini di sopravvivenza della prima pratica rispetto la seconda <sup>62</sup>. Il dosaggio del glucosio ematico è un buon marker di danno renale e non solo riduce la mortalità, ma abbassa anche la percentuale del danno che richiede dialisi o emofiltrazione. È stato messo in evidenza che l'iperglicemia e la resistenza alla terapia insulinica sono caratteristiche comuni in pazienti settici. Una terapia con insulina può sostanzialmente ridurre la mortalità per sepsi in quei pazienti che manifestano disfunzioni di più organi e che presentano un focolaio certo di infezione probabilmente per la capacità di controllare le fasi iniziali del processo infettivo <sup>63,64</sup>.

L'uso dei corticosteroidi in corso di sepsi è stato largamente studiato vista le loro proprietà antinfiammatorie, tuttavia studi svolti su pazienti con sepsi, sepsi severa e shock tossico non ha dimostrato l'efficacia in alte dosi dei corticosteroidi.

Uno degli effetti della SIRS è la riduzione della proteina C attivata (APC), che ha un effetto antinfiammatorio. Pressoché tutti i pazienti con sepsi hanno ridotte concentrazioni di APC, con sbilanciamento verso la cascata procoagulativa, livelli più bassi sono correlati a outcomes peggiori. La APC ricombinante riduce la citochina proinfiammatoria IL-6 e la produzione di D-Dimeri, previene la formazione di trombina diminuendo, in questo modo, l'attivazione delle piastrine, il reclutamento dei neutrofili, la degranolazione delle mast-cells. La proteina C attivata ha proprietà antinfiammatorie tra cui l'inibizione della produzione di citochine da parte dei monociti e il blocco dei processi di adesione. Esiste tuttavia un dibattito sull'uso della APC dovuto agli effetti collaterali possibili quali il rischio elevato di sviluppare emorragie. Attualmente l'uso terapeutico della APC è consentito solo in pazienti con sepsi e grave insufficienza d'organo <sup>66</sup>.

Per il futuro si guarda con molto interesse al trattamento con neutralizzanti od agonisti delle citochine proinfiammatorie che permettano al clinico di modulare la risposta immunitaria del

paziente settico. Il tipo di risposta è determinata da vari fattori tra cui la virulenza del patogeno coinvolto, la carica batterica dell'inoculo iniziale, le condizioni del paziente, lo stato nutrizionale, l'età e il polimorfismo nei geni per le citochine e altre molecole effettrici della risposta immune e dei loro recettori.

La valutazione della concentrazione dei mediatori dell'infiammazione potrebbe essere utile nella valutazione dello stadio della sepsi e indirizzare da una parte alla somministrazione di molecole antinfiammatorie e dall'altra, nel paziente in uno stato ipoimmune, a strategie che ristabiliscano e sostengano la funzione del sistema immunitario <sup>67</sup> (ad esempio l'interferon- $\gamma$ ).

## 2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

La sepsi è stata definita secondo la Consensus Conference del 1994 come una reazione infiammatoria sistemica indotta da microrganismi presenti nel torrente circolatorio e/o dalle tossine rilasciate da un focus di infezione. La rapida identificazione dell'agente causale di sepsi è di importanza cruciale per l'instaurarsi di una terapia antibiotica specifica e per l'esito della malattia. In tutti i pazienti per cui viene posta una diagnosi di sepsi è necessario procedere con l'invio al laboratorio di emocolture.

L'emocoltura è tradizionalmente il gold standard per la diagnosi microbiologica di infezione del torrente circolatorio, tuttavia i sintomi clinici sono frequentemente presenti in assenza di crescita batterica. Quando non è possibile confermare il sospetto di sepsi con una diagnosi microbiologica, è necessario ricorrere ad una terapia antibiotica empirica a largo spettro che contribuisce all'instaurarsi di resistenze e all'aumento dei costi di trattamento. Altra importante criticità dell'emocoltura è il fattore tempo: l'esame richiede la crescita dei patogeni responsabili della sepsi ed è condizionato dai tempi di crescita dei microrganismi. Inoltre risulta particolarmente problematica l'interpretazione delle emocolture "contaminate" dalla comune flora cutanea nel momento della raccolta, come gli stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS).

La diagnosi di sepsi può risultare particolarmente importante nei pazienti oncoematologici che a causa del loro stato di immunodepressione sono più esposti alle infezioni nosocomiali e presentano un aumento delle infezioni fungine oltre che dell'incidenza delle infezioni catetere-correlate causate da CoNS. Ai fini prognostici diventa decisiva la precocità di un intervento terapeutico mirato. Lo sviluppo di nuove metodiche diagnostiche è pertanto indirizzata all'aumentare della sensibilità e della specificità dei metodi laboratorio ad uso del clinico, diminuire i tempi di risposta e ridurre l'effetto inibitorio degli antibiotici per l'isolamento dei batteri patogeni.

In questo studio, si è voluto valutare una PCR multiplex Real Time (LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup>) della Roche Diagnostics per l'identificazione diretta del DNA dei principali microrganismi causa di sepsi (batteri e funghi). In questo lavoro sono stati analizzati campioni di sangue periferico di pazienti neutropenici con sospetto di sepsi, provenienti dai reparti di Ematologia e di Onco-ematologia Pediatrica del Policlinico S.Orsola-Malpighi. I risultati del SeptiFast sono stati paragonati con i risultati delle emocolture prelevate contemporaneamente



al campione sottoposto ad analisi con il *SeptiFast* ed è stato valutata l'applicabilità del sistema *SeptiFast* nella diagnosi di sepsi in termini di percentuale di risultati positivi e di concordanza con la tradizionale emocoltura.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. I pazienti

I pazienti inclusi nello studio sono pazienti oncoematologici ricoverati presso l'Istituto di Ematologia Seragnoli o presso il Modulo Operativo di Oncoematologia Pediatrica e Terapia Cellulare del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna. A causa della patologia di base e/o delle chemoterapie utilizzate, tutti i pazienti inclusi nello studio presentavano uno stato di immunosoppressione e risultavano neutropenici.

Nei cinque mesi di studio, sono stati raccolti 86 campioni di sangue per emocoltura da sangue periferico (SP); in concomitanza con tale prelievo è stato inviato un campione di 3 ml di sangue per valutazione mediante PCR. I campioni sono stati processati nell'Unità Operativa di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, del Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna.

I campioni per emocoltura e PCR sono stati raccolti da 42 pazienti adulti (28 maschi e 14 femmine) con un'età media di 48 anni, e 8 bambini (4 maschi e 4 femmine) con un'età media di 10.2 anni. I pazienti erano affetti da varie neoplasie: leucemia mieloide acuta (48%), leucemia linfoblastica acuta (22%), linfoma (18%), mieloma multiplo (8%), tumore solido (8%), disordini mieloproliferativi cronici (5%). Diciannove pazienti presentavano uno stadio precoce della malattia, mentre 31 erano ad uno stadio avanzato. Dieci pazienti erano in attesa di ricevere un trapianto autologo di midollo (auto HSCT) (20%), dieci pazienti avevano ricevuto un trapianto allo genico HSCT (allo-HSCT) (20%), otto pazienti ricevevano una terapia di supporto (16%), mentre 24 erano in chemioterapia (48%). Al momento dell'ingresso nello studio, 42 pazienti (84%) presentavano una neutropenia severa ( $ANC < 500/mm^3$ ), 11 pazienti (22%) avevano avuto una possibile o probabile infezione fungina invasiva (IFI) ed un paziente aveva avuto una IFI certa (Tabella 5).

**Tabella 5** Caratteristiche cliniche dei pazienti.

<b>No. dei pazienti</b>	50
<b>Sesso M/F</b>	32/18
<b>Età media, anni</b>	
- Adulti	48
- Bambini	10
<b>Diagnosi (%):</b>	
- AML <sup>a</sup>	20 (48)
- ALL <sup>b</sup>	11 (22)
- Linfoma	9 (18)
- MM <sup>c</sup>	4 (8)
- CMS <sup>d</sup>	2 (4)
- Tumori solidi <sup>e</sup>	4 (8)
<b>Stadio della malattia (%):</b>	
- precoce	19 (38)
- tardivo	31 (62)
<b>Terapia (%):</b>	
- auto-SCT	10 (20)
- allo-SCT	10 (20)
- terapia di supporto	8 (16)
- chemioterapia	24 (48)
<b>Neutropenia severa (%)</b>	42/50 (84)
<b>Precedente IFI<sup>f</sup> (%):</b>	
- possibile/probabile	11/50 (22)
- certa	1/50 (2)

<sup>a</sup>Acute Myeloid Leukemia; <sup>b</sup>Acute Lymphoblastic Leukemia; <sup>c</sup>Multile Myeloma; <sup>d</sup>Chronic Myeloproliferative Disorder; <sup>e</sup>Ewing's Sarcomas and Neuroblastoma; <sup>f</sup>Invasive Fungal Infection

### 3.2. Emocolture

L'emocolture sono state eseguite mediante il sistema BacT/Alert 3D (BioMerieux, Italia) secondo le indicazioni del costruttore. Brevemente, 10 ml o 5 ml di sangue venoso periferico è stato prelevato da adulti e bambini rispettivamente, e immediatamente inoculato nelle bottiglie da coltura (aerobica ed anaerobica). I sistemi commerciali automatici per emocoltura forniscono le condizioni ottimali per la crescita dei microrganismi: i flaconi contengono terreni liquidi e diverse miscele di gas che rendono disponibili i componenti nutritivi e creano le condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi richieste per soddisfare le esigenze metaboliche dei vari tipi di microrganismi, un'agitazione costante a 35°C, ed un monitoraggio continuo della crescita batterica (ogni 10 minuti). In tutti gli strumenti oggi disponibili in commercio, il rilevamento della crescita batterica all'interno del flacone si basa sulla misurazione della CO<sub>2</sub>

prodotta dal metabolismo batterico nel corso dell'analisi. Nel sistema chiuso del flacone da emocoltura un aumento esponenziale di CO<sub>2</sub> indica l'esistenza di attività metabolica e quindi la crescita di microrganismi. Il rilevamento delle concentrazioni di CO<sub>2</sub> può sfruttare diversi principi, come l'utilizzazione di marcatori radioattivi (<sup>14</sup>C) o marcatori fluorescenti, la spettrofotometria, o ancora la colorimetria.

Il sistema automatico BacT/Alert 3D utilizzato nell'Unità Operativa di Microbiologia del nostro Policlinico, (Biomérieux, Italia S.p.A., Roma, Italia) è dotato di un sensore capace di rivelare la crescita microbica mediante il principio della colorimetria. Le variazioni nella concentrazione di CO<sub>2</sub> all'interno del flacone determinano il viraggio del sistema di rivelazione posto alla base della bottiglia.

Le bottiglie inoculate sono state inserite nel sistema di coltura automatizzata e incubate per 6 giorni a 35°C o fino al momento in cui lo strumento segnalava la positività della bottiglia mediante lettura colorimetrica della CO<sub>2</sub>. Per l'identificazione degli isolati da emocolture positive si è proceduto con la semina su appropriati terreni agarizzati (Biolife Italiana s.r.l. Italia) secondo le comuni modalità del laboratorio. L'identificazione delle colonie batteriche pure è stata ottenuta mediante tests convenzionali di laboratorio (ad esempio, Enterotube, BD Diagnostics, Italia; Vitek e gallerie API, bioMérieux).

### **3.3. PCR real-time**

La diagnosi microbiologica classica di sepsi comprende la microscopia e le colture microbiche. Gli svantaggi di queste tecniche sono numerosi e comprendono la scarsa sensibilità, la difficile ricerca di microrganismi a crescita lenta, la complessità di interpretazione, l'applicazione limitata in casi di terapie antimicrobiche in corso e la possibilità di contaminazione<sup>68</sup>.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica capace di amplificare il DNA o, se preceduta dalla retrotrascrizione (RT), è in grado di amplificare molecole di RNA. Il processo di amplificazione è caratterizzato da tre momenti che prevedono: (1) la separazione dei doppi filamenti del DNA ad una temperatura di oltre 90°C (denaturazione), (2) l'appaiamento dei primers intorno ai 50-60°C (annealing) e (3) l'allungamento della sequenza alla temperatura di 70-78°C (estensione).

Nonostante la PCR rivesta un ruolo importante nella diagnosi di malattie infettive, anch'essa mostra varie limitazioni legate alla necessità di conoscere l'intero genoma microbico per disegnare primers specifici e alla possibilità di introdurre delle contaminazioni che danno luogo a falsi positivi. La PCR può, talvolta, essere troppo sensibile e quindi rivelare la

presenza di microrganismi la cui concentrazione non è preoccupante a livello patologico. Al termine del processo di PCR la rivelazione degli amplificati richiede procedure manuali alquanto laboriose che vanno dalla corsa elettroforetica in gel di agarosio, al Southern Blot, a sistemi ELISA.

La diagnosi microbiologica mediante PCR si basa sull'amplificazione di porzioni del DNA comuni a tutti i batteri, come la regione codificante per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale<sup>69,70</sup>. Utilizzando varie coppie di primers si può allestire una Multiplex-PCR ed avere la simultanea amplificazione di più loci genici per differenziare gli agenti eziologici responsabili della sepsi.

Recentemente la PCR è stata modificata per avere risultati in tempo reale mediante il monitoraggio continuo della quantità di amplificato ottenuto. Ciò è reso possibile dalla marcatura dei primers, delle sonde oligonucleotidiche o degli ampliconi (frammenti di DNA amplificato) con molecole fluorescenti. I marcatori fluorescenti fungono da indicatori diretti del numero di ampliconi sintetizzati durante l'amplificazione PCR. Il segnale fluorescente è proporzionale alla quantità di amplicone presente durante ogni ciclo e aumenta all'aumentare della quantità dello specifico amplicone. Un miglioramento significativo introdotto dalla *real-time* PCR consiste nella rapidità con la quale si producono risultati che è legata alla riduzione dei tempi per ogni ciclo e alla mancanza di procedure di rivelazione post-PCR.

Le sonde oligonucleotidiche fluorescenti maggiormente usate si basano sul processo spettroscopico del trasferimento di energia di risonanza in fluorescenza (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) tra due fluorofori adiacenti. Le sonde sono marcate rispettivamente con una molecola reporter (donatore) e una molecola quencher (accettore)<sup>71</sup>, scelte in modo che lo spettro di emissione del donatore si sovrapponga allo spettro di assorbimento dell'accettore. Quando il reporter viene eccitato dall'assorbimento di un fotone di una specifica lunghezza d'onda si ha il passaggio di alcuni elettroni della molecola reporter dallo stato fondamentale ad un livello energetico superiore. Il reporter eccitato per tornare allo stato fondamentale può rilasciare l'energia catturata mediante emissione di fluorescenza oppure mediante il trasferimento dell'energia ad un quencher molto vicino (10-100Å). In quest'ultimo caso alcuni elettroni nella molecola del quencher sono elevati ad un livello superiore. Questi possono ritornare allo stato fondamentale rilasciando energia sotto forma di vibrazione, calore, o bassa fluorescenza. Il processo globale è definito quenching in fluorescenza in quanto il segnale fluorescente emesso dal reporter eccitato è assorbito dal quencher e il risultato finale è l'assenza di segnale fluorescente osservato a carico del reporter. Il processo di *real-time* PCR avviene in un sistema chiuso, perciò il segnale fluorescente

viene misurato direttamente nel capillare di reazione e non c'è possibilità di introdurre delle contaminazioni. In questo modo la PCR *real-time* permette di risparmiare tempo ed evita contaminazioni che si possono presentare nella manipolazione degli amplificati.

La rivelazione degli amplificati è la caratteristica che discrimina la PCR *real-time* dalla PCR convenzionale; esiste una varietà di molecole chimiche che possono essere classificate come specifiche e aspecifiche per la sequenza degli amplificati e che hanno tutte la stessa sensibilità.

L'uso di un paio di sonde oligonucleotidiche fluorogeniche adiacenti è detto "HybProbes" ed è il principio sul quale si basa il LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Questo strumento ha una duplice funzione: è un termociclatore con controllo rapido della temperatura e un fluorimetro capillare<sup>72,73</sup>.

Il sistema è provvisto di una piccola sonda a monte marcata al 3' con un fluoroforo donatore (isotiocianato di fluoresceina, FITC) che forma un ibrido con la sonda a valle marcata al 5' con fluorofori accettori LightCycler Red 640 o Red 705 (figura 4).

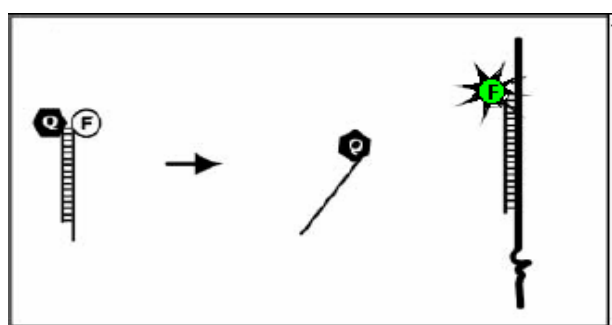


Figura 4. Sistema HybProbes

Per misurare la quantità di DNA presente in un campione è necessario disporre di *Standards* e di *Internal Controls* (ICs). I primi sono impiegati per il calcolo della quantità di DNA presente nel campione di un paziente, mentre gli ICs vengono utilizzati per verificare la presenza di falsi-negativi e per esaminare la capacità di amplificare da una preparazione di acidi nucleici. La scelta, la qualità e la determinazione della concentrazione dei controlli determina l'attendibilità dell'analisi mediante PCR<sup>74,75</sup>. Generalmente lo *Standard* è una molecola di controllo esogeno che deriva dalla clonazione dell'amplicone, da una porzione del genoma dell'organismo bersaglio o, più semplicemente dallo stesso amplicone purificato. Una scala di diluizioni di controllo esterno, ciascuna in un capillare, viene amplificata e con i dati ottenuti è possibile costruire la curva standard. Il dato ottenuto dall'amplificazione del campione durante la stessa reazione, viene rapportato alla curva standard ed è così possibile conoscere la quantità di DNA presente nel campione del paziente. Gli *Internal Controls* sono

degli importanti controlli di qualità, specialmente quando si effettuano quantificazioni competitive. Quando un ICs viene aggiunto prima della purificazione o dell'amplificazione è detto IC esogeno e viene amplificato nella stessa reazione, mentre il controllo endogeno è presente naturalmente nel campione da esaminare.

I dati di fluorescenza generati dalla PCR *real-time* vengono rivelati durante la fase lineare della reazione di amplificazione, quando le condizioni sono ottimali e la fluorescenza si accumula in proporzione alla quantità di amplificato <sup>75</sup>. Le amplificazioni precoci non possono essere rilevate perché l'emissione è mascherata dal rumore di fondo; dopo un certo numero di cicli si ha una sufficiente quantità di amplificato che genera fluorescenza e questo dato è un indice della riuscita amplificazione <sup>76</sup>. Il numero di cicli in cui si osserva una progressione della reazione, quindi un aumento lineare dell'intensità della fluorescenza, è detto ciclo limite ( $C_T$ ) o crossing point ( $C_P$ ).  $C_T$  e  $C_P$  sono proporzionali al numero di copie di amplificati nel campione <sup>77</sup> e rappresentano uguali quantità di ampliconi presenti in ciascun capillare. L'accuratezza del  $C_T$  o  $C_P$  dipende dalla natura e dalla concentrazione dei componenti che emettono la fluorescenza, dalla quantità di DNA inizialmente presente, dalla sensibilità e dalla capacità del sistema di discriminare tra fluorescenza e rumore di fondo.

La PCR *real-time* quantitativa è un sistema flessibile che permette di quantificare un ampio range di concentrazioni di DNA, evitando i passaggi di diluizione dell'amplicone prima dell'analisi <sup>78,79</sup>. La sua flessibilità è dimostrata anche dalla capacità di rivelare un target in presenza dell'eccesso di un altro target <sup>80</sup>. Inoltre è stato dimostrato che la PCR *real-time* ha una sensibilità comparabile a quella del Southern blot e maggiore rispetto alle colture microbiche, rispetto alla PCR convenzionale e anche rispetto alla nested PCR <sup>79</sup>.

In una singola reazione è possibile anche amplificare diversi tipi di DNA mediante la disponibilità di più coppie di primers. In questo modo si allestisce una Multiplex *real-time* PCR che identifica i diversi ampliconi prodotti da più coppie di primers mediante il segnale di varie sonde oligonucleotidiche. La PCR *real-time* è estremamente utile in campo microbiologico per studiare gli agenti responsabili delle malattie infettive <sup>81</sup>. L'impatto maggiore si è avuto per la rivelazione della virulenza correlata ai diversi genotipi virali nella stessa reazione <sup>82</sup>. Numerosi studi hanno evidenziato come la PCR *real-time* possa essere un utile strumento per analizzare l'estensione del processo infettivo, l'interazione ospite-virus e il cambiamento della carica virale in seguito alla terapia antivirale <sup>83,84</sup>. I benefici di una diagnosi microbiologica rapida per il paziente si evidenziano soprattutto quando la PCR *real-time* si applica per la rivelazione dei batteri perché il risultato può essere seguito dalla somministrazione tempestiva della terapia antibiotica, evitando i problemi della tossicità della

terapia empirica, della lunga degenza ospedaliera e dell'insorgenza di ceppi resistenti. La PCR *real-time* ha dato, inoltre, un contributo significativo per la diagnosi di malattie infettive causate dai funghi *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* e per la ricerca di spore fungine potenzialmente pericolose<sup>81</sup>.

### 3.3.1. LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup>

Il LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> è un test di amplificazione *in vitro* di acidi nucleici, sviluppato da Roche Diagnostics, per la rivelazione e l'identificazione di DNA dei batteri e miceti in campioni di sangue umano intero in K-EDTA, utilizzando il sistema LightCycler® 2.0. Il test è usato in combinazione con le evidenze cliniche, con altri test di laboratorio consolidati e/o altri markers di laboratorio come supporto nella gestione di pazienti con sospetta sepsi ed altre infezioni di natura batterica e micotica del torrente circolatorio.

Il LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> è in grado di identificare i microrganismi che causano circa il 90% di tutte le infezioni del flusso sanguigno. Mentre i metodi microbiologici riconoscono i microrganismi vitali, questo test identifica quelli vitali e non vitali e il DNA microbico libero. Le specie bersaglio sono indicate nella tabella 6.

**Tabella 6.** Elenco delle specie identificate dal LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup>

Gram-negativi	Gram-positivi	Funghi
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/ozytoca)</i>	CoNS <sup>1</sup>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

<sup>1</sup> Stafilococchi negativi alla coagulasi

Si tratta di specie che sono risultate positive nel corso di studi interni e/o analisi cliniche eseguiti con il LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> ed alcune tra queste, a causa del deficit di identificazione dell'emocoltura, spesso vengono trattate in maniera inefficace: *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Candida spp.*, *Klebsiella spp.* Inoltre, nel caso di alcune specie bersaglio è fondamentale che l'identificazione avvenga presto in quanto le infezioni causate sono particolarmente difficili da curare: *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. Inoltre, alla presenza di infezione polimicrobica, è possibile che in un singolo campione siano individuate



le diverse specie causanti l'infezione, mentre spesso l'emocoltura è in grado di identificare solo il microrganismo a crescita più rapida. Per queste ragioni la PCR *real-time* è uno strumento in più per giungere ad una diagnosi clinica precoce.

- Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni.

Il LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> è destinato esclusivamente all'uso con campioni di sangue con K-EDTA. Il sangue deve essere raccolto in provette sterili usando l'EDTA come anticoagulante e i campioni vanno maneggiati come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Il trasporto del sangue intero deve avvenire nel rispetto delle normative vigenti che regolano il trasporto degli agenti eziologici, perciò il trasporto e la conservazione si effettuano tra -15 e -25°C o tra 2 e 8°C per un massimo di tre giorni, oppure tra 15 e 25°C per non più di quattro ore. I campioni devono essere trattati per estrarre e purificare il DNA e gli eluati possono essere conservati tra -15 e -25°C o tra 2 e 8°C per un massimo di tre giorni, oppure tra 15 e 25°C per non più di quattro ore. Il volume iniziale di sangue intero K-EDTA è di 3 ml; il campione di sangue deve essere agitato sul roller mixer 30 minuti prima di essere processato.

- Principi della procedura

Il LightCycler® SeptiFast Test M<sup>GRADE</sup> si basa su tre procedure fondamentali:

– Preparazione dei campioni mediante lisi meccanica e purificazione del DNA: ogni seduta di lavoro permette di esaminare 7 campioni con un totale di 21 PCR (7 per Gram positivi, Gram negativi, miceti, più 6 controlli). La lisi meccanica dei campioni viene eseguita utilizzando il SeptiFast Lys Kit M<sup>GRADE</sup> e lo strumento MagNa Lyser. Il DNA di funghi e batteri ottenuto dai campioni lisati viene isolato e purificato utilizzando il test SeptiFast Prep Kit M<sup>GRADE</sup> che prevede l'incubazione a temperatura elevata di questi con una proteasi e un tampone di lisi caotropico, che rilascia gli acidi nucleici e protegge il DNA rilasciato dalle DNAsi nel sangue. Un volume definito di Controllo Interno (IC) viene introdotto in ciascun campione insieme al reagente di lisi. Il controllo interno è composto di molecole di DNA sintetiche a doppio filamento con siti di legame per il primer identici a quelli delle sequenze bersaglio e contiene univoche regioni di legame alla sonda HibProbe che consentono la differenziazione del controllo interno amplificato dall'amplicone specifico del bersaglio. Dopo l'aggiunta di un tampone di binding, la miscela viene trasferita in una spin column con un filtro in fibra di vetro, dove si lega il DNA bersaglio del genoma umano e dei batteri/funghi. Le sostanze non legate, come ad esempio sali, proteine ed altri frammenti cellulari, vengono eliminate con due fasi di lavaggio al termine delle quali gli acidi nucleici assorbiti vengono eluiti a temperatura elevata. Gli eluati possono essere sottoposti ad analisi

PCR.

– Amplificazione PCR *real-time* del DNA bersaglio in tre reazioni parallele e rivelazione con sonde di ibridazione specifiche: la regione bersaglio da amplificare delle specie batteriche e fungine è quella ITS (Internal Transcribed Spacer) che offre una maggiore sensibilità analitica rispetto ai geni a singola copia, in quanto nei genomi di batteri e funghi sono presenti svariati operoni. Inoltre, la regione ITS è più specie-specifica rispetto agli RNA ribosomiali e quindi più idonea alla differenziazione delle specie. Tale regione è situata tra le regioni 16S e 23S del DNA ribosomiale di tutti i batteri Gram-positivi e Gram-negativi e tra le sequenze 18S e 5,8S del DNA ribosomiale di tutti i funghi. Prima dell'amplificazione il rischio di contaminazione viene ridotto utilizzando l'enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) che riconosce e catalizza la reazione di distruzione dei filamenti di DNA contenenti deossiridina, ma non del DNA contenente deossitimidina. I campioni trattati vengono aggiunti alla miscela di amplificazione contenente Taq polimerasi di tipo "hot-start" nei capillari LightCycler® (100 µl) M<sup>GRADE</sup> in cui ha luogo l'amplificazione PCR. Ciascun bersaglio delle specie indicate viene amplificato con primer generici o specifici. Una miscela di bersagli viene amplificata simultaneamente nei capillari contenenti reagenti di controllo (RC). La rivelazione dell'amplicone avviene mediante fluorescenza, per mezzo di una coppia specifica di sonde HibProbe. Durante la fase di "annealing" del ciclo di amplificazione, le sonde HibProbe marcate con la fluorescenza ibridizzano su una sequenza interna del frammento amplificato. La fluorescenza emessa viene misurata dallo strumento LightCycler® 2.0 in uno dei quattro distinti canali di rivelazione. Al termine dell'amplificazione viene eseguita un'analisi della curva di melting (grafico della percentuale di DNA duplex in funzione della temperatura) e le sonde, in base alle loro T<sub>M</sub> (temperatura alla quale il 50% della molecola di DNA è presente sottoforma di doppia elica) rilevate in un canale, permettono di differenziare le varie specie.

– Identificazione automatica delle specie e dei controlli: le temperature di melting dei campioni e dei controlli vengono analizzate in un software di identificazione dedicato (SeptiFast Identification Software) e al termine viene generato un report. Le basse concentrazioni di CoNS (Stafilococchi coagulasi negativi) e di Streptococchi che riflettono i valori delle contaminazioni del flusso di lavoro non vengono refertate.

- Flusso di lavoro e contenimento delle contaminazioni.

Il DNA dei microrganismi target del test LightCycler® SeptiFast M<sup>GRADE</sup> è normalmente presente nell'ambiente quindi per evitare false positività è necessario che il flusso di lavoro sia completamente privo di potenziali contaminazioni da DNA ambientale. Anche l'operatore

potrebbe essere fonte di contaminazione poiché la cute e le vie respiratorie superiori sono generalmente popolate da diversi microrganismi ubiquitari che sono anche target del test *SeptiFast* M<sup>GRADE</sup>, come ad esempio gli Streptococchi e gli Stafilococchi coagulasi negativi. Sin dall'inizio dello studio si è dedicata particolare attenzione per evitare questo tipo di contaminazioni organizzando un flusso di lavoro DNA-free, individuando locali idonei e dedicati per ciascuna fase della procedura. Sono stati indossati guanti privi di talco ed un camice monouso per tutto il flusso di lavoro in modo da evitare l'esposizione della cute. Le workstation (cappa + accessori specifici + superficie di lavoro) sono state decontaminate con la lampada UV e reagente decontaminante DNA –ZAP dopo ogni procedura di preparazione dei campioni. I prodotti M<sup>GRADE</sup> sono appositamente progettati per la rivelazione ad alta sensibilità di acidi nucleici di batteri e miceti. Le procedure di produzione sono studiate in modo da eliminare qualunque forma di contaminazione da DNA ambientale che potrebbe interferire con questi test.

- Rilevamento del picco e identificazione automatica delle specie.

Il picco può essere definito come il valore massimo al di sopra della baseline. I valori della baseline sono predefiniti e non devono essere modificati.

La Macro LightCycler® *SeptiFast* Kit genera 12 moduli di analisi T<sub>M</sub> Calling (3 saggi, 4 canali) e due moduli di analisi Absolute Quantification. Selezionando un singolo modulo d'analisi sono visualizzati solo i campioni inclusi in quel tipo di test, ad esempio per i Gram-positivi sono visualizzati solo i capillari che contengono la rispettiva Master Mix (figura 5).

Le barre T<sub>M</sub> sono visualizzate in posizione di default e devono essere spostate manualmente con il mouse dall'operatore in corrispondenza del massimo di ciascun picco. I punti di massimo dei picchi devono essere collocati entro gli intervalli di temperatura riportati nella tabella.

	CH 610		CH 640		CH 670		CH 705	
	T <sub>M</sub> bassa [°C]	T <sub>M</sub> alta [°C]	T <sub>M</sub> bassa [°C]	T <sub>M</sub> alta [°C]	T <sub>M</sub> bassa [°C]	T <sub>M</sub> alta [°C]	T <sub>M</sub> bassa [°C]	T <sub>M</sub> alta [°C]
<b>G+</b>	48	53	49	64	49	59	45	65
<b>G-</b>	52	66	55	69	48	65	57	62
<b>F</b>	56	61	44	58	49	62	51	62

L'analisi finale dei risultati del test è eseguita dal *SeptiFast* Identification Sistem (SIS) che fornisce informazioni riguardo campioni, test o sedute invalidate; riguardo campioni, test o sedute valide con tutti i dati relativi ai picchi ed ai corrispondenti analiti ed informazioni circa campioni validati risultati negativi per tutti gli analiti.

### 3.4. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software R (R Development Core Team (2006). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Il significato statistico del tempo necessario perché venga rilevata una positività mediante emocoltura e PCR real-time è stato ottenuto mediante il test t-Student. La concordanza tra le due metodiche è stata stabilita mediante un metodo di correlazione. A causa del carattere non parametrico dei dati sperimentali, è stata usata una versione non parametrica del test di Pearson per l'associazione tra coppie di campioni chiamata Kendall's *tau*.

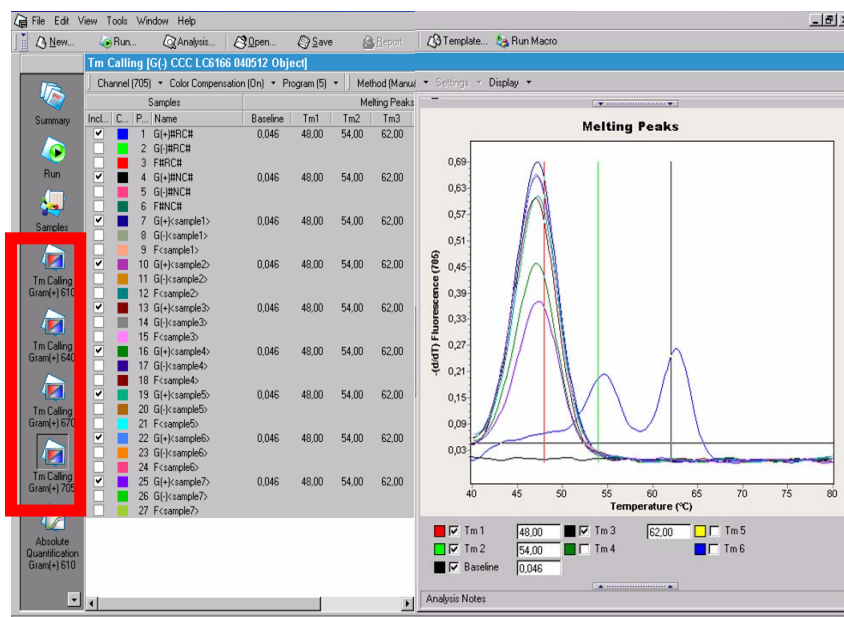


Figura 5. Visualizzazione dei campioni Gram-positivi nel modulo d'analisi a 705 nm

## 4. RISULTATI

Sono stati processati mediante emocoltura e PCR real-time (SeptiFast) **85** campioni di sangue periferico ottenuto da **50** pazienti oncoematologici con sospetto di sepsi dovuta a batteri o funghi, per un totale di 65 episodi febbrili. Per ogni paziente sono state raccolte informazioni anamnestico-cliniche e risultati di altri dati microbiologici e di laboratorio, utili per le valutazioni conclusive da parte del microbiologo del clinico referente.

L'emocoltura ha individuato 22 campioni positivi, corrispondenti a 20 episodi febbrili. I patogeni più spesso riscontrati appartengono al gruppo dei batteri Gram positivi; i più frequenti sono gli Stafilococchi Coagulasi Negativi (CoNS): *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* *Staphylococcus aureus*. In 18 di questi 20 episodi, i batteri isolati dalla coltura sono CoNS e *Staphylococcus aureus*. Solamente in due casi, l'emocoltura ha identificato batteri che raramente sono responsabili di infezioni batteriche sistemiche, quali: *Streptococcus pyogenes* e *Acinetobacter* spp. (tabella 7).

Di questi 22 campioni positivi con l'emocoltura, 14 (63.3%) sono risultati positivi anche con la PCR real-time, e i batteri identificati sia dall'emocoltura che dal SeptiFast sono stati CoNS (11 campioni, corrispondenti a 9 episodi febbrili) e *S. aureus* (3 campioni, corrispondenti a 3 episodi febbrili), (tabella 7). In questi 14 casi, è stato osservato che la PCR real-time poteva identificare il microrganismo responsabile dell'infezione in modo più precoce dell'emocoltura ( $p << 0.01$ ) (tabella 8).

Per 56 campioni, corrispondenti a 40 episodi febbrili, i due metodi hanno dato entrambi un risultato negativo e l'assenza dei patogeni nel sangue è stata segnalata in modo significativamente più rapido dalla PCR real-time che dall'emocoltura ( $p << 0.01$ ; tabella 8).

Per otto dei 22 campioni positivi con l'emocoltura (36.4%) la PCR real-time ha dato un risultato negativo.

Per tre di questi campioni il risultato positivo dell'emocoltura era dovuto alla presenza di CoNS che invece il software del SeptiFast ha valutato come contaminanti. Inoltre questi pazienti erano sottoposti a trattamento empirico (secondo le Linee Guida<sup>59</sup> per il trattamento di febbre di origine sconosciuta) con farmaci che non avevano come bersaglio stafilococchi coagulasi-negativi e che hanno portato a risoluzione gli episodi febbrili in 2-3 giorni (pazienti 13, 14, 15, tabella 9).

In due casi l'emocoltura ha identificato batteri che sono indicati raramente come causa di infezione sistemica, mentre il SeptiFast, in questi casi, ha solamente segnalato la presenza di batteri contaminanti (pazienti 16 e 17, tabella 9). A causa della mancanza di veri sintomi di

infezione e dei risultati negativi del *SeptiFast*, questi due pazienti sono stati trattati empiricamente con la risoluzione dell'episodio febbrile in 48 e 24 ore.

Nei tre rimanenti casi discordanti l'emocoltura ha segnalato una positività per cons, mentre il *SeptiFast* ha dato un risultato negativo.

In uno di questi casi (paziente 18, tabella 9) uno *S. aureus* è stato isolato da due campioni di sangue prelevati dal catetere venoso centrale e il paziente è stato trattato con teicoplanina. La remissione dalla febbre si è osservata in 36 ore. Dal momento che la teicoplanina è un antibiotico efficace sia nel trattamento dello *S. aureus* che dei CoNS, non ci è stato possibile determinare la vera eziologia dell'episodio febbrile e non possiamo escludere che l'emocoltura dal sangue periferico fosse realmente contaminata.

Nel secondo caso di discordanza tra PCR ed emocoltura (paziente 19, tabella 9) è stato necessario somministrare una terapia con piperacillina/tazobactam più teicoplanina a causa delle gravi condizioni in cui versava il paziente, questo trattamento ha condotto a risoluzione della febbre in 3 giorni. Conseguentemente, questo caso può essere valutato come un falso negativo del *SeptiFast*.

Nel terzo ed ultimo caso, (paziente 20, tabella 9) una radiografia polmonare eseguita nello stesso giorno dell'emocoltura era suggestiva per un'infezione fungina. La presenza di un CoNS indicata dall'emocoltura è stata pertanto valutata come una contaminazione e immediatamente è stata instaurata una terapia con piperacillina/tazobactam e itraconazolo. La risoluzione della febbre si è avuta in 72 ore. Dal momento che il paziente non ha ricevuto nessuna terapia specifica per CoNS, si è ipotizzato che la coltura positiva fosse conseguenza di una contaminazione che non è stata rilevata dalla PCR.

In sette degli 85 campioni di sangue esaminati il *SeptiFast* ha dato un risultato positivo, mentre l'emocoltura non ha evidenziato la crescita di nessun microrganismo (tabella 7).

In tre campioni, corrispondenti a tre episodi febbrili, sono stati identificati dei batteri Gram-negativi e nessun altro sito di infezione è stato individuato mediante diagnostica per immagini e microbiologica (pazienti 21, 22, 23, tabella 9). Dal momento che il risultato della PCR real-time è stato disponibile in 24-48 ore, questi pazienti sono stati trattati immediatamente con la terapia antibiotica specifica e la risoluzione dell'episodio febbrile si è ottenuta dopo un tempo medio di 3.5 giorni. L'esito di questi episodi, suggerisce che il *SeptiFast* è più capace nell'identificazione di infezioni sostenute da Gram-negativi dell'emocoltura.

Negli altri campioni in cui la PCR real-time ha dato un risultato positivo senza alcun riscontro di crescita batterica nell'emocoltura, è stato identificato uno *S. aureus* in tre campioni e un CoNS in un campione. Questi campioni erano stati prelevati durante il follow-up di tre

pazienti precedentemente positivi per *S. aureus* e CoNS sia con la PCR che con l'emocoltura. Questo risultato può essere interpretato facilmente dal momento che il SeptiFast è in grado di rilevare la presenza del DNA batterico è quindi di amplificare la sequenza target per tempi più lunghi rispetto l'emocoltura che invece identifica solo batteri in grado di replicarsi attivamente.

L'analisi statistica dei risultati ottenuti per gli 85 campioni rivela i due metodi analizzati in questo studio hanno una capacità differente di identificare i batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Kendall-tau=0.4817445,  $p < 0.01$ ). Quando l'analisi è stata condotta dopo aver raggruppato i campioni di sangue in episodi febbrili, i risultati hanno mostrato che entrambe le metodiche mantengono un grado significativamente differente di performance diagnostica. (Kendall-tau=0.445702,  $p < 0.001$ ). Questo indica che la PCR real-time e l'emocoltura forniscono risultati differenti quando applicati agli stessi campioni (campioni di sangue ed episodi febbrili), in altri termini le due metodiche non sono correlate (basso Kendall-tau con alta significatività) e conseguentemente non sono intercambiabili per la diagnosi microbiologica di sepsi.

**Tabella 7.** Identificazione comparativa dei batteri mediante emocoltura e SeptiFast (episodi febbrili/campioni di sangue).

		Emocolture						
		negativi	Positivi					Totale positivi
			CoNS <sup>a</sup>	<i>S.aureus</i> <sup>b</sup>	<i>S.pyogenes</i> <sup>c</sup>	<i>Acinetobacter</i> spp.		
PCR	negativi	<b>40/56</b>	6/6*	0	1/1**	1/1***	<b>8/8</b>	
	positivi	CoNS	1/1	9/11	0	0	0	9/11
		<i>S.aureus</i>	1/3	0	3/3	0	0	3/3
		<i>E. coli</i>	1/1	0	0	0	0	0
		<i>S. maltophilia</i>	1/1	0	0	0	0	0
		<i>A.baumannii</i>	1/1	0	0	0	0	0
		<b>Totale positivi</b>	<b>5/7</b>	9/11	3/3	0	0	<b>12/14</b>

<sup>a</sup> Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>b</sup> *Staphylococcus aureus*

<sup>c</sup> *Streptococcus pyogenes*

\*in 3 su 6 casi è stata indicata dal SeptiFast la presenza di contaminazione da CoNS

\*\*SeptiFast indicava la presenza di contaminazione da CoNS

\*\*\*SeptiFast indicava la presenza di contaminazione da streptococchi spp.



**Tabella 8.** Media del tempo di indentificazione dei casi concordanti positivi e negativi mediante emocoltura e PCR real time.

	No.	Tempo medio di indentificazione (h)±SEM		p-value
		Emocolture	Real-time PCR	
		<b>Concordanza positiva</b>		
CoNS <sup>a</sup>	9	88.0±8.5	30.7±7.9	<0.01
<i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	3	64.0±4.0	26.0±6.1	<0.05
<b>Tutti</b>	12	82.0±8.1	29.5±7.3	<<0.01
<b>Concordanza negativa</b>				
	30	168.0±3.6	26.7±3.3	<<0.01
<b>Totale delgi episodi concordanti</b>				
	42	147.8±6.9	27.4±3.4	<<0.01

<sup>a</sup> Stafilococchi coagulasi-negativi

<sup>b</sup> *Staphylococcus aureus*

No: numero di episodi febbrili

**Tabella 9.** Caratteristiche degli episodi febbrili nei pazienti che sono risultati positivi alla emocoltura e/o alla PCR real-time.

No	Microrganismo identificato	BC <sup>a</sup>	PCR	PCR guadagno di tempo (ore)	Trattamento antibiotico	Risoluzione clinica (sì/no)
1	CoNS <sup>b</sup>	+	+	90	vancomicina e piperacillina/tazobactam	sì
2	CoNS <sup>b</sup>	+	+	72	piperacillina/tazobactam e amikacina	sì
3	CoNS <sup>b</sup>	+	+	48	vancomicina	sì
4	CoNS <sup>b</sup>	+	+	72	teicoplanina e piperacillina/tazobactam	sì
5	CoNS <sup>b</sup>	+	+	120	vancomicina e piperacillina/tazobactam	sì
6	CoNS <sup>b</sup>	+	+	72	vancomicina	sì
7	CoNS <sup>b</sup>	+	+	0	vancomicina e piperacillina/tazobactam	sì
8	CoNS <sup>b</sup>	+	+	48	vancomicina e piperacillina/tazobactam	sì
9	CoNS <sup>b</sup>	+	+	42	vancomicina	sì
10	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>	+	+	48	vancomicina e piperacillina/tazobactam	sì
11	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>	+	+	42	teicoplanina e amikacine	sì
12	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>	+	+	24	piperacillina/tazobactam, amikacina e itraconazolo	no
13	CoNS <sup>b</sup>	+	-*	ND	cefalosporine	sì
14	CoNS <sup>b</sup>	+	-*	ND	piperacillina/tazobactam e amikacina	sì
15	CoNS <sup>b</sup>	+	-*	ND	cefalosporine e amikacina	sì
16	<i>S.pyogenes</i> <sup>d</sup>	+	-*	ND	cefalosporine e amikacina	sì
17	<i>Acinetobacter</i> spp.	+	-**	ND	piperacillina/tazobactam	sì
18	CoNS <sup>b</sup>	+	-	ND	teicoplanina e meropenem	sì
19	CoNS <sup>b</sup>	+	-	ND	teicoplanina e piperacillina/tazobactam	sì
20	CoNS <sup>b</sup>	+	-	ND	piperacillina/tazobactam e itraconazolo	sì
21	<i>A. baumannii</i> <sup>e</sup>	-	+	ND	meropenem	sì
22	<i>S. maltophilia</i> <sup>f</sup>	-	+	ND	piperacillina/tazobactam	sì
23	<i>E. coli</i> <sup>g</sup>	-	+	ND	piperacillina/tazobactam e amikacina	sì
24	<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>	-	+***	ND	vancomicina e cefalosporine	sì
25	CoNS <sup>b</sup>	-	+***	ND	cefalosporine	sì

<sup>a</sup>Emocoltura; <sup>b</sup> Stafilococchi coagulasi-negativi, <sup>c</sup>*Staphylococcus aureus*; <sup>d</sup>*Streptococcus pyogenes*; <sup>e</sup>*Acinetobacter baumannii*; <sup>f</sup>*Stenotrophomonas maltophilia*; <sup>g</sup>*Escherichia coli*; \*SeptiFast ha identificato una contaminazione da CoNS; \*\* SeptiFast ha identificato una contaminazione da streptococchi; \*\*\* precedente infezione documentata da PCR e BC, ND non valutabile a causa del risultato discordante tra emocoltura e PCR

## 6. DISCUSSIONE

Dopo più di un secolo di utilizzo dell'emocoltura come metodo convenzionale per la diagnosi di sepsi, è diventata sempre più pressante la ricerca di nuove tecniche per cercare di aumentare la sensibilità e la rapidità di risposta a beneficio del paziente. L'incidenza di sepsi, infatti, è in continuo aumento e la diagnosi di infezione in pazienti neutropenici e, più generalmente immunocompromessi, rimane una sfida dal momento che circa la metà dei casi di sepsi rimane negativa alla coltura<sup>85</sup>. L'aumento dell'incidenza dell'infezioni fungine invasive, le infezioni causate dai CoNS a seguito del sempre più diffuso uso dei cateteri vascolari, la profilassi antimicrobica cui sono sottoposti questi pazienti, sono tutti fattori che limitano la capacità dell'emocoltura di individuare l'agente responsabile di sepsi nei pazienti oncoematologici. Il ritardo o il fallimento nelle procedure diagnostiche portano a un trattamento inadeguato nel 25% dei casi, con un significativo aumento del rischio di morte. Il riscontro autoptico ha confermato come una diagnosi sbagliata insieme con un inadeguato trattamento antimicrobico sia la causa evitabile più comune nei casi di morte correlata alla sepsi. Inoltre, alcuni studi dimostrano che un trattamento antibiotico inappropriato in ambiente ospedaliero è un importante determinante di mortalità, causa un aumento degli effetti collaterali e delle resistenze agli antibiotici oltre che aumentare il costo di trattamento per paziente<sup>86,87,88</sup>.

Uno degli approcci più promettenti nella diagnosi delle infezioni del sangue sembra quello basato sull'identificazione diretta del DNA batterico e fungino nel sangue intero mediante PCR<sup>81</sup>.

Lo studio descritto in questo lavoro è la prima applicazione clinica di una PCR multiplex real-time commerciale (*SeptiFast*) per la gestione di pazienti immunodepressi con neoplasia.

I risultati delle tecniche diagnostiche basate sull'isolamento colturale, generalmente, non sono disponibili in tempi abbastanza rapidi da poter influenzare l'inizio di una terapia antibiotica, infatti, la maggior parte dei campioni positivi richiede almeno due giorni prima che venga segnalato ed identificato il microrganismo presente mentre una coltura negativa viene indicata come tale solo dopo 6 giorni di incubazione.

Il principale vantaggio della procedura *SeptiFast* è risultata la rapidità con cui è stato possibile ottenere risultati fruibili dal clinico, con un vantaggio di tempo in relazione all'emocoltura che è statisticamente significativo quando vengono analizzati i campioni positivi e negativi concordanti con le due metodiche ( $p << 0.01$  t-test, tabella 8).

La metodica *SeptiFast* si è dimostrata di grande utilità nell'identificazione di contaminazioni

da CoNS. Si è già sottolineato come l'emocoltura abbia una bassa sensibilità e possa dar luogo a "falsi positivi" per contaminazione al momento della raccolta. L'attribuzione di un significato di contaminazione si presenta spesso non agevole basandosi su dati microbiologici (numero di flaconi positivi sul totale, tempo di crescita, microrganismo isolato) e clinici (compatibilità col quadro clinico, fattori di rischio quali la presenza di devices, risposta alla terapia). In tre casi, il risultato della PCR è stato di supporto all'evidenza clinica che indicava la mancanza di rilevanza del batterio isolato dall'emocoltura e ha contribuito in tempo utile ad evitare che fossero utilizzati in questi pazienti farmaci specifici anti-stafilococchi.

In altri tre pazienti, *SeptiFast* è stato in grado di identificare batteri Gram-negativi, che rappresentano un serio rischio di vita per i pazienti neutropenici, in modo più efficiente. L'esito positivo della terapia mirata cui sono stati sottoposti questi pazienti indica che i risultati della PCR erano corretti.

In due episodi il risultato positivo dell'emocoltura non correlava con la risoluzione rapida della febbre e il quadro clinico presente (pazienti 16 e 17, tabella 9). In questi casi il *SeptiFast* ha indicato solamente la presenza di batteri contaminanti e i risultati della PCR erano in accordo con la risoluzione clinica dell'episodio febbrile indicando che probabilmente il risultato dell'emocoltura era da attribuirsi ad una procedura scorretta nel momento del prelievo.

La limitazione maggiore dei test PCR per l'identificazione di batteri e funghi nel sangue, ma non solo, è l'impossibilità di poter disporre contemporaneamente del dato relativo alla sensibilità antibiotica che necessita l'isolamento e la coltura del microrganismo. Il numero dei markers di resistenza che possono essere individuati mediante le tecniche di biologia molecolare sono in rapido aumento. Molti geni di resistenza dei batteri possono venire identificati di routine, come il gene *mecA* per la meticillino-resistenza nello *S. aureus* e *rpoB/KatG/ingA* per la resistenza alla rifampicina/isoniazide in *M. tuberculosis*. Tuttavia il rilevamento di tutti i geni di resistenza, valutati in più di un centinaio, richiederebbe un numero enorme di test per ciascun campione.

Pertanto, nonostante i vantaggi oggettivi del metodo *SeptiFast*, l'emocoltura rimane uno strumento diagnostico importante che fornisce informazioni essenziali relativamente la resistenza agli antibiotici dei microrganismi. Inoltre, l'analisi statistica dei dati sperimentali, dimostra che i due metodi forniscono risultati differenti e complementari, un'importante conseguenza di queste osservazioni è che l'emocoltura e la PCR real-time non sono metodiche intercambiabili ma che devono essere applicate in associazione per poter giungere ad una diagnosi corretta. In conclusione, è evidente che l'emocoltura rimane il metodo di

riferimento nella diagnosi di sepsi, consentendo l'isolamento dei batteri e dei miceti responsabili e lo studio della loro sensibilità agli antibiotici ma l'associazione con il *SeptiFast* potrebbe fornire un valido contributo al clinico grazie alla rapidità del test (6 ore), per il rilevamento di co-infezioni o di microrganismi a crescita lenta o difficile e grazie alla capacità di testare campioni di pazienti in corso di profilassi/terapia antibiotica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Speers J. D. Clinical application of molecular biology for infectious Diseases. *Clin. Biochem. Rev.* 2006; **27**: 39-51.
2. DeBiasi R. L., Kenneth L. T. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin. Microb. Rev.* 2004; **17**(4): 903-925.
3. Berger A., Scherzed L., Sturmer M., Preiser W., Doerr HW., Rabenau HF. Comparative evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples. *J. Clin. Virol.* 2005; **33**:43-51.
4. Emery VC., Sabin CA., Cope AV., Gor D., Hassan-Walker AF., Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet.* 2005; **355**: 2032-6.
5. Williamson ECM., Leeming JP., Palmer HM., et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipient by polymerase chain reaction. *Br. J. Haematol.* 2000; **108**:132-9.
6. Svendsen UG., Lundgren B. Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumoniae-a case control study. *BCM Infect. Dis.* 2002; **25**:28.
7. Paule SM., Trick WE., Tenover FC., et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2003; **41**: 4805-7.
8. Bergmann JS., Woods GL. Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR Mycobacterium tuberculosis test for detection of M. tuberculosis in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34**: 1083-5.
9. Tzanakaki G., Tsopanomichalou M., Kesanopoulos K., et al. Simultaneous single-tube PCR assay for detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae type b and Streptococcus pneumoniae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; **11**: 386-90.
10. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;**31** (4):1250-6.
11. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 1989;**17** (5):389-93.
12. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* 2003;**112** (4):460-7.

13. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;**420** (6917):885-91.
14. Kotb M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin Microbiol Rev* 1995;**8** (3):411-26.
15. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;**406** (6797):782-7.
16. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;**348** (2):138-50.
17. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;**112** (6 Suppl):321S-329S.
18. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999;**341** (8):586-92.
19. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;**27** (7):1230-51.
20. van Gestel A, Bakker J, Veraart CP, van Hout BA. Prevalence and incidence of severe sepsis in Dutch intensive care units. *Crit Care* 2004;**8** (4):R153-62.
21. Flaatten H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care* 2004; **8** (4):R180-4.
22. Salvo I, de Cian W, Musicco M, et al. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995;**21 Suppl 2**:S244-9.
23. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;**29** (7):1303-10.
24. Heyland DK, Hopman W, Coe H, Tranmer J, McColl MA. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med* 2000;**28**(11):3599-605.
25. Morgan M, Salmon R, Keppie N, Evans-Williams D, Hosein I, Looker DN. All Wales surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the first year's results. *J Hosp Infect* 1999;**41**(3):173-9.
26. Cohen J, Brun-Buisson C, Torres A, Jorgensen J. Diagnosis of infection in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;**32**(11 Suppl):S466-94.
27. Danai PA, Moss M, Mannino DM and Martin GS. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006;129:1432-40
28. Penack O, Beinert T, Buchheidt D, et al. Management of sepsis in neutropenia: guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the German Society of

- Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2006;85:424-33
29. Carrigan SD, Scott G and Tabrizian M. Toward resolving the challenges of sepsis diagnosis. *Clin Chem* 2004;50:1301-1
  30. Takala A, Nupponen I, Kylanpaa-Back ML, Repo H. Markers of inflammation in sepsis. *Ann Med* 2002;34(7-8):614-23.
  31. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(3):396-402.
  32. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care* 2004;8(4):R234-42.
  33. Hensler T, Sauerland S, Lefering R, et al. The clinical value of procalcitonin and neopterin in predicting sepsis and organ failure after major trauma. *Shock* 2003;20(5):420-6.
  34. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, et al. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;77(3):F221-7.
  35. Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandembroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004;4(12):751-60.
  36. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003;36(11):1418-23.
  37. Serody JS, Berrey MM, Albritton K, et al. Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(5):533-8.
  38. Doern GV, Gantz NM. Detection of bacteremia in patients receiving antimicrobial therapy: an evaluation of the antimicrobial removal device and 16B medium. *J Clin Microbiol* 1983;18(1):43-8.
  39. Appelbaum PC, Beckwith DG, Dipersio JR, Dyke JW, Salvanti JF, Stone LL. Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium. *J Clin Microbiol* 1983;17(1):48-51.
  40. Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R. Advantage of combining resin with lytic BACTEC blood culture media. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2634-8.
  41. Spaargaren J, van Boven CP, Voorn GP. Effectiveness of resins in neutralizing



- antibiotic activities in bactec plus Aerobic/F culture medium. *J Clin Microbiol* 1998;**36**(12):3731-3.
42. Brown DR, Kutler D, Rai B, Chan T, Cohen M. Bacterial concentration and blood volume required for a positive blood culture. *J Perinatol* 1995;**15**(2):157-9.
43. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;**68**(3):332-43.
44. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997;**10**(3):444-65.
45. Wilson ML. General principles of specimen collection and transport. *Clin Infect Dis* 1996;**22**(5):766-77.
46. Kaditis AG, O'Marcaigh AS, Rhodes KH, Weaver AL, Henry NK. Yield of positive blood cultures in pediatric oncology patients by a new method of blood culture collection. *Pediatr Infect Dis J* 1996;**15**(7):615-20.
47. Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(2):830-8.
48. Jansen GJ, Mooibroek M, Idema J, Harmsen HJ, Welling GW, Degener JE. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(2):814-7.
49. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001;**39**(11):4138-41.
50. Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2002;**40**(1):247-51.
51. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;**35**(6):1353-60.
52. Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2001;**33**(9):1504-12.
53. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(7):3293-8.
54. de Mendoza C, Alcami J, Sainz M, Folgueira D, Soriano V. Evaluation of the Abbott LCx quantitative assay for measurement of human immunodeficiency virus RNA in plasma.

*J Clin Microbiol* 2002;**40**(4):1518-21.

55. Marshall RL, Laffler TG, Cerney MB, Sustachek JC, Kratochvil JD, Morgan RL. Detection of HCV RNA by the asymmetric gap ligase chain reaction. *PCR Methods Appl* 1994;**4**(2):80-4.
56. Amendola A, Bordi L, Angeletti C, Girardi E, Ippolito G, Capobianchi MR. Comparison of LCx with other current viral load assays for detecting and quantifying human immunodeficiency virus type 1 RNA in patients infected with the circulating recombinant form A/G (CRF02). *J Clin Microbiol* 2004;**42**(2):811-5.
57. Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, Frantzen I, Melsert R. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods* 1999;**82**(1):45-54.
58. Lewin SR, Vesanen M, Kostrikis L, et al. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;**73**(7):6099-103.
59. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2002;**34**:730-51
60. Fraser A, Paul M, Almanasreh N, et al. Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. *Am J Med* 2006;**119**:970-6
61. Penack O, Beinert T, Buchheidt D, et al. Management of sepsis in neutropenia: guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol* 2006;**85**:424-33
62. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002;**30**(6):1250-5.
63. Jeschke MG, Einspanier R, Klein D, Jauch KW. Insulin attenuates the systemic inflammatory response to thermal trauma. *Mol Med* 2002;**8**(8):443-50.
64. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;**345**(19):1359-67.
65. Annane D. Corticosteroids for septic shock. *Crit Care Med* 2001;**29**(7 Suppl):S117-20.
66. Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B, Grinnell BW. Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;**276**(14):11199-203.
67. Matthay MA. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N Engl J Med* 2001;**344**(10):759-62
68. Carman WF, Wallace LA, Walker J, et al. Rapid virological surveillance of community influenza infection in general practice. *Bmj* 2000;**321**(7263):736-7.

69. Turenne CY, Witwicki E, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(2):513-20.
70. Christensen JE, Stencil JA, Reed KD. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(8):3790-800.
71. Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001;**31**(5):1106-16, 1118, 1120-1.
72. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;**22**(1):176-81.
73. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;**22**(1):130-1, 134-8.
74. Celi FS, Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, di Gioia CR, Andreoli M. Preparing polyA-containing RNA internal standards for multiplex competitive RT-PCR. *Biotechniques* 2000;**29**(3):454, 457-8.
75. Alexandre I, Zammateo N, Ernest I, et al. Quantitative determination of CMV DNA using a combination of competitive PCR amplification and sandwich hybridization. *Biotechniques* 1998;**25**(4):676-83
76. Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000;**46**(11):1738-43.
77. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;**6**(10):995-1001.
78. Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hammerle T. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol* 2001;**67**(6):2837-9.
79. Locatelli G, Santoro F, Veglia F, Gobbi A, Lusso P, Malnati MS. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(11):4042-8.
80. Ryncarz AJ, Goddard J, Wald A, Huang ML, Roizman B, Corey L. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(6):1941-7.
81. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;**10**(3):190-212.

82. Jordens JZ, Lanham S, Pickett MA, Amarasekara S, Abeywickrema I, Watt PJ. Amplification with molecular beacon primers and reverse line blotting for the detection and typing of human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2000;**89**(1-2):29-37.
83. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem* 1999;**45**(11):1932-7.
84. Clementi M. Quantitative molecular analysis of virus expression and replication. *J Clin Microbiol* 2000;**38**(6):2030-6.
85. Martin GS, Mannino DM, Eaton S and Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;**348**:1546-54
86. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D and Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 2003;**115**:529-35
87. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L and Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2003;**36**:1418-23
88. Kollef MH. The importance of appropriate initial antibiotic therapy for hospital-acquired infections. *Am J Med* 2003;**115**:582-4

## CAPITOLO 2

### ANALISI COMPARATIVA DEL GENE PLASMIDICO *ORF3* DI *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia psittaci* MEDIANTE RFLP-PCR

#### 1. INTRODUZIONE

##### 1.2. Classificazione e definizione

Le Clamidiose sono microrganismi di forma coccoide, parassiti intracellulari obbligati.

L'ordine delle *Chlamydiales* comprende attualmente una famiglia, *Chlamydiaceae*, contenente un solo genere, *Chlamydia*, e quattro specie: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum* (Figura 1). Quando nel 1980 fu pubblicata la "Approved Lists of Bacterial Names", le *Chlamydiaceae* presentavano solo due specie<sup>1</sup>. All'epoca, tutti i batteri con caratteristiche biochimiche, morfologia, e ciclo replicativo simile a quello delle clamidiose venivano classificati o come *Chlamydia trachomatis* o come *Chlamydia psittaci*. I ceppi di *Chlamydia trachomatis* erano identificati mediante la capacità di accumulare glicogeno nelle inclusioni e per la loro sensibilità alla sulfodiazina mentre i ceppi di *Chlamydia psittaci* si distinguevano per l'assenza di queste due caratteristiche. Lo sviluppo di nuovi metodi di classificazione basati sullo studio del DNA ed in particolare sulla riassociazione DNA-DNA, portò tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90 alla creazione di due nuove specie, *Chlamydia pneumoniae*<sup>2,3</sup> e *Chlamydia pecorum*<sup>4</sup>. Recentemente (1999), tuttavia, l'introduzione dei dati dell'analisi filogenetica degli RNA ribosomali 16S e 23S negli studi di tassonomia ha portato notevoli rimaneggiamenti nell'ordine *Chlamydiales*<sup>5</sup> con il riconoscimento di quattro gruppi distinti di clamidiose, inquadrati a livello di "famiglia" (Figura 1).

La famiglia *Chlamydiaceae*, riunisce le Chlamydiae già note e comprende ora due generi distinti, *Chlamydia* e *Chlamydialella*. Le specie all'interno di questa famiglia presentano un'omologia maggiore del 90% tra le sequenze dei geni per gli RNA ribosomali 16S. Tutti i ceppi compresi nella famiglia delle *Chlamydiaceae* sono riconosciuti da anticorpi monoclonali che riconoscono LPS.

Altre tre famiglie, create per inquadrare tassonomicamente i nuovi batteri "Chlamydia-like" scoperti recentemente, sono rappresentate dalla famiglia *Parachlamydiaceae* fam. nov., *Simkaniaceae* fam. nov., *Waddliaceae* fam. nov. Questi sono batteri intracellulari obbligati

con un ciclo di sviluppo simile a quello delle Clamidio e hanno un'omologia superiore all'80% per le sequenze dei geni per gli RNA ribosomali 16S di *Chlamydia*.

Il genere *Chlamydia* include le specie *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* gen. nov., e *Chlamydia suis* gen. nov. Caratteristiche pressoché comuni al genere sono la presenza di glicogeno colorabile con liquido di Lugol nelle inclusioni citoplasmatiche, un genoma di circa 1.0-1.1 Mbp, presenza nella maggior parte dei ceppi di plasmidi extracromosomici e una sensibilità variabile alla sulfodiazina.

Nell'ambito della specie *Chlamydia trachomatis* sono stati riconosciuti 18 sierotipi raggruppati in due biotipi: tracoma e linfogranuloma venereo (LGV) <sup>6,7</sup> a circolazione esclusivamente interumana. Il biotipo tracoma possiede 14 sierotipi designati con le lettere da A a K più Ba, Da, Ia. L'infezione è limitata principalmente alle cellule colonnari squamose delle membrane mucose. I sierotipi A-C sono associati al tracoma endemico, mentre i sierotipi D-K sono causa di infezioni oculo-genitali. Il biotipo LGV consiste di quattro sierotipi: L1, L2, L2a, L3 sessualmente trasmessi e in grado di invadere il tessuto linfatico.

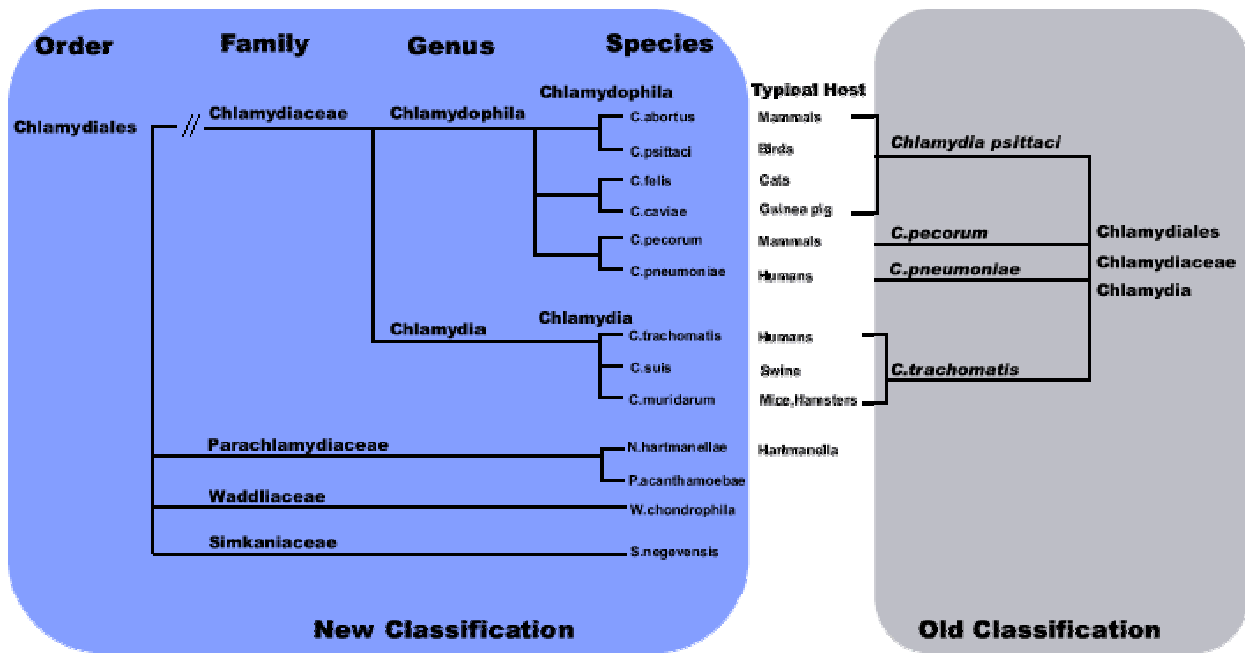
Il genere *Chlamydiophila* gen. nov., comprende le specie *Chlamydiophila pecorum*, *pneumoniae*, e *psittaci* com. nov. In questo genere il genoma è approssimativamente 1.2 Mbp, non viene prodotto glicogeno, si ha una sensibilità variabile alla sulfodiazina e plasmidi extracromosomici sono presenti quasi sempre in *C. psittaci* ma non nelle altre due specie.

I ceppi di *C. pecorum* caratterizzati sino ad ora sono stati isolati da vari ruminanti <sup>4,8</sup>, dal koala <sup>9</sup> e dal maiale <sup>10,11,12</sup>. *C. pecorum* è associata a malattie della sfera riproduttiva, del tratto urinario e causa aborti, encefalomieliti, enteriti, polmoniti e poliartriti.

*Chlamydiophila pneumoniae* isolabile dall'uomo in tutto il mondo <sup>13</sup>, è responsabile di infezioni delle alte e basse vie respiratorie. In oltre, alcuni isolati dal koala e dal cavallo hanno mostrato caratteristiche genetiche ed antigeniche molto simili a quelli umani e pertanto vengono inclusi in questa specie. Per *Chlamydiophila pneumoniae* sono stati così proposti tre biotipi: TWAR <sup>13</sup>, Koala <sup>14</sup> e Equino <sup>15</sup>. Da notare che solo il ceppo equino N16 possiede un plasmide (pCpnE1).

*Chlamydiophila psittaci* com. nov. rispetto al gruppo più eterogeneo descritto come *Chlamydia psittaci*, contiene solo i ceppi aviari distinti in otto sierotipi <sup>16</sup>. Trasmissibile all'uomo solo occasionalmente, provoca infezioni di varia gravità alle vie respiratorie (psittacosi, ornitosi).

*Chlamydiophila abortus*, *felis*, e *caviae* prima classificati come specie *Chlamydia psittaci* ora rappresentano delle specie nuove del genere *Chlamydiophila* distinti geneticamente, patogenicamente e fenotipicamente.



**Figura 1.** Adattata da: Bush, R.M. and Everett, K.D.E. (2001). Molecular Evolution of the *Chlamydiaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 203 - 220.

### 1.3. Ciclo di sviluppo

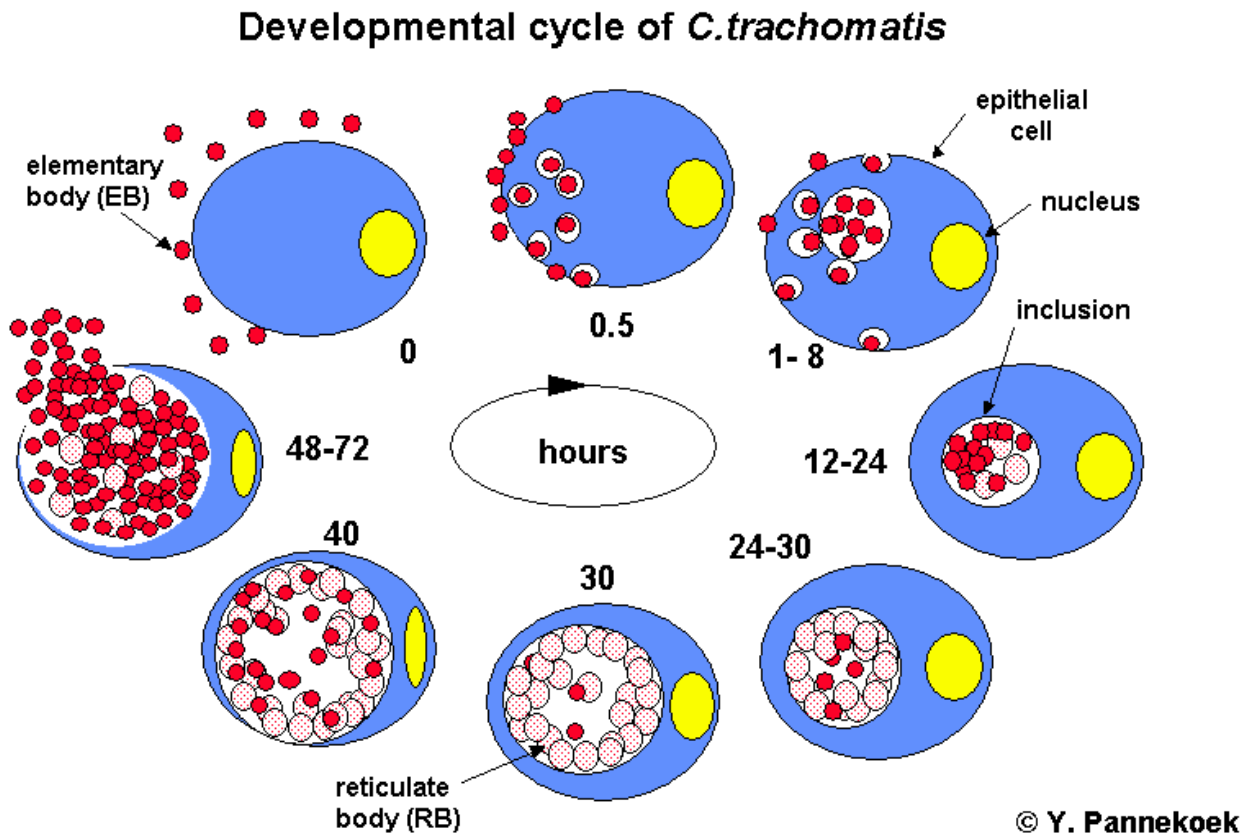
Le Clamidiose hanno un ciclo di sviluppo peculiare, caratterizzato dall'alternarsi di due entità morfologiche e funzionali: il *corpo elementare* (CE) ed il *corpo reticolare* (CR) (figura 2).

Il *corpo elementare*, di piccole dimensioni (200-300 nm), rappresenta la forma infettante, priva di capacità replicativa ma resistente e stabile anche al di fuori dell'ambito cellulare. Il *corpo reticolare*, di maggiori dimensioni (1000-1500 nm), si moltiplica attivamente per scissione binaria, non è infettante ed è meno stabile del *corpo elementare*.

Il ciclo replicativo inizia con la penetrazione del CE nella cellula eucariota mediante endocitosi: non è noto esattamente quali siano le strutture che consentono l'adesione del CE, anche se si ipotizza il coinvolgimento di più molecole. Questo processo è stato studiato più in dettaglio in *C. trachomatis* da Zhang e Stephens<sup>18</sup>. Essi hanno evidenziato sui CE la presenza di una molecola simile all'eparan-solfato glucosaminoglicano (GAG) in grado di legare un recettore sulla superficie delle cellule suscettibili all'infezione.

Durante questa fase il CE risiede all'interno di inclusioni citoplasmatiche dove, nell'arco di 4-5 ore, va incontro ad un processo riorganizzativo che si manifesta con l'aumento di volume e la comparsa, dopo 14 ore, dei CR così definiti perché caratterizzati da una struttura reticolare omogenea osservabile al microscopio elettronico. Le inclusioni sono vacuoli unici che non vanno incontro ad acidificazione o fusione lisosomiale. Esse non corrispondono alle

canoniche vescicole di endocitosi, essendo dissociate dal normale pathway endocitico e mostrando alcune somiglianze con il riciclo degli endosomi<sup>19,20,21</sup>. Tra la 18<sup>a</sup> e la 24<sup>a</sup> ora dall'infezione, alcuni CR vanno incontro ad un processo di riorganizzazione del materiale protoplasmatico con progressiva riduzione delle loro dimensioni che porta nuovamente alla formazione dei CE. Nelle ultime fasi del ciclo (dalla 48<sup>a</sup> ora), in seguito alla lisi della cellula, i CE vengono liberati e danno inizio ad un nuovo ciclo infettante.



**Figura 2.** Ciclo di sviluppo delle *Chlamydiae*

#### 1.4. La cellula batterica

Le Clamidiose possiedono una cellula rotondeggiante, con organizzazione procariotica. Dal punto di vista metabolico le Clamidiose sono in grado di sintetizzare autonomamente varie sostanze organiche a basso peso molecolare. Esse possono provvedere alle sintesi macromolecolari in modo autonomo purché abbiano a disposizione i precursori adeguati. Difetto metabolico principale, causa del loro parassitismo endocellulare obbligatorio, è costituito dall'assenza di qualsiasi sistema enzimatico per la produzione di energia (ATP), perciò sono costrette ad approvvigionarsi dalla cellula ospite di ATP e degli altri cofattori (NAD, CoA, etc.) con cui integrare, sotto il profilo energetico, le proprie capacità



biosintetiche<sup>22,23,24,25</sup>.

La struttura della parete batterica delle clamidie è assimilabile a quella dei batteri Gram negativi, anche se vi è una totale mancanza di peptidoglicano<sup>26</sup>. Mediante studi condotti nel corso degli anni si è giunti alla dimostrazione che questa struttura di membrana è mantenuta da ponti disulfidrici inter ed intramolecolari che si instaurano fra le proteine della membrana esterna dei *corpi elementari* di *Chlamydia*. Le proteine che attualmente sono chiamate in causa nel mantenimento dell'integrità strutturale del CE sono tre:

- La Major Outer Membrane Protein (MOMP), così chiamata perché rappresenta il 60% del peso secco delle proteine totali di membrana esterna, ha un peso di 38-40 kDa e viene sintetizzata attivamente a metà del ciclo di sviluppo, quando i CR si dividono; è esposta in superficie e, oltre alla funzione strutturale, ha una funzione metabolica in quanto sembra avere anche una funzione porinica.
- La 60 kDa e la 12-15 kDa chiamate rispettivamente *large* e *small Cystein rich Protein* (CrP). Esse sono sintetizzate solo tardivamente nel ciclo di sviluppo e si ritrovano nella membrana parallelamente alla comparsa dei CE. Nessuna delle due pare essere localizzata sulla superficie esterna dei CE.

Secondo un modello di architettura delle membrane proposto per *C. psittaci* ceppo 6BC da parte di Hatch e coll.<sup>27,28</sup>, che comprende solo la MOMP e le due CrP, la MOMP è rappresentata come trimero per la sua probabile funzione di porina, la *large* CrP è localizzata nel periplasma per le sue proprietà di solubilità, mentre la *small* CrP è proposta come una lipoproteina e quindi localizzata nella membrana esterna con la porzione lipidica e con la parte proteica idrofilica che sporge nel periplasma.

Mentre la MOMP e le proteine di 60 e 15 kDa presenti nel complesso dell'outer membrane sono simili in massa e struttura nelle tre specie di *Chlamydia*, una cystein-rich protein di 98 kDa sembra essere presente solo in *C. pneumoniae*. Altre proteine conosciute sono due heat-shock protein, la GroEl e la DnaK.

Mediante la metodica di Immunofluorescenza Diretta con anticorpi monoclonali anti-MOMP è possibile evidenziare la presenza delle clamidie nelle cellule infette e anche giungere ad un'identificazione approssimativa della specie in base alla morfologia delle inclusioni: inclusioni grosse e rotondeggianti sono, infatti, tipiche di *C. trachomatis* (figura 1), mentre le inclusioni di *C. pneumoniae* sono più piccole (figura 2) e quelle di *C. psittaci* sono di forma variabile, localizzate in sede para-nucleare (figura 3).

## 1.5. Genoma

L'approccio più comune per scoprire la funzione di un particolare gene in un batterio è quello di inattivarlo mediante varie tecniche di laboratorio e osservare quali sono gli effetti funzionali. Le Chlamydia sono l'unico esempio di batteri, causa di importanti patologie, in cui non è stato ancora possibile applicare metodi di manipolazione diretta del genoma. Questo ha costretto gli studiosi a dedurre le informazioni relative alle funzioni dei vari geni per paragone con possibili geni omologhi in altri organismi conosciuti. Questo approccio (sequenziamento genomico) ha reso disponibile un considerevole numero di sequenze del genoma delle Chlamydiae.

Una mappa fisica e genetica del genoma di *C. trachomatis* L2 è stata descritta nel 1992 da Birkelund e Stephens<sup>29</sup>. Il genoma delle clamidie è stato stimato approssimativamente di 1-1.2 Mb risultando essere uno dei più piccoli genomi procariotici. Teoricamente la capacità codificante di tale genoma è stimata sulle 600 proteine.

Un gran numero di tecniche sono state utilizzate per caratterizzare dal punto di vista molecolare le differenze tra le clamidie includendo l'analisi del profilo plasmidico, lo studio del polimorfismo dei frammenti ottenuti con le endonucleasi di restrizione sul DNA totale o su specifiche regioni del DNA, il sequenziamento del gene codificante la MOMP (*ompA*), studi dell'omologia di sequenza dei geni per l'rRNA e dei geni proteici.

La PCR è stata utilizzata ad esempio per la caratterizzazione intraspecie di *C. trachomatis*<sup>30,31,32</sup> e *C. psittaci*<sup>33-38</sup> usando primers specifici per il gene *ompA* codificante per la MOMP e la successiva analisi dei profili di restrizione. Come già detto la MOMP è la proteina strutturale più rappresentata sulla superficie dei CE e include quattro porzioni antigenicamente variabili (VS)<sup>39,40</sup>. A livello del gene sono presenti quattro segmenti variabili (VSI-VSIV) dispersi tra cinque segmenti molto conservati (CSI-CSV). In *C. trachomatis* l'analisi di restrizione del gene *ompA* ha mostrato di correlare con i dati della sierotipizzazione ottenuti con gli anticorpi monoclonali<sup>30,31,32</sup>.

Fin dall'inizio è sembrata comunque evidente una grande eterogeneità soprattutto all'interno dei ceppi di *C. psittaci* che ha condotto ad una distinzione tra i ceppi aviari e quelli di mammifero<sup>41</sup>. Anche questi studi hanno confermato la diversità e le relazioni tra *C. trachomatis* e *C. psittaci* dimostrando in aggiunta che *C. pneumoniae* non ha un'alta omologia con gli altri ceppi di clamidie<sup>42</sup>.

Queste osservazioni sono state confermate ed approfondite nell'arco degli ultimi anni

portando anche alla creazione di nuove specie (eg. *C. pecorum* già *C. psittaci*) o alla riclassificazione di ceppi appartenenti a specie già conosciute (eg. *C. muridarum* già *C. trachomatis* o *C. abortus, felis e caviae* già *C. psittaci*).

Oltre al genoma, sono stati identificati alcuni elementi extracromosomici in tutte e quattro le specie di clamidia. Plasmidi sono stati descritti per la prima volta nel 1980 da Lovett<sup>43</sup> in *C. trachomatis* e *C. psittaci*. Nel 1982, Richmond<sup>44</sup> descrisse un batteriofago icosaedrico di 22 nm, chiamato poi clamidiofago, osservato alla microscopia elettronica in isolati di *C. psittaci*.

Successivi a questi vi furono poi numerosi altri studi che descrissero e caratterizzarono plasmidi e fagi nelle clamidie<sup>45-49</sup>. Diverse sequenze complete del plasmide sono state pubblicate per *Chlamydia trachomatis*, per il sierotipo B<sup>50</sup>, L2 e D<sup>51,52,53</sup>, L1<sup>54,55</sup>. Alcuni ceppi di *C. psittaci*<sup>47</sup> e *C. pecorum*, quasi la totalità dei ceppi di *C. trachomatis*<sup>46</sup> e solo un ceppo equino (N16) di *C. pneumoniae* contengono dalle 5 alle 10 copie di un plasmide di 7.5 Kb codificante otto ORFs (Open Reading Frames) più grandi di 100 aminoacidi. Tutti i plasmidi provenienti da isolati umani di *C. trachomatis* sono estremamente simili mostrando una variabilità della sequenza nucleotidica inferiore all'1%. Inoltre è presente un alto grado di omologia anche tra i plasmidi delle varie specie di clamidie che può stare ad indicare un'origine comune da un plasmide ancestrale acquisito dalle clamidie molto precocemente durante la loro evoluzione.

Il confronto di queste sequenze con i databases disponibili ha fornito la funzione presunta dei prodotti di alcuni di questi ORFs: ORF 1 contiene un gene dnaB-like (un'elicasi coinvolta durante la replicazione del DNA), ORF 8 codifica per un'ipotetica ricombinasi, ORF 3 codifica per una proteina di 28 kDa (pgp3) che è stata ampiamente studiata ed è stata espressa in *E. coli*<sup>56</sup>. Questa proteina può essere un marker nelle infezioni da clamidie in quanto immunogena e può essere identificata nelle inclusioni di cellule infettate da clamidie<sup>57</sup>. Tuttavia il ruolo di pgp3 nel ciclo biologico delle clamidie e la funzione biologica del plasmide rimangono ancora sconosciute.

Il plasmide delle clamidie è di grande importanza pratica: è il target preferenziale per la diagnosi di infezione da *C. trachomatis* mediante metodi basati sul DNA. In primo luogo, essendo il plasmide presente in 7-10 copie per batterio l'utilizzo di geni multi-copia costituisce un fattore di amplificazione delle possibilità di rilevare una singola cellula batterica. In secondo luogo, sia i plasmidi che i batteriofagi sono di grande interesse come potenziali vettori per la manipolazione genetica delle clamidie. Il plasmide costituisce inoltre un interesse teorico. La sua sequenza è altamente conservata tra differenti isolati di *C.*

*trachomatis*, tuttavia sono riportati casi in cui il plasmide era mancante con nessuna conseguenza funzionale per il batterio<sup>58,59</sup>. Questo dato potrebbe confermare che la sua presenza non è essenziale per la sopravvivenza di *C. trachomatis*, ma non spiega come mai sia stato mantenuto attraverso l'evoluzione delle clamidie.

Per convenzione la sequenza plasmidica è numerata a partire dal sito unico di restrizione BamHI e gli ORFs in modo tale che l'ORF 1 si trovi subito dopo il sito Ori di inizio della replicazione (secondo Comanucci e colleghi il sito Ori sarebbe collocato tra ORF6 e ORF7). Entrambi i filamenti plasmidici contengono regioni codificanti e, in ogni caso, l'ORF 2 è situato sul filamento complementare. Tutti i plasmidi contengono quattro tandem repeat di 22 bp nella regione intergenica tra ORF1 e ORF 8 .

Questo plasmide sembra essere sottoposto ad una pressione selettiva positiva almeno in *C. trachomatis*, anche se, dall'analisi degli isolati in cui tale plasmide è assente, sembra non ricoprire una funzione essenziale per la sopravvivenza delle clamidie.

Inoltre, lo studio di elementi extracromosomici nelle clamidie ha suscitato da subito un certo interesse per la possibilità di poter disporre di un vettore compatibile con l'ospite tramite cui veicolare frammenti di genoma di *E. coli* o delle clamidie stesse.

Le sequenze sono molto conservate con una variazione tra loro inferiore all'1%<sup>52</sup> per i ceppi di *C. trachomatis*, mentre l'omologia è del 60% se si confrontano i plasmidi appartenenti a *C. trachomatis* e *C. psittaci*<sup>55</sup>.

## 1.6. Struttura antigenica

Le clamidie possiedono antigeni gruppo-specifici, specie-specifici e tipo-specifici. Sebbene questi organismi siano antigenicamente complessi, solo alcuni di questi antigeni giocano un ruolo importante nella diagnosi e nella patogenesi. L'antigene di gruppo fissante il complemento e condiviso da tutti i membri del genere *Chlamydia*, è il lipopolisaccaride (LPS) con la parte reattiva identificata come l'acido chetodeossioctanoico e probabilmente analogo a quello di altri batteri Gram negativi<sup>60</sup>.

La MOMP, contro cui è principalmente rivolta la risposta anticorpale dell'ospite, contiene antigeni sia specie che subspecie-specifici<sup>61,62</sup>. Gli anticorpi diretti contro la proteina MOMP risultano avere potere neutralizzante<sup>63</sup> e sono responsabili della maggior parte della reattività dei sieri nei test di microimmunofluorescenza. Studi basati sul sequenziamento del gene *ompA*, codificante per la proteina MOMP, hanno localizzato gli epitopi coinvolti nella

sierotipizzazione nelle porzioni variabili della MOMP <sup>64</sup>.

Epitopi specie-specifici altamente immunogeni sono stati individuati anche sulla CrP di 60 kDa <sup>65</sup> mentre una heat shock protein di 60 kDa che presenta omologia di sequenza con geni analoghi dell'uomo potrebbe avere un ruolo importante nella genesi del danno cronico da clamidia <sup>66</sup>.

In contrasto con le altre specie di *Chlamydia*, la MOMP in *C. pneumoniae* non è immunodominante e la risposta anticorpale dell'ospite è indirizzata prevalentemente contro la proteina di 98 kDa.

### **1.7. Infezioni**

*C. trachomatis* è un patogeno a circolazione esclusivamente interumana ed è uno dei più comuni agenti batterici trasmessi per via sessuale. Le infezioni genitali <sup>67,68</sup> sono causate principalmente dai sierotipi dal D al K, agenti patogeni di uretriti non gonococciche, sia in soggetti di sesso maschile che femminile, vaginiti, cerviciti, salpingiti e dai sierotipi L1, L2, L3, che provocano il Linfogranuloma Venereo, patologia sistemica, trasmessa per contagio sessuale, rara nei Paesi Occidentali ma molto diffusa nei Paesi del Terzo Mondo.

Diretta conseguenza delle infezioni genitali femminili sono le infezioni neonatali; la trasmissione delle clamidie al neonato avviene al momento del parto, nelle madri portatrici di infezioni cervicali. Nel 18-50% dei casi, il neonato contrae una congiuntivite acuta detta congiuntivite da inclusi che, solitamente si risolve, senza dar luogo a sequele. In un 3-13% dei casi, il neonato va incontro ad una polmonite o ad una bronchilite.

Le infezioni oculari da *C. trachomatis*, che rivestono grandissima importanza nel Terzo Mondo, sono relativamente poco diffuse nell'Occidente. I sierotipi A, B, Ba e C sono agenti eziologici del Tracoma endemico, una forma di congiuntivite cronica in cui, alle ripetute infezioni da clamidia, conseguenti alla ripetuta esposizione ai batteri, si sovrappongono altre infezioni.

La patologia è diffusa soprattutto nel Terzo Mondo favorita da condizioni di scarsa igiene dove risulta essere una delle maggiori cause di cecità <sup>69,70</sup>.

Più diffuse in occidente sono le congiuntiviti provocate dai ceppi D-K e correlate, quindi, alle infezioni genitali <sup>71</sup>.

*C. pneumoniae* provoca infezioni a livello respiratorio che, nella maggior parte dei casi (fino al 90%), risultano paucisintomatiche o del tutto asintomatiche <sup>2,3,13</sup>. Quando l'infezione è

cl clinicamente evidente, il paziente può presentare una faringite, di solito abbastanza severa, una bronchite o una polmonite. La trasmissione dell'agente patogeno avviene per contatto diretto con il soggetto infetto. Di recente è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento di *C. pneumoniae* nella formazione delle placche ateromasiche, in particolare a livello delle coronarie e dell'aorta ascendente ma l'ipotesi necessita di ulteriori informazioni <sup>72</sup>.

Per quel concerne *C. psittaci*, la trasmissione di questo agente patogeno all'uomo è del tutto accidentale <sup>73</sup> ed i quadri clinici rilevati sono tra i più vari: l'infezione è sistemica e può manifestarsi talora con lievi sintomi simil influenzali, talora come una polmonite piuttosto severa (psittacosi), encefalomielite, interessamento del miocardio. La psittacosi umana è una zoonosi contratta in seguito ad esposizione a specie aviarie infette. *C. psittaci* è ubiquitariamente diffusa tra le specie aviarie e l'infezione negli uccelli normalmente interessa il tratto intestinale. L'organismo viene rilasciato nell'ambiente con le feci e diffuso mediante aerosol. Comune anche tra gli animali domestici e di allevamento in diverse parti del mondo queste infezioni sono causa di aborto e infertilità in allevamenti ovini e bovini con importanti conseguenze economiche, in Gran Bretagna, dove questa continua ad essere una delle maggiori cause di infezione del tratto genitale degli ovini la perdita è stimata sui 20 milioni di dollari l'anno. Esiste un certo numero di reports in letteratura in cui sono descritti alcuni casi di aborto anche nella donna in seguito ad esposizione ad animali infetti e di severe malattie dell'apparato respiratorio <sup>74,75</sup>.

## **1.8. Diagnosi di laboratorio**

- **Metodi colturali**

Le clamidie sono organismi relativamente labili e la conferma di un'infezione sostenuta da clamidie dipende dall'appropriatezza del campione clinico prelevato dal paziente seguita dalla valutazione diretta della presenza del batterio. Per molti anni, il gold standard per la conferma della presenza di un'infezione da clamidie è stato l'isolamento del batterio su colture cellulari e la dimostrazione delle caratteristiche inclusioni. Tuttavia, questo metodo richiede necessariamente che il batterio sia mantenuto vitale mediante l'utilizzo di appropriati terreni di trasporto e di opportune condizioni di temperatura. L'isolamento delle clamidie in colture cellulari, normalmente possibile solo in centri di riferimento e di ricerca, è estremamente laborioso, lungo e necessario inoltre disporre di laboratori con elevati standard di sicurezza specialmente per la manipolazione di isolati di *C. psittaci* (BCL3: biocontainment level 3) oltre ad essere difficilmente sottoponibile a standard di qualità. I metodi per l'identificazione sono basati sulla dimostrazione della presenza delle caratteristiche inclusioni citoplasmatiche

mediante immunofluorescenza (IF) con anticorpi gruppo-specifici oppure con colorazione con Iodio o Giemsa. Gli isolati di *C. trachomatis* possono tipizzati usando anticorpi monoclonali sierotipo-specifici o tipo-specifici oppure con metodi molecolari di genotipizzazione (RFLP-PCR e/o sequenziamento del gene ompA). Storicamente le clamidie erano cresciute in uova embrionate, attualmente vengono usate differenti linee cellulari ad esempio: HeLa, McCoy, HEp-2, LLCMK2. I campioni clinici vengono inoculati su monostrato cellulare a 35°-37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>, centrifugati a 3000 x g e incubati per 48-72 ore e colorati con anticorpi monoclonali coniugati con fluoresceina per dimostrare la presenza delle inclusioni.

- **Metodi non colturali**

Test sierologici sono utilizzati per porre diagnosi di infezione acuta o cronica da *C. pneumoniae*, infezione acuta da *C. psittaci*, e in alcuni casi di infezione acuta e cronica da *C. trachomatis*.

I metodi sierologici utilizzati comprendono la fissazione del complemento (CF), l'IF (immunofluorescenza), EIA (test immunoenzimatici) e utilizzano antigeni specie o gruppo specifici o una combinazione di questi per misurare le immunoglobuline G (IgG) IgA o IgM. Sono disponibili in commercio un diversificato numero di test EIAs per il rilevamento degli antigeni di clamidia nei campioni clinici. Questi kits usano anticorpi monoclonali o policlonali diretti contro LPS delle clamidie che è più solubile della proteina MOMP. Sono tests in grado teoreticamente di rilevare ogni specie di clamidia, ma attualmente sono approvati sono per le infezioni sostenute da *C. trachomatis*.

Infine vi è una continua espansione dei test NAA (Nucleic Acid Amplification) specialmente per *C. trachomatis*. Queste metodiche basate sulla rilevazione degli acidi nucleici hanno mostrato un'elevata sensibilità quasi del 100%, anche se rimangono ancora alcuni problemi legati alla presenza nel campione di sostanze inibitrici che sono causa di falsi negativi. Per *C. trachomatis* sono disponibili in commercio e certificati FDA 5 metodi NAA ormai entrati di routine nei laboratori di microbiologia: PCR (polimerase chain reaction), LCR(ligase chain reaction), SDA (strand displacement amplification assay) che amplificano delle sequenze nucleotidiche del plasmide presente in più copie in *C. trachomatis*; la TMA (transcription mediated amplification reaction) diretta nei confronti del RNA ribosomale.

Numerosissimi sono i lavori presenti in letteratura che descrivono l'applicazione delle metodiche NAA per *C. pneumoniae* o *C. psittaci* tuttavia al momento non sono disponibili kit commerciali approvati per uso clinico.

## 1.9. Cenni di terapia

Le tetracicline sono state la terapia di elezione per almeno 20 anni. E' raccomandato un trattamento con doxiciclina 100 mg, due volte al giorno per almeno 7 giorni. In caso di infezioni acute del tratto genitale superiore potrebbe rendersi necessaria una terapia endovena. Alternativamente possono essere usati i macrolidi: eritromicina e azitromicina.

Sia la doxiciclina che l'eritromicina<sup>76,77,78</sup> hanno un basso costo ed agiscono inibendo la sintesi delle proteine batteriche; entrambe danno effetti collaterali che coinvolgono l'apparato gastroenterico

L'avvento sul commercio dell'azitromicina (Zitromax) ha rivoluzionato la terapia delle infezioni da clamidia. La sua importanza deriva dalle sue proprietà farmacocinetiche: la sua struttura gli conferisce stabilità in ambiente acido, alta penetrazione nei tessuti, bassi livelli sierici e un'emivita lunga. Il livello di farmaco che si raggiunge all'interno dei tessuti e delle cellule è ottimale per il trattamento di batteri intracellulari quali le clamidie; essendo inoltre l'efflusso del farmaco dalle cellule piuttosto lento, l'azitromicina risulta particolarmente utile nel caso di pazienti in cui è difficile riscontrare una completa aderenza allo schema di trattamento. Una singola dose orale di 1 g di azitromicina ha un'efficacia equivalente a 100 mg di doxiciclina somministrati 2 volte al giorno per 7 giorni. Negli USA l'azitromicina è consigliata come farmaco di prima linea nella terapia delle infezioni uretrali, cervicali, rettali da clamidia. Questo farmaco presenta uguali risultati nella cura del tracoma oculare della doxiciclina con il vantaggio di una via di somministrazione più semplice.

L'utilizzo dell'azitromicina è più complicato e meno chiaro per quello che riguarda le infezioni complicate del tratto genitale superiore<sup>76,77,78</sup>.

La terapia delle infezioni sostenute dalle clamidie è un problema durante la gravidanza poiché le tetracicline sono controindicate e l'eritromicina è scarsamente tollerata. L'azitromicina è consigliata dai CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA, 1998) in corso di infezioni durante la gravidanza perché meglio tollerato dell'eritromicina.

L'azitromicina e le tetracicline sono parte del programma di prevenzione della cecità del WHO (SAFE Programme) per ridurre le sequele del tracoma. Sono oggi disponibili nuovi macrolidi con efficacia simile alla terapia standard con doxiciclina: roxitromicina, claritromicina, josamicina.



## 2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

I batteri del genere *Chlamydia* sono parassiti intracellulari obbligati che hanno un ruolo importante in alcune patologie dell'uomo e degli animali<sup>79</sup>. *Chlamydia trachomatis* è causa di infezioni del tratto genito-urinario<sup>80</sup> ed è associato a congiuntiviti neonatali e polmoniti. *Chlamydia psittaci* è un patogeno animale che occasionalmente infetta l'uomo e causa un'ampia gamma di patologie negli uccelli e nei ruminanti.

I plasmidi sono stati descritti inizialmente da Lovett sia in *C. trachomatis* che in *C. psittaci*<sup>43</sup>, a questo sono seguiti molti altri studi che hanno descritto le caratteristiche molecolari dei plasmidi di clamidia.

Il plasmide di *C. trachomatis* (pCT) è un plasmide di 7.5 kb che viene comunemente ritrovato in tutti gli isolati. Sono state ormai pubblicate numerose sequenze complete del plasmide isolato da *C. trachomatis*<sup>52,55</sup>. Questi lavori hanno messo in evidenza l'alto grado di conservazione tra plasmidi di isolati diversi (meno del 1%), la presenza di 8 ORFs (open reading frames) codificanti per polipeptidi di dimensioni maggiori di 10 kDa e per cinque di questi sono state indicate le funzioni putative. In particolare, l'ORF3 codifica per una proteina antigenica di 28 kDa, pgp3, che è stata espressa in *Escherichia coli*<sup>56,57</sup>. Questa proteina è un marker di infezione da *C. trachomatis* nell'uomo e può venire identificata precocemente mediante immunofluorescenza delle cellule infettate da *C. trachomatis*. Tutti gli isolati aviari di *C. psittaci* come quelli causa della poliartrite ovina e della encefalomielite bovina sporadica, contengono un plasmide di dimensioni leggermente variabili rispetto a quello di *C. trachomatis*, 6.2 kb o 7.2-7.3 kb, mentre non lo contengono gli isolati causa di aborto negli ovini<sup>47,49,55</sup>. La struttura genomica del plasmide di *C. psittaci* (pCP) è la medesima di quella vista per *C. trachomatis* con 8 ORFs<sup>55</sup>.

In questo studio, è stata condotta un'analisi comparativa del gene ORF3 in 11 ceppi di *C. trachomatis* e 12 ceppi di *C. psittaci* di diversa origine animale, mediante metodiche di PCR-RFLP (polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism) e sequenziamento per la valutazione di somiglianze o differenze nel gene ORF3 del plasmide comune di clamidia e per verificare se l'infezione da parte di ceppi di *C. psittaci* positivi per la presenza del plasmide induce una risposta sierologia diretta verso il prodotto codificato dal gene ORF3.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Ceppi batterici

In tutto sono stati testati 35 isolati di *Chlamydia*: 11 ceppi di *C. trachomatis* e 24 isolati di *C. psittaci*. Gli isolati di *C. trachomatis* includevano 11 sierotipi: D-K e L1, L2, L3.

Gli isolati di *C. psittaci* sono stati ottenuti da differenti fonti e includevano ceppi di riferimento e isolati origina Italiani. I ceppi di riferimento erano rappresentati da 7 ceppi: un ceppo aviario 6BC isolato dal parrocchetto, alcuni ceppi ovini abortigeni A22, S26/3, C94/1, H574, Krauss 15 ( un ceppo caprino) e il ceppo della poliartrite ovina P787. I campioni provenienti dall'Italia sono stati gentilmente forniti dal Dr. Magnino (Sezione Diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Pavia) ed erano costituiti da isolati da pappagalli (1837,2915, 3670, 4654/8), da piccioni (209/2, 1867, 2437, 4389, 5039, 1831), e da allevamenti di ovini con problemi di infertilità e aborti ripetuti (5268, 249/2, 3056/3, 3638/3, 5631, 2047). Inoltre, è stato studiato un ceppo di *C. psittaci* (Scalorbi) recentemente isolato nel nostro laboratorio dall'espettorato di un paziente con polmonite probabilmente contratta dal suo pappagallino affetto da psittacosi (tabella 1).

#### 3.2. Colture cellulari

Le *Chlamydiae* sono state coltivate su monostrato di cellule LLC-MK2 (una linea cellulare derivata dal rene di scimmia Rhesus) propagate in tubi dal fondo piatto, in Eagle Minimal Essential Medium con supplemento di 10% di siero bovino fetale inattivato al calore, arricchito di glucosio 5 mg/l e di L-glutammina (1% v/v), antibiotici (gentamicina 10 mg/l vancomicina 10 mg/l, fungizone 1 g/l), in presenza di cicloeximide (1 mg/l) per inibire le sintesi macromolecolari cellulari, seguendo le procedure standard per l'isolamento delle *Chlamydiae*<sup>81</sup>.

I monostrati cellulari inoculati, sono stati poi centrifugati per un'ora a 3000 rpm a 33°C e incubati a 37°C. Trenta ore dopo l'infezione, le cellule sono state lavate con PBS sterile e fissate con metanolo. I monostrati cellulari sono stati incubati con un siero di coniglio anti-pgp3 (diluito 1:100 in PBS) a temperatura ambiente per 30 minuti e con IgG anti-coniglio fluoresceinate<sup>56</sup>. Le cellule sono state colorate con Blu di Evans per creare un contrasto prima di esaminarle al microscopio ad UV. Per controllo, un duplicato di ciascuna cultura cellulare infettata è stato colorato con anticorpo monoclonale fluoresceinato diretto nei confronti del

lipopolissacaride comune delle clamidie usando il kit Merifluor Chlamydia (Meridian Diagnostic Inc.).

**Tabella 1:** Ceppi di *Chlamydia* studiati nel presente lavoro

		Sierotipo L1, L2, L3	
<i>C. trachomatis</i>		Sierotipo D-K	
		6BC	
		Scalorbi	Isolato umano
		209/2	Piccione
		1867	Piccione
	<i>Ceppi aviari</i>	1831	Piccione
		2437	Piccione
		4389	Piccione
		5039	Piccione
		3670	Pappagallo
		2915	Pappagallo
		4654/8	Pappagallo
		1837	Pappagallo
	<i>Ceppi ovisi</i>	A22	Abortigeni
	<i>C. psittaci</i>	C94/1	"
		S26/3	"
		H574	
		Krauss 15	"
		P787	Poliartrite
		5268	Infertilità/aborto
		249/2	
		3056/3	"
		3638/3	
		5631	"
		2047	"

### 3.3. Estrazione del DNA

Quando l'infezione dei monostrati interessava almeno l'80% delle cellule, il terreno di coltura veniva eliminato e le cellule risospese in PBS sterile (phosphate-buffered saline) pH 7.2. La sospensione di cellule veniva centrifugata e il DNA totale veniva estratto dal pellet mediante il kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germania) secondo le indicazioni riportate dalla ditta per l'estrazione di DNA dai tessuti.

### 3.4. PCR del gene *orf3* e analisi del polimorfismo dei siti di restrizione (RFLP)

Il DNA estratto, secondo la metodica descritta, è stato usato per l'amplificazione di un segmento del plasmide dei campioni isolati di *C. trachomatis* e *C. psittaci* comprendente il gene *orf3*.

I primers utilizzati per amplificare il gene *orf3* sono stati:

ORF3DX: 5'-GAAAGTTACTTTTTTCCTTG-3'

ORF3SN: 5'- ATGGGAAATTCTGGTTTTT-3'

Le PCR sono state eseguite in un volume finale di 100 µl con la DNA polimerasi termostabile TaKaRa (TaKaRa Shuso, Biomedical Group, Japan) in accordo con le indicazioni della ditta utilizzando il termociclatore MasterCycler Gradient Eppendorf.

Le condizioni di amplificazione prevedevano trenta cicli preceduti da un ciclo di denaturazione a 94°C per 4 minuti; ciascun ciclo consisteva in una denaturazione per 1 min a 94°C, uno step di annealing per 1 min a 48°C, uno step di extension per 1 min a 72°C, più uno step finale di extension a 72°C per 5 minuti.

Tre controlli negativi sono stati introdotti sistematicamente in ciascuna serie di amplificazioni: una preparazione di DNA purificato di cellule LLC-MK2 non infette, una di cellule infettate con il ceppo IOL-207 di *C. pneumoniae* che è privo del plasmide, e la miscela di reazione per la PCR.

Ogni amplificato è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% in buffer TRIS-Borato-EDTA, colorato con bromuro di etidio e visualizzato agli UV.

Dei campioni risultati positivi all'amplificazione con entrambi i sets di primers, quelli ottenuti con la coppia ORF3DX-ORF3SN sono stati sottoposti all'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP analysis).

Enzimi di restrizione appropriati sono stati selezionati sulla base della sequenza del plasmide

di *C. trachomatis* pubblicata da Comanducci M. et coll. (1990)<sup>52</sup> e della sequenza del plasmide di *C. psittaci* pubblicata da Thomas et coll.(1997)<sup>55</sup>. Mediante un software di analisi delle sequenze (DNA Strider 1.0.1) è stato determinato il numero e la dimensione dei frammenti di restrizione generati da differenti endonucleasi presenti sulla porzione amplificata dai primers ORF3DX-ORF3SN e tra questi è stato scelto quello che poteva dare un profilo elettroforetico interessante per le diverse specie.

Dieci microlitri di DNA amplificato per ciascun campione sono stati digeriti con 10 U dell'enzima di restrizione Bfa I (isoschizomero di Mae I) (New England Biolabs, Beverly NA) nel proprio buffer di digestione 1X. L'analisi dei campioni così digeriti è stata fatta mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% in buffer TRIS-Borato-EDTA, colorato con bromuro di etidio e visualizzato agli UV.

### **3.5. Clonaggio di ORF3 e determinazione della sequenza nucleotidica.**

I ceppi *Scalorbi* e 1867 di *C. psittaci* e il sierotipo LGV<sub>2</sub> di *C. trachomatis* sono stati ulteriormente caratterizzati mediante clonaggio e determinazione della sequenza nucleotidica del segmento plasmidico *orf-3*. L'*orf-3*, per il clonaggio, è stato ottenuto amplificando il DNA preparato secondo le modalità sopra descritte con i primers ORF3DX-ORF3SN. Per la PCR è stata utilizzata la "High fidelity cloned Pfu DNA Polymerase" (Stratagene, La Jolla, CA, USA) secondo le indicazioni del produttore in un volume finale di reazione di 50 µl (1X Pfu buffer, 200 µM di ciascun dNTP, 2.5 U di Pfu polimerase, 0.1 µM di ciascun primers). Il DNA amplificato, secondo le condizioni riportate sopra, è stato purificato con il Qiagen PCR purification kit ed è stato clonato nel vettore pCR 4 Blunt-TOPO plasmid vector (Invitrogen, CA, USA) seguendo le indicazioni del manuale INVITROGEN "Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit for Sequencing". I plasmidi ricombinanti sono stati purificati con il QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

Per ciascun campione sono stati sequenziati entrambi i filamenti per confermare la sequenza nucleotidica. Le sequenze sono state eseguite con il sequenziatore automatico della Perkin Elmer/Applied Biosystem, Mod. 373A. E' stata adottata la chimica dei Dye Terminator utilizzando il Kit: ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq FS. Il Cycle Sequencing utilizzato è stato il seguente: 90°C per 10 sec, 50°C per 5 sec, 60°C per 4 min ripetuto per 25 cicli.

I risultati sono stati analizzati col software Chromas 1.61 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Queensland 4212, Australia) e le sequenze sono state assemblate avvalendosi del programma

CAP (Contig Assembly Program Based on Sensitive Detection of Fragment overlaps, [www.infobiogen.com](http://www.infobiogen.com)). Lo studio dell'omologia delle sequenze è stato eseguito con il programma BLAST presente al The National Center for Biotechnology Information (NCBI) mentre l'allineamento multiplo delle sequenze con il programma CLUSTAL W e la rappresentazione grafica con il programma BOXSHADE.

### 3.6. Espressione e purificazione della proteina *pgp3* ricombinante di *C. psittaci*.

- Preparazione dell'inserto e del vettore

Mediante PCR, il gene *orf3* di *C. psittaci* è stato amplificato utilizzando i primers seguenti:

5'-CTAGCTAGCGGAAATTCTGGTTTTACTTA-3'

5'-CCGCTCGAGACCATTTGTTTGTTGTTTA-3'

Le sequenze sottolineate rappresentano i siti di restrizione per *NheI* (GCTAGC) e *XhoI* (CTCGAG).

I prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio al 2%.

Il plasmide utilizzato per la reazione di clonaggio pET23b+ (Novagen) è stato scelto per due principali ragioni. Innanzitutto questo tipo di vettore consente di ottenere un prodotto proteico ricombinante privo di sequenze aminoacidiche addizionali, ad eccezione di una coda contenente 6 istidine all'estremità carbossi-terminale necessaria per la purificazione del prodotto di espressione. Inoltre il vettore permette di guidare l'espressione della proteina ricombinante in quanto la sequenza da esprimere viene clonata a valle di un promotore inducibile (T7 promoter). Il plasmide conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina. Il vettore è stato preparato analogamente agli inserti, tramite digestione enzimatica. Sono stati digeriti 3 µg del vettore con gli enzimi *NheI* e *XhoI* (New England BioLabs, England, UK) in un volume finale di 30 µl. Sono state utilizzate 20 unità di ciascun enzima e il campione è stato digerito per 12 ore a 37°C. Il risultato della digestione è stato visualizzato su gel di agarosio (1%) contenente bromuro di etidio (0.01% v/v). Il vettore è stato successivamente purificato con il QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e risospeso in un volume finale di 40 µl. Tutto il prodotto della digestione è stato defosforilato per evitare la ricircularizzazione aspecifica del vettore con il frammento preventivamente exciso durante la reazione di legazione. Il plasmide digerito è stato quindi incubato con 2 U di fosfatasi alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase, Roche, Mannheim, Germany) a 37°C per 20 minuti. Anche in questo caso è stata eseguita la purificazione mediante il QIAquick PCR

Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) per ottenere un volume finale di 30 µl. La concentrazione del plasmide è stata stimata spettrofotometricamente.

Gli amplificati ottenuti sono stati purificati e legati nel vettore di espressione pET23b+ (Novagen) tra i siti di restrizione *NheI* e *XhoI*.

La reazione di legazione è stata eseguita in un volume finale di 10 µl, utilizzando 50 ng di vettore ed 1 U di enzima T4 DNA ligasi (Roche, Mannheim, Germany). Il rapporto tra numero di molecole di plasmide e di inserto all'interno della soluzione di reazione è stato fissato a 1:3. L'inserto e il vettore sono stati posti nella stessa provetta di reazione, incubati a 55°C per 2 minuti e raffreddati in ghiaccio. Successivamente sono stati aggiunti la T4 DNA ligasi e il tampone necessario al corretto funzionamento dell'enzima e incubato per 16 ore a 4°C.

- Trasformazione di *E. coli* e screening dei trasformati.

Al termine dell'incubazione, 1 µl della reazione di legazione è stato utilizzato per trasformare 50 µl di cellule di *Escherichia coli* NovaBlue (Novagen, Madison, WI, USA) rese competenti chimicamente per la trasformazione con DNA esogeno ma non per l'espressione della sequenza codificante l'antigene di interesse.

Alle aliquote di cellule NovaBlue è stato addizionato 1 µl del prodotto della legazione. Le cellule sono state incubate per 5 minuti in ghiaccio e poi sottoposte a shock termico per 30 secondi a 42°C. Dopo un'ulteriore incubazione in ghiaccio di 2 minuti sono stati aggiunti ad ogni campione 240 µl di terreno S.O.C (2% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5% KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucosio). Dopo 30 minuti in agitazione orizzontale (225 rpm) a 37°C, 100 µl di cellule sono state piastrate in una piastra di petri contenente terreno selettivo Luria-Bertani (LB, 1% bactotryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl; DIFCO, Detroit, MI, USA) addizionato con ampicillina (100 µg/ml). Le piastre ottenute sono state incubate a 37°C per 12 ore e successivamente conservate a 4°C.

- Espressione della proteina ricombinante

Per ottenere l'espressione dell'antigene ricombinante, 25 ng di campione sono stati utilizzati per trasformare 50 µl di cellule di *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) rese chimicamente competenti per la trasformazione con DNA esogeno ed in grado di guidare l'espressione della sequenza inserita nel plasmide pET-23b(+) (Novagen, Madison, WI, USA). La reazione di trasformazione è stata eseguita in accordo con le indicazioni della ditta fornitrice, applicando un protocollo del tutto identico a quello delle cellule NovaBlue sopra riportato. Al termine della reazione 50 µl di cellule sono state piastrate su piastre di petri contenenti terreno selettivo solido LB-ampicillina (100 µg/ml); le piastre sono state incubate

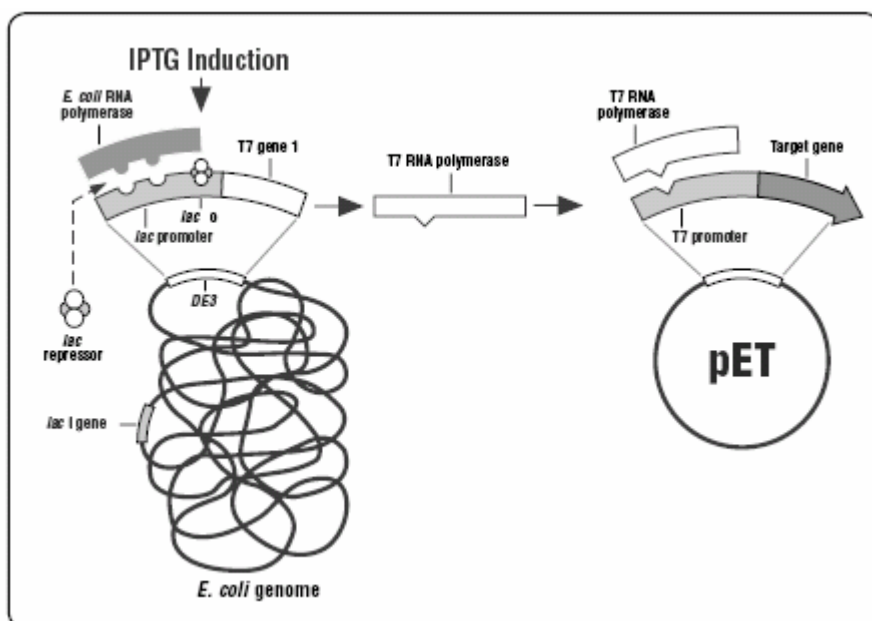
per 12 ore a 37°C ed infine conservate a 4°C.

Le cellule BL21(DE3) sono in grado di indurre l'espressione di qualsiasi gene posto sotto il controllo del promotore della RNA polimerasi del batteriofago T7 (T7 promoter). Queste cellule, infatti, sono state ingegnerizzate in modo tale da avere stabilmente integrato nel proprio genoma il gene codificante per la RNA polimerasi del batteriofago T7 (T7 RNA polimerasi) che, quando espresso, produce l'enzima in grado di legarsi in maniera specifica al T7 promoter e avviare la trascrizione del gene a valle. Sul genoma di questo ceppo di *E. coli* il gene della T7 RNA polimerasi è posto a valle di un promotore riconosciuto specificamente dalla RNA polimerasi del batterio e la sua espressione è modulabile grazie ad una sequenza operatrice mutuata dall'operone lac (sequenza lac UV5).

Tale sequenza definisce un sistema di controllo negativo basato sull'induzione: più semplicemente la trascrizione del gene della T7 RNA polimerasi è normalmente inibita per la presenza sulla sequenza operatrice di un repressore proteico, costitutivamente espresso in *E. coli*, prodotto dal gene lacI. Lo stato di repressione del gene può essere, però rimosso grazie all'aggiunta nel terreno di coltura di una molecola con funzione di "induttore", definita Isopropil-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG), un analogo non idrolizzabile del galattosio (figura 3).

Il livello di espressione dell'antigene ricombinante è modulabile e direttamente proporzionale alla quantità di IPTG che l'operatore introduce durante la crescita di *E. coli*. Nonostante questo sistema di espressione possa essere finemente regolato, è riportato essere presente un livello di espressione basale del gene plasmidico che, anche se spesso non individuabile, non può essere del tutto eliminato. Per questo motivo si preferisce trasformare con il prodotto della reazione di legazione dell'inserto al vettore cellule di *E. coli* (NovaBlue) non competenti per l'espressione di un gene sotto il controllo del T7 promoter. Questo approccio consente di recuperare il plasmide manipolato senza che la crescita delle cellule possa essere affetta dall'espressione basale di proteine ricombinanti potenzialmente tossiche.





**Figura 3.** Schema generale del controllo dell'espressione di un gene target inserito in un vettore pET.

Per valutare l'espressione dell'antigene ricombinante è stata effettuata un'induzione di prova. Venti millilitri di terreno liquido LB / ampicillina (100 µg/ml) è stato inoculato con 650 µl di una coltura overnight di BL21(DE3) trasformate. L'espressione è stata indotta a concentrazione finale di IPTG di 0,8 mM per 3 h a 37 °C dopo che le colture avevano raggiunto la fase di crescita logaritmica di *E. coli* (circa 0.6 Unità di Assorbanza). Dopo un'ulteriore incubazione di tre ore, l'induzione è stata fermata e sono stati prelevati 2 ml da ognuna delle sei beute. Dopo induzione, le colture sono state centrifugate e risospese in 200 µl di SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris, 0.2% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% blu di bromofenolo) e analizzati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulphate-Poli Acrylamide Gel Electrophoresis) e Western Blot. Il procedimento di separazione elettroforetica delle proteine su gel di poliacrilammide è stato eseguito secondo il metodo di Laemmli<sup>82</sup>. Per il trasferimento successivo su supporto di nitrocellulosa tramite Western Blot è stata seguita la tecnica di Towbin<sup>83</sup>, modificata da Batteiger<sup>84</sup>. La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel di poliacrilammide al 15% di dimensioni pari a 7 x 10 x 0.075 cm ed effettuata a corrente costante (33 mA) per circa 1 ora fino alla scomparsa del fronte di migrazione. Ogni volta sono stati analizzati 5 µl di campione indotto e non indotto risospesi in SB caricandoli sul gel, dopo denaturazione tramite bollitura per 5 minuti. Ogni corsa è stata effettuata affiancando ai campioni un marcatore di peso molecolare per le proteine (Marker Rainbow, Amersham, Little Chalfont, England). Al termine della corsa l'espressione degli antigeni ricombinanti è stata analizzata mediante colorazione con blu Coomassie. Il gel è stato incubato con il

colorante Phast-Blue (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Sweden) per 10 minuti e decolorato per circa 1 ora in Soluzione Fissante (30% metanolo, 7% acido acetico in soluzione acquosa) in grado di rimuovere il colorante non legato a bande proteiche.

Tramite l'utilizzo di un apparecchio Trans-Blot Cell (Biod-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), le bande proteiche del secondo gel sono state trasferite su un foglio di nitrocellulosa (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). E' stato applicato un campo elettrico a voltaggio costante (60V) per 1 ora, in tampone sodio fosfato 25 mM, pH 7.3, a bassa temperatura (0-1°C). Dopo il trasferimento il foglio di nitrocellulosa è stato incubato con il colorante Red Ponceau (Chemetron Chimica, Milano, Italia) per 5 minuti e poi sottoposto ad alcuni lavaggi con acqua distillata per evidenziare le bande. Il foglio di nitrocellulosa è stato incubato per 30 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di PBS-Tween-EDTA (50 mM sodio fosfato, 0.15M NaCl, 0.02M EDTA, 0.05% v/v tween 20) contenente il 3% di albumina sierica bovina per la saturazione dei siti liberi e per eliminare i residui di Red Ponceau. I campioni blottati sono stati testati con un antisiero in grado di riconoscere la sequenza di 6 istidine carbossi-terminale presente in ciascun antigene ricombinante. Terminata l'incubazione il foglio di nitrocellulosa è stato lavato con PBS-Tween-EDTA ed incubato a temperatura ambiente per 12 ore con l'antisiero monoclonale murino diretto contro la coda di istidine (Monoclonal Anti-polyHistidine, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), diluito 1:1000 in PBS-Tween-EDTA. Successivamente sono stati effettuati tre lavaggi con PBS-Tween-EDTA ciascuno di 10 minuti. Il foglio è stato poi incubato con anticorpi di coniglio anti-topo coniugati con perossidasi (Dako, Copenhagen, Denmark) diluiti 1:500 per 2 ore a temperatura ambiente. Il foglio di nitrocellulosa è stato nuovamente lavato per 30 minuti con PBS-Tween-EDTA ed incubato con la soluzione di sviluppo composta da 83% v/v di TBS 1X (0.02M TRIS, 0.5M NaCl) e 17% v/v metanolo e contenente come substrati per la perossidasi, perossido di idrogeno (0.05% v/v) e 4-cloro-1-naftolo (0.05% p/v) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Dopo 5 minuti il foglio di nitrocellulosa è stato lavato con acqua distillata per bloccare la reazione e valutare i risultati. Le colture pure ottenute prima dell'induzione di prova sono state congelate a -80°C in aliquote in LB-ampicillina (100 µg/ml) contenente il 12.5% di glicerolo.

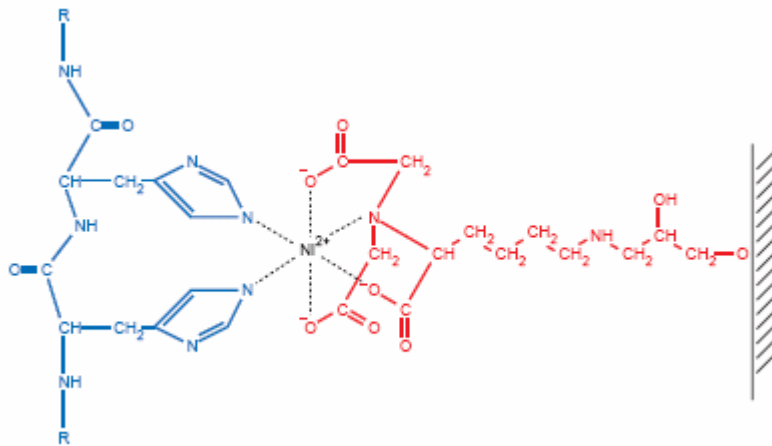
Per la produzione dell'antigene ricombinante su larga scala è stato utilizzato un protocollo molto simile a quello dell'induzione di prova. Da ciascuna delle aliquote di cellule BL21(DE3) utilizzate per l'induzione di prova e conservate in LB-ampicillina-glicerolo sono stati prelevati 5 µl e inoculati in 25 ml di terreno LB-ampicillina (100 µg/ml) fresco. Dopo 12 ore di incubazione a 37°C in agitazione, la coltura cellulare di 25 ml è stata diluita in 775 ml

di terreno fresco. Le colture sono state incubate in agitazione a 37°C fino a che l'OD<sub>600</sub> di ciascuna non ha raggiunto il valore di 0.6 UA. A questo punto è stata prelevata un'aliquota di 2 ml da ciascuna coltura e sono stati aggiunti 6 ml di IPTG 0.1 M per raggiungere la concentrazione finale 0.75 mM. Le aliquote sono state centrifugate (18,000 x g per 10 minuti) e risospese in 200 µl di SB per avere un controllo non indotto per ciascuna coltura. Dopo tre ore di incubazione sono state prelevate una seconda aliquota da 2 ml ed una terza da 4 ml. Infine l'intero contenuto delle beute è stato centrifugato per 15 minuti a 3,000 x g. I pellets sono stati congelati a -80°C in attesa del processo di purificazione degli antigeni ricombinanti.

Tutte le aliquote recuperate al termine dell'induzione sono state centrifugate (18,000 x g per 10 minuti) e i pellets utilizzati per ottenere i controlli indotti o per estrarre il plasmide ricombinante. Pertanto i pellets derivanti dalle aliquote di 2 ml sono stati risospesi in 200 µl di sb, mentre quelli derivanti dalle aliquote di 4 ml sono stati utilizzati per l'estrazione del plasmide. A tale scopo è stato utilizzato il QIAprep Miniprep Spin Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). In totale 10 µg di ogni plasmide sono stati inviati sequenziati a partire dalla regione a monte e a valle dell'inserto. L'elettroferogramma di risposta è stato analizzato con il software chromas disponibile sul sito internet: [www.tecnelsyum.com.an/chromas.html](http://www.tecnelsyum.com.an/chromas.html).

- Purificazione degli antigeni ricombinanti

La purificazione dell'antigene pgp3 ricombinante è stata ottenuta tramite cromatografia per affinità in condizioni denaturanti secondo protocollo standard per le proteine con coda di istidine (6xHis) (QIAexpressionist-Qiagen). A tale scopo è stata utilizzata una matrice di agarosio-acido netrilotriacetico (Ni-NTA-Agarose, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) complessata con cationi bivalenti del Nichel. Gli ioni Nichel sono in grado di formare legami di tipo ionico con i sei residui di istidina presenti all'estremità carbossi-terminale (figura 4).. Le proteine ricombinanti espresse in *E. coli* si possono ottenere in forma solubile (nativa) ma, nella maggior parte dei casi, specialmente quando il livello di espressione è elevato, queste aggregano in forma insolubile (i corpi inclusi). La purificazione delle proteine sulla matrice Ni-NTA si può ottenere sia in condizioni native che denaturanti indipendentemente dalla solubilità delle proteine.



**Figura 4.** Schema delle interazioni tra i residui di istidina e la matrice Ni-NTA.

Nel caso di formazione di corpi inclusi, questi possono essere facilmente solubilizzati con urea 8 M o GuHCl 6 M in quanto il legame delle proteine alla matrice non dipende dalla struttura terziaria e non è modificata dall'uso di detergenti e denaturanti. In ogni purificazione sono stati utilizzati 2 ml di resina con capacità di legame di 20 mg di proteina/ml. La lisi delle cellule è avvenuta tramite sonicazione in buffer di lisi ( 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris.Cl, 8 M urea, pH 8), le sospensioni cellulari sono state mantenute in ghiaccio durante tutto il processo. Dopo incubazione di 1 ora nel buffer di lisi, si proceduto a centrifugazione del lisato, 10.000 x g per 20 minuti, e il sovrantante è stato congelato a -20°C o immediatamente purificato. Brevemente, il lisato contenente la proteina ricombinante più la resina Ni-NTA sono stati posti insieme in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente; questa modalità detta, purificazione in batch, è stata preferita in quanto sperimentalmente abbiamo visto che promuove un legame più efficiente della proteina con 6xHis-Tag con la matrice. Successivamente, il lisato/resina, sono stati caricati su di una colonna vuota che veniva mantenuta chiusa fino a completo impaccamento della resina. Dopo circa 1 ora la colonna è stata aperta inferiormente in modo che il buffer di lisi defluisse per gravità. La resina è stata lavata 2 volte con 4 ml di buffer di lavaggio ( 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris.Cl, 8 M urea, pH 6.3). Infine la proteina è stata eluita con 2 ml di buffer di eluzione ( 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris.Cl, 8 M urea, pH 4.5). Le frazioni recuperate sono state analizzate tramite SDS-PAGE e la quantità totale di proteina è stata determinata per comparazione con uno standard di peso molecolare (Marker Rainbow, Amersham, Little Chalfont, England), avvalendosi di un software di analisi (Kodak Digital Science 1D). La proteina purificata è stata congelata a -80°C in attesa di essere utilizzati per l'allestimento del Western Blot.

### **3.7. SDS-PAGE e Western Immunoblotting**

Elettroforesi su gel di poliacrilammide-sodio dodecil solfato seguita da trasferimento elettroforetico è stata eseguita secondo quanto descritto da Comanducci <sup>57</sup>.

I blots sono stati incubati tutta la notte con i sieri oggetto di studio diluiti 1:100 in PBS. Dopo lavaggio, i complessi antigene-anticorpo sono stati evidenziati usando anticorpi marcati con perossidasi anti-IgG umane (Dako) o anti-IgG di piccione (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Olanda).

## 4. RISULTATI

### 4.1. RFLP PCR-based del gene *orf3*

L'analisi del polimorfismo dei siti di restrizione dopo PCR (PCR based RFLP) è stata effettuata per studiare il gene *orf3* di alcuni ceppi di *C. trachomatis* e *C. psittaci*.

Tutti gli 11 ceppi di *C. trachomatis* sottoposti ad analisi hanno dato risultato positivo per la presenza di una banda di amplificazione di 979 paia di basi specifica per il plasmide.

Dei 24 isolati di *C. psittaci* studiati, tutti i campioni aviari (n°=11) hanno dato risultato positivo per la presenza di una banda di 1004 paia di basi specifica il plasmide. I ceppi rimanenti di *C. psittaci* ottenuti da casi di aborto in ovini sono risultati negativi.

Il ceppo di *C. psittaci* isolato da un paziente con polmonite (Scalorbi) è risultato positivo quando testato con la PCR specifica per il gene *orf3* confermando la presenza del plasmide. L'analisi, eseguita mediante gel elettroforesi su gel di agarosio, dei frammenti ottenuti dopo digestione enzimatica con enzima di restrizione Bfa I dei prodotti di amplificazione del gene *orf3* di *C. trachomatis* e *C. psittaci* ha prodotto due profili omogenei di restrizione caratterizzati dalla presenza di:

- 4 bande per i ceppi di *C. trachomatis* 441 bp - 241 bp - 190 bp - 107 bp
- 3 bande per i ceppi di *C. psittaci* 447 bp - 274 bp - 241 bp

(figura 5).

### 4.2. Analisi della sequenza del gene *orf3*.

L'analisi della sequenza del gene *orf3* dei ceppi di *C. psittaci* 1867 (piccione) e Scalorbi (isolato da paziente), hanno presentato un'omologia del 99% (GenBank Accession Numbers DQ414845 e DQ414846, rispettivamente), invece dal confronto della sequenza del gene *orf3* di *C. psittaci* e *C. trachomatis* LGV2 sono stati evidenziate un gran numero di differenze (285 paia di basi) (figura 6).

### 4.3. Analisi WB.

Per verificare se gli animali infettati da *C. psittaci* producevano anticorpi diretti nei confronti della proteina *pgp3*, sono stati studiati con la metodica del Western blotting (WB) i sieri di 6 piccioni la cui infezione da parte di *C. psittaci* era confermata dall'isolamento in coltura cellulare.

Tutti i sieri risultavano reattivi nei confronti della proteina *pgp3* ricombinante (figura 7).

Il siero del paziente con psittacosi confermata dall'isolamento colturale della *C. psittaci* è

risultato reattivo nei confronti della proteina pgp3 ricombinante quando testato mediante WB. Successivamente, 120 sieri di piccioni sani sono stati studiati mediante WB allestito con la proteina pgp3 ricombinante e di questi il 48 (40%) possedeva anticorpi specifici anti-pgp3.

## 5. DISCUSSIONE

La funzione di alcuni ORFs del plasmide di *Chlamydia* è stata dedotta dall'analisi delle sequenze e dall'omologia con proteine presenti nei databases di cui è conosciuta la funzione<sup>55</sup>. Tuttavia, solo per l'ORF3 di *C. trachomatis* è stata ottenuta una prova diretta di espressione *in vivo*. L'ORF3 ricombinante è stato espresso *in vivo* e gli anticorpi prodotti nei suoi confronti riconoscevano una proteina di 28 kDa sul Western Blot di proteine dei corpi elementari purificati di clamidia<sup>56</sup>. È stata inoltre descritta la presenza di una risposta umorale nei confronti della proteina pgp3 in pazienti con un'infezione da *C. trachomatis*<sup>57,85,86</sup>. Successivamente, è stato dimostrato che l'immunizzazione con il gene *orf3* di *C. trachomatis* inibiva la diffusione dell'infezione di *C. trachomatis* dal tratto genitale inferiore a quello superiore in topi C3H/HeN<sup>87</sup>.

In questo studio, è stata fatta un'analisi comparativa del gene *orf3* dei sierotipi di *C. trachomatis* e di alcuni ceppi di *C. psittaci* di origine aviaria mediante RFLP-PCR per valutare se fossero presenti delle differenze tra le due specie.

I risultati hanno dimostrato che effettivamente vengono prodotti due profili di restrizione differenti, uno tipico per gli isolati di *C. trachomatis* e uno tipico per gli isolati di *C. psittaci*. Il sequenziamento di due isolati di *C. psittaci* ha confermato che il profilo omogeneo ottenuto mediante RFLP-PCR era dovuto alla bassa variabilità nella sequenza nucleotidica (2bp).

Un alto grado di variabilità è stato invece osservato quando si ponevano a confronto la sequenza degli isolati di *C. psittaci* e la sequenza del sierotipo LGV2 di *C. trachomatis* (285 bp). Questa differenza al livello della sequenza nucleotidica si traduce in 100 aminoacidi diversi a livello della proteina putativa (figura 8).

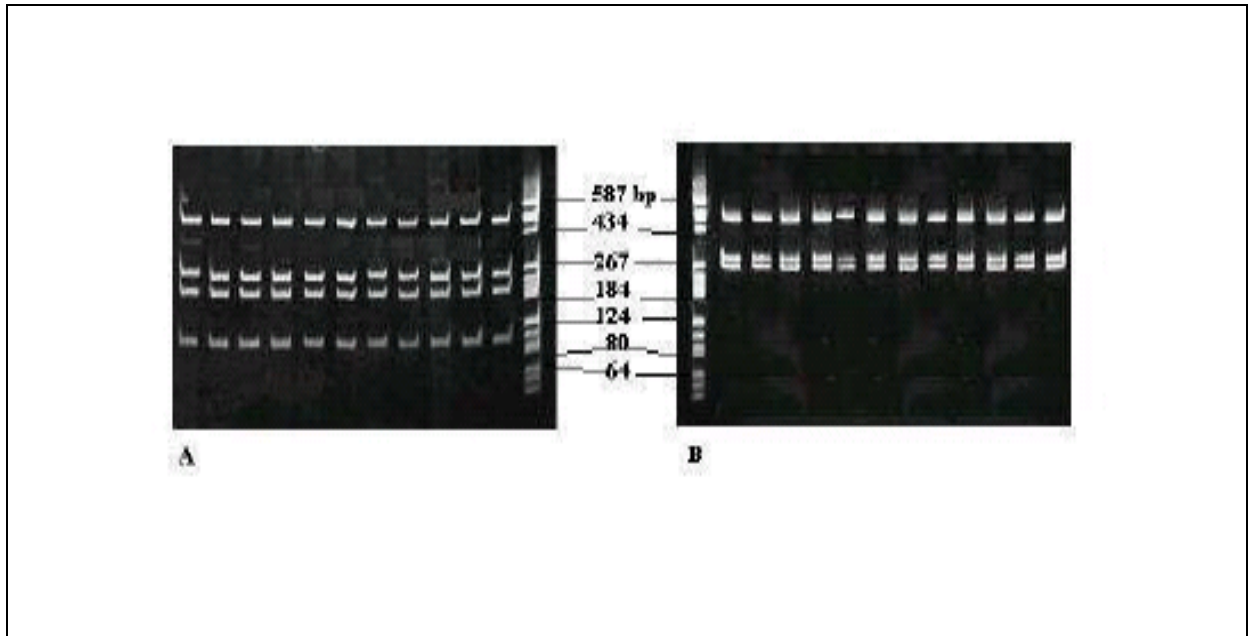
Studi precedenti<sup>55</sup> avevano dimostrato che i plasmidi di *C. trachomatis* e *C. psittaci* presentano una maggiore correlazione di quanto visto per i DNA cromosomico, con almeno il 60% di omologia interspecie. L'elevato grado di conservazione della sequenza suggerisce che il plasmide abbia avuto un progenitore comune durante l'evoluzione delle *Chlamydiaceae*. Inoltre, le somiglianze presenti a livello dell'organizzazione genomica e delle dimensioni suggerisce una condivisione interspecie dei meccanismi di mantenimento e delle proprietà generali del plasmide.

In questo lavoro ed è stato dimostrato come anche in *C. psittaci* l'unico ORF di *C. trachomatis* che fino ad ora è stato studiato per le sue proprietà antigeniche, l'ORF3, codifica per una proteina che è marker di infezione da *C. psittaci* sia negli animali che nell'uomo.

Il plasmide comune delle clamidie è un elemento extra-cromosomico che, pur non essendo



essenziale<sup>58,88</sup> per la crescita e la replicazione delle clamidie sembra presente nella maggior parte degli isolati umani di *C. trachomatis* e in tutti gli isolati aviari di *C. psittaci*<sup>47,48, 89</sup>. Per questo motivo si potrebbe ipotizzare che la presenza del plasmide conferisca un qualche vantaggio nella sopravvivenza in vivo di *C. psittaci* e *C. trachomatis*. Tuttavia, non è stata ancora descritta una funzione per questo plasmide e non è stato ancora possibile attribuire una funzione specifica alla proteina pgp3 che non presenta omologhi alle proteine batteriche ad oggi conosciute se non una spiccata immunoreattività in corso di infezione sia nell'uomo che negli uccelli.



**Figura 5.** Analisi del gene *orf3* mediante RFLP dei ceppi di *C. trachomatis* (A) e di *C. psittaci* (B) dopo digestione con Bfal.

```

SCALORBI 1 ATGGGAAATTCTGGTTTTACTTAAATGACACCCAAAATTGTGTATTTGCAGACAATATT
1867 1 .....
LGV2 1 .....T.GT.A...T...C.C.C...T.T....

SCALORBI 61 AAGCTTGGTCAAATGGAAAGTCCCTTACAAG-ATCAACAACTTATATTAGGGACAAAGTC
1867 61 .....
LGV2 61 ..AG...G.....-C..AG..GCT...G.C..G...A.A..CC.T.....CA..

SCALORBI 120 AACACCAACAGCAGCCAAATTGAATGCTAAAGAGGG----TCTTAAAATAGATATCTCAA
1867 120 .....
LGV2 120 .....TGTC.....A...CA...TCT..T..AATA...T..C-...C...

SCALORBI 176 ACACAAATGCACAAAGTGCCACCATAGACTTCTCGATAG-ATGCTGATAC--CTTATCAA
1867 176 .....
LGV2 177 TA.TCC..CA..C...-...TT.T..T-..AAT.G.T.T.G...G..A.AAG...C.--

SCALORBI 233 AGCTAATACTAGATCAAAT---ACAGAAGGGT-TTGGTAGATGCTATCATAAAAGATATC
1867 233 .....
LGV2 233 ...T..T.....AA.GT.GGG.G.TC.AAT.C....G..ATTGC.G...C----.T

SCALORBI 289 ACTAATAGTTTTAATACAAGAAGTTATTGATAGAATAATATCAGATAAAAATTTAGCACTT
1867 289 .....
LGV2 289 GT.G....AC.G.C.....TA..T.A..C.A...C.C.A....CCCTTC.C...GTT.G

SCALORBI 349 ACAAAGCTTTTAAAGAACTTTTCTTTATCAGAAAAATCCAATGCAACGGTTTATTTACA
1867 349 .....
LGV2 349 TTG.....C.....C.AA.CA.TA.T....T.....G.....C..T

SCALORBI 409 AAGTCTAATATTGGCACACTTTTAGGTGGAACAGAAATCGGGAAATTTACAATTACACCC
1867 409 .....
LGV2 409 CCCAGG..C....AA..TT.A.....A.....T.....A..A.....C...G.C.....

SCALORBI 469 GACAACGTTAATAGTATGTTTTAATTTCTGCTGACATCATAGCTTCTAGAATGGAAGGG
1867 469 .....G.....
LGV2 469 A.A.G.TC.GGG..C.....C...G.C..A..A..T..T..A..A.....C.....

SCALORBI 529 AATGTCGTTCTCGCTCTTGTAAGAGAAGGTGATTCATCTCCTTGTGCCATTAGTTATGGT
1867 529 .....
LGV2 529 GGC..T....A...T.G...C.....TAAG..C.AC..G.....A

SCALORBI 589 TACTCATCAGGGATTCCTAATGTTTGTTCATTGAGAACGGCTGTAAACAACACTGGAACA
1867 589 .....
LGV2 589 .....CG.....T.A...AGTC.A....CAGAA.T.TT..T..A...TTG

SCALORBI 649 GATCCTGTTACATTCTCTAAGAGTTGGTGGTATGGATAGTGGTGTGGTTGGGTAAT
1867 649 .....
LGV2 649 AC...GACA..G.AT..AT..C.T..A..C...T.A..A..C.....A.....T...

SCALORBI 709 GCTTTGGCAAATGGTGACTCAATTTTAGGAACACAGCAACATCAAATATATCGTTTTTA
1867 709 .....C.....
LGV2 709 ..CC.TT.T....CA.TGAT.....TA...AAT..T..T..G...T.....G

SCALORBI 769 GAAGTAAACAACAACAATGTTAATAAATATAAGCAACTTAATTAATATATTTTC
1867 769 .....
LGV2 769 ..G...T..CT.....C.C...AC...-T-----.-.-----

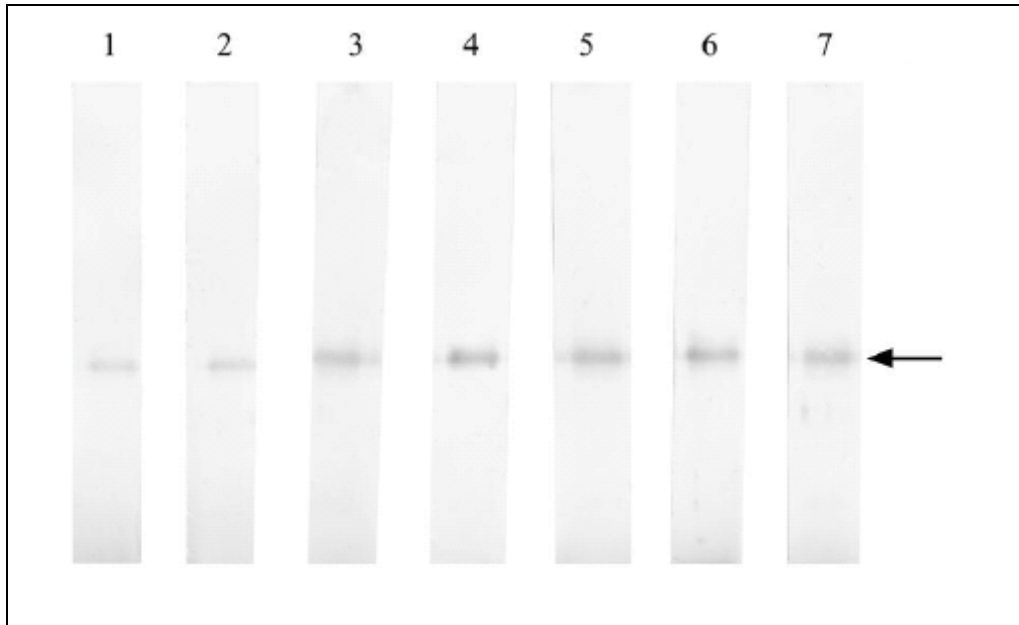
SCALORBI 829 GTTGATATTTTTTTTGTGGTTTTATATGAAAAATCATACGTCTATTTACTGGAGAGAT
1867 829 .....
LGV2 807 --.....-...C..ATA.....TT.G.G.AA.A.GT..G.A...G..GTTTG.

SCALORBI 889 TATGAATGATAAACAGAATATGACTAATGATTTTATCAAGATTGTAAAGATGTTGAAAA
1867 889 .....
LGV2 864 ...C.AA....AGC..AG...GGG.C.....T..A...T.....GA....

SCALORBI 949 AGATTTTCCAGAACTAGATATCAAATGAAAGTGCACAAGGAAAAAGTAACTTTC
1867 949 .....
LGV2 924 .....C..C...T...CC.A...ACG...AA.....

```

**Figura 6.** Allineamento della sequenza nucleotidica dell'*orf3* del pCP di Scalorbi (isolato umano) e 1867 (ceppo di piccione) rispetto l'*orf3* del pCT di LGV (L2).



**Figura 7.** Reattività dei sieri di 6 piccioni con infezione da *C. psittaci* (strisce 1-6) e di un siero di un paziente con psittacosi (striscia 7) nei confronti della proteina ricombinante pgp3 di pCP. La freccia indica la banda di 29.15 kDa riconosciuta dai sieri testati.

```

Scalorbi   1  MGNSGFYLNDTQNCVFADNIKLGQMESPLQDQQLILGKSTPTAAKLNAGEGLKIDISNT
1867      1  .....
L2        1  .....YN.....V...TE..K...I....T...V...MT.SD.ISLTV..N

Scalorbi  61  NAQSATIDFSIDADTSLKLLILDQIQKGLVDAIKIDITNSLIQEVIDRIISDKNLALTKAF
1867      61  .....
L2        61  PSTN.S.TIGL..EKAYQ...EKLGDQILGG.ADT.VD.TV.DIL.K.TT.PS.G.L...

Scalorbi  121  KNFSLSEKIQCNGLFTKSNIGTLLGGTEIGKFTITPDNVNSMFLISAGIIASRMENNVVL
1867      121  .....D.....
L2        121  N..PITN.....PR..E.....V..KSSG....V..D.....G...

Scalorbi  181  ALVREGDSSPCAIISYGYSSGIPNVCSLRTAVNNTGTDVTFSLRVGGMDSGVVWVNALAN
1867      181  .....
L2        181  .....K.Y.....V..L.....RII...LT.T.Y.....LE.....S.

Scalorbi  241  GDSILGTTATSNISFLEVKQQTNG
1867      241  .....
L2        241  .ND...I.N...V.....IP...A

```

**Figura 8.** Allineamento della sequenza aminoacidica della proteina pgp3 di *C. psittaci* (Scalorbi isolato umano e 1867 isolato da piccione) e *C. trachomatis* (sierotipo LGV2).

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Skerman V. B. D., McGowan V. & Sneath P. H. A. Approved list of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980; **30**: 225-420.
2. Grayston J. T. Chlamydia pneumoniae, strain TWAR. *Chest.* 1989; **95**: 664-669.
3. Grayston J. T., Kuo C. C., Campbell L. A., Wang S. P. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. Strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989; **39**: 88-90.
4. Fukushi H. & Hirai K. Chlamydia pecorum- the fourth species of genus Chlamydia. *Microbiol. Immunol.* 1993; **3707**: 515-522.
5. Everett K. D., Bush R. M. & Andersen A. A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; **49**: 415-440.
6. Batteiger B. E. The major outer membrane protein of a single *Chlamydia trachomatis* serovar posses more than one serovar-specific epitope. *Infect. Immun.* 1996; **64**: 542-547.
7. Moulder J. W., Hatch T. P., Kuo C. C., Schachter J., Storz J. Genus *Chlamydia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1984, vol.1, pp. 729-739. Edited by N. R. Krieg. Baltimore: Williams & Wilkins.
8. Denamur E., Sayada C., Souriau A., Orfila J., Rodolakis A. & Elion J. Restriction pattern of the major outer membrane protein gene provides evidence for homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Gen. Microbiol.* 1991; **137**: 2525-2530.
9. Jackson M., Giffard P. & Timmis P. Outer membrane protein A gene sequencing demonstrates the polyphyletic nature of koala *Chlamydia pecorum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 1997; **20**: 187-200.
10. Anderson I. E., Baxter S. I. F., Dunbar S., Rae A. G., Philips H. L., Clarkson M. J. & Herring A. J. Analysis of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; **46**: 245-251.
11. Everett K. D. & Andersen A. A. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; **47**: 461-473.
12. Kaltenboeck B. & Storz J. Biological properties and genetic analysis of the ompA locus

- in chlamydiae isolated from swine. *J. Vet. Res.* 1992; **53**: 1482-1487.
13. Kuo C.C., Jackson L. A., Campbell L. A. & Grayston J. T. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microbiol. Rev.* 1995; **8**: 451-461.
  14. Girjes A.A., Carrick F. N. & Lavin M. F. Remarkable sequence relatedness in the DNA encoding the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* (koala type I) and *Chlamydia pneumoniae*. *Gene.* 1994; **138**: 139-142.
  15. Wills J. M., Watson G., Lusher M., Mair T. S., Wood D. & Richmond S. J. Characterization of *Chlamydia psittaci* isolated from a horse. *Vet. Microbiol.* 1990; **24**: 11-19.
  16. Vanrompay D., Butaye P., Sayada C., Ducatelle R., & Haesebrouck F. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.* 1997; **148**: 327-333.
  17. Bush, R.M. and Everett, K.D.E. Molecular Evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001; **51**: 203 - 220.
  18. Zhang J. P. & Stephens R. S. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukariotic host cells. *Cell.* 1992; **69**: 861-869.
  19. Hackstadt T., Fisher E. R., Scidmore M. A., Rockey D.D. & Heizen R. A. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.* 1997; **5**: 288-293.
  20. van Ooij C., Apodaca G. & Engel J. Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infect. Immun.* 1997; **65**: 758-766.
  21. Taraska T., Ward D. M., Ajioka R. S., Wyrick P. B., Davis-Kaplan S. R., Davis C. H. & Kaplan J. The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host protein. *Infect. Immun.* 1996; **64**: 3713-3723.
  22. Cevenini R., La Placa M. Le Clamidie e le infezioni umane da Clamidie. In: Agg. Di Patol. Clinica, a cura di G. Cavallo et al., UTET Torino 1987, 220-234.
  23. Moulder J. W. The chlamydial inclusion membrane as an engine of survival. *Trends Microbiol.* 1997; **5**: 305-306.
  24. Moulder J. W. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 1991; **55**: 143-190.
  25. Moulder J. W.. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* 1985; **49**: 298-337.
  26. Barbour A. G., Amano K. L., Hackstadt T., Perry L. & Caldwell H. D. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J. Bacteriol.*

- 1982; **151**: 420-428.
27. Everett K. D. E. & Hatch T. P. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J. Bacteriol.* 1995; **177**: 877-882.
  28. Hatch T. P. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in Chlamydiae? *J. Bacteriol.* 1996; **178**: 1-5.
  29. Birkelund S. & Stephens R. S. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 1992; **174**: 2742-2747.
  30. Frost E. H., Deslandes S., Veilleux S. & Bourgaux-Ramoisy D. Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *J. Infect. Dis.* 1991; **163**: 1103-1107.
  31. Rodriguez P., Vekris A., De Barbeyrac B., Dutihl B., Bonnet J. & Bebear C. Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction endonuclease analysis of the amplified major outer membrane protein gene. *J. Clin. Microbiol.* 1991; **29**: 1132-1136.
  32. Sayada C., Denamur E., Orfila J., Catalan F. & Elion J. Rapid genotyping of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein by the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; **83**: 73-78.
  33. Denamur E., Sayada C., Andersen A. A., Rodolakis A., Eb F., Orfila J. & Elion J. Typing of *Chlamydia psittaci* strains by PCR-RFLP analysis of *omp1*, in "Proceedings of the Second Meeting of the European Society for Chlamydia Research", P. A. Mardh, M. La Placa, W Ward (ed.), Uppsala University Center for STD Research, 1992 Stockholm.
  34. Hartley JC., Kaye S., Stevenson S., Bennett J., and Ridgway G. PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. *J. Clin. Microbiol.* 2001; **39**: 3072-3079.
  35. Kaltenboeck B., Kousoulas K. G. & Storz J. Detection and strain differentiation of *Chlamydia psittaci* mediated by a two step polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991; **29**: 1969-1975.
  36. Kaltenboeck B., Kousoulas K. G. & Storz J. Two-Step polymerase chain reaction and restriction endonuclease analyses detect and differentiate *ompA* of *Chlamydia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30**: 1098-1104.
  37. Sayada C., Andersen A. A., Rodriguez P., Eb F., Milon A., Elion J. & Denamur E. Homogeneity of the major outer membrane protein gene of feline *Chlamydia psittaci*. *Res. Vet. Sci.* 1994; **56**: 116-118.
  38. Sayada C., Andersen A. A., Storey C., Milon A., Eb F., Hashimoto N., Hirai K., Elion J. & Denamur E. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate



- differentiation. *Res. Microbiol.* 1995; **146**: 155-165.
39. Baghian A., Shaffer L. & Storz J. Antibody response to epitopes of chlamydial major outer membrane proteins on infectious elementary bodies and of the reproduced polyacrylamide gel electrophoresis-separated form. *Infect. Immun.* 1990; **58**: 1379-1383.
  40. Yuan Y., Zhang Y. X., Watkins N. G. & Caldwell H. D. Nucleotide and deduced amino acid sequence for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. *Infect. Immun.* 1988; **57**: 1040-1049.
  41. Fukushi H. & Hirai K. Genetic diversity of avian and mammalian *Chlamydia psittaci* strains and relation to host origin. *J. Bacteriol.* 1989; **171**: 2850-2855.
  42. Campbell L.A., Kuo C. C. & Grayston J. T. Characterization of the new Chlamydia agent TAWR as a unique organism by restriction endonuclease analysis and DNA-DNA hybridization. *J. Clin. Microbio.* 1987; **25**: 1911-1916.
  43. Lovett M., Kuo K. K., Holmes K. & Falkow S. Plasmids of the genus *Chlamydia*. In: Current Chemotherapy and Infectious Disease. 1980, vol. 2, pp. 1250-1252. Edited by J. Nelson & C. Grassi. Washington, DC: American Society for Microbiology.
  44. Richmond S. J., Stirling P. & Ashley C. R. Virus infecting the reticulate bodies of the avian strain of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1982; **14**: 31-36.
  45. Joseph T., Nano F. E., Garon C. F. & Caldwell H. D. Molecular characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* plasmids. *Infect. Immun.* 1986; **51**: 699-703.
  46. Palmer L. & Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986; **16**: 52-62.
  47. Mc Clenaghan M., Honeycombe J. R., Bevan B. J. & Herring A. J. Distribution of plasmid sequences in avian and mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *J. of Gen. Microbiol.* 1988; **134**: 559-565.
  48. Lusher M., Storey C. C. & Richmond S. J. Plasmid diversity within the genus *Chlamydia*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; **135**: 1145-1151.
  49. Lusher M., Storey C. C. & Richmond S. J. Extrachromosomal elements of the genus *Chlamydia*. *Adv. Gene Technol.* 1991; **2**: 261-285.
  50. Sriprakash K. S. & Mac Avoy E. S., Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1987; **18**: 205-214.
  51. Comanducci M. M., Ricci S. & Ratti G. The structure of a plasmid of *Chlamydia trachomatis* believed to be required for growth within mammalian cells. *Mol. Microbiol.* 1988; **2**: 531-538.
  52. Comanducci M. M., Ricci S., Cevenini R. & Ratti G. Diversity of the *Chlamydia*

- trachomatis* common plasmid in biovar with different pathogenicity. *Plasmid* 1990; **23**: 149-154.
53. Black C. M., Barnes R. C., Birkness K A., Holloway B. P. & Mayer L. W. Nucleotide sequence of the common plasmid of *Chlamydia trachomatis* L2: use of compatible deletion to generating overlapping fragments. *Curr. Microbiol.* 1989; **19**: 67-74.
54. Hatt C., Ward M. E. & McCl Clarke I. N. Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. *Nucl. Acids Res.* 1988; **16**: 4053-4067.
55. Thomas N. S., Lushe M., Storey C.C. & Clarke I. N. Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology.* 1997; **143**: 1847-1854.
56. Comanducci M. M., Cevenini R., Moroni A., Giuliani M. M., Ricci S., Scarlato V. & Ratti G. Expression of a plasmid gene of *C. trachomatis* encoding a novel 28 kDa antigen. *J Gen. Microbiol.* 1993; **139**: 1083-1092.
57. Comanducci M. M., Manetti R., Bini L., Santucci A., Pallini V., Cevenini R., Suer J. M., Orfila j. & Ratti G. Humoral response to plasmid protein pgp3 in patient with *C. trachomatis* infection. *Infect Immun.* 1994; **62**: 5491-5497.
58. Farencena A., Comanducci M. M., Donati M., Ratti G. & Cevenini R. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. *Infect. Immun.* 1997; **65**: 2965-2969.
59. Miyashita N., Matsumoto A., Fukano H., Niki Y., and Matsushima T. The 7.5-kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. *J. Infect. Chemother.* 2001; **7**: 113-6.
60. Nurminen M., Leinonen M., Saikku P. & Makela P. H. The genus-specific antigen of *Chlamydia*: resemblance to the lipopolysaccharide of the enteric bacteria. *Science.* 1983; **220**: 1279-1281.
61. Caldwell H. D. & Schachter J. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia*. spp. *Infect. Immun.* 1982; **35**: 1024-1031.
62. Fan J. & Stephens R. S. Antigen conformation dependence of *Chlamydia thachomatis* infectivity neutralization. *J. Infect. Dis.* 1997; **176**: 713-721.
63. Zhang Y. X., Stewart S., Joseph T., Taylor H. R. & Caldwell H. D. Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protei of *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 1987; **138**: 575-581.
64. Stephens R. S., Wagar E. A. & Schoolnik G. K. High-resolution mapping of serovar-specific and common antigenic determinants of the major outer membrane protein of

- Chlamydia trachomatis*. *J. Exp. Med.* 1988; **167**: 817.
65. Newhall W. J., Batteiger B. & Jones R. B. Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 1982; **38**: 1181-1189.
66. Eckert L. O., Hawes S. E., Wolner-Hanssen P., Money D. M., Peeling R. W., Brunham R. C., et al. Prevalence and correlates of antibody to chlamydial heat shock protein in women attending sexually transmitted disease clinics and women with confirmed pelvic inflammatory disease. *J. Infect. Dis.* 1997; **175**: 1453-1458.
67. Center for Disease Control and Prevention. *Chlamydia trachomatis* genital infections. United States, 1995. *JAMA* 1997; **277**, 952-953.
68. Zenilman J. M. Ethnicity and sexually transmitted infections. *Curr. Op. in Inf. Dis.* 1998; **11**: 47-52.
69. Bobo L., Novak N., Mkocha H., Vitale S., West S. & Quinn T. C. Evidence for a predominant proinflammatory conjunctival cytokine response in individuals with trachoma. *Infect. Immun.* 1996; **64**: 3273-3279.
70. Dawson C. R., Jones B. R. & Tarizzo M. L. Guide to trachoma control. W. H. O. 1981, Geneva.
71. Viswalingam N. D., Wishart M. S. & Woodland R. M. Adult chlamydial ophtalmia (Paratrachoma). *BR. Med. Bull.* 1983; **39**: 123-127.
72. Mussa FF., Chai H., Wang X., Yao Q., Lumsden AB., Chen C. *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease: an update. *J. Vasc. Surg.* 2006; **43** 1301-7.
73. Heddema ER., van Hannen EJ., Duim B., de Jong BM., Kaan JA., van Kessel R., Lumeij JT., Visser CE., Vandenbroucke-Grauls CM. An outbreak of psittacosis due to *C. psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *J. Med. Microbiol.* 2006; **55**: 1571-5.
74. Jorgensen, D.M., 1997. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. *Emerg. Infect Dis.* **3**: 191-194
75. Villemonteix, P., Agius, G., Ducroz, B., Rouffineau, J., Plocoste, V., Castets, M. and Magnin, G.,. Pregnancy complicated by severe *Chlamydia psittaci* infection acquired from a goat flock: case report. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1990; **37**: 91-94]
76. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 1998; **47**, (RR-1);1 - 118
77. Ridgway, G. L. Treatment of chlamydial genital infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1997; **40**, 311 - 314
78. Ridgway, G. L. (2000). Treatment of *Chlamydia trachomatis* infections. Pages 387-390. In: Proceedings of the Fourth Meeting of the European Society for Chlamydial Research

(Saikku, P. ed), pub Editrice Esculapio, Bologna, Italy. ISBN 88-86524-41-2.

79. Peeling RW & Brunham RC. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. *Emerg Infect Dis* 1996; **2**: 307-319.
80. Cates W, Rolf RT, Aral SO. Sexually transmitted diseases, pelvic inflammatory disease and infertility: an epidemiologic update. *Epidem Rev* 1990; **12**: 199-220.
81. Cevenini R, Donati M, Sambri V, Rumpianesi F, La Placa M. Reactivity of elementary and reticulate bodies of *C. trachomatis* LGV2 with monoclonal antibodies specific for the major outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett* 1987; **42**: 47-51.
82. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London) 1970; **227**:680-685.
83. Towbin, H. T., T. Staehlin, and J. Gordon.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1979; **76**: 4350-4354
84. Batteiger, B., W. J. Newhall, and R. B. Jones.. The use of Tween 20 as blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membrane. *J. Immunol. Methods*. 1982; **56**:168-175.
85. Bas S., Muzzin P., Ninet B., Bornand JE., Scieux C. & Vischer TL. Chlamydial serology : comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using differnet recombinat proteins as antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2001a; **39**: 1368-1377.
86. Bas S., Muzzin P. & Vischer TL. *Chlamydia trachomatis* serology: value of outer membrane protein 2 compared with other antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2001b; **39**: 4082-4085.
87. Donati M., Sambri V., Comanducci M., Di Leo K., Storni E., Giacani L., Ratti G. & Cevenini R. DNA immunization with *pgp3* gene of *Chlamydia trachomatis* inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3h/HeN mice. *Vaccine*. 2003; **21**; 1089-1093.
88. Peterson EM., Markoff BA., Schachter J & de La Maza LM. The 7.5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid* 1990; **23**: 144-148.
89. Timms P., Eaves FW., Hugall F. & Lavin MF. Plasmid of *Chlamydia psittaci*: cloning and comparison of isolate by southern hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988; **51**; 119-124.