



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI URBINO "CARLO BO"
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare, Sanitaria e della Nutrizione LM-6

**Confronto di metodiche analitiche,
immunocromatografiche e biomolecolari,
per la determinazione di *Chlamydia trachomatis*
in campioni biologici**

Relatore: Chiar.mo Prof.
GIORGIO BRANDI

Tesi di Laurea di:
ANGELA SERAFINI

Co-relatore: Chiar.ma Dott.ssa
CINZIA MEI

Anno Accademico: 2017-2018

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 Le infezioni sessualmente trasmissibili	1
1.2 Le clamidie: classificazione	3
1.3 Chlamydia trachomatis: morfologia e ciclo replicativo	
1.4 Il genoma	6
1.5 Modalità di trasmissione, fattori di rischio e sintomatologia	7
1.6 Manifestazioni cliniche e complicanze	8
1.7 Patogenesi	11
1.8 Diagnosi	13
1.9 Terapia e prevenzione	16
1.10 Epidemiologia	17
2 SCOPO DELLA TESI	19
3 MATERIALI E METODI	21
3.1 Analisi biomolecolare	21
3.2 Fase pre analitica: prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	22
3.3 Caratteristiche del QIA Symphony SP	23
3.4 Estrazione e purificazione del DNA	24
3.5 Purificazione automatizzata sul sistema QIA Symphony SP	25
3.6 Funzionamento integrato con il modulo QIA Symphony AS	28
3.7 Kit artus CT/NG RGQ	29
3.7.1 Sensibilità, specificità e limite di rilevamento analitico (LOD) del kit	29
3.7.2 Contenuto del kit e conservazione dei reagenti	30

3.8 Amplificazione del DNA batterico: principio della Real-Time PCR	31
3.8.1 Rotor-Gene Q	
3.9 RT-PCR sul Rotor-Gene Q Mdx-5plex HRM	33
3.9.1 Interpretazione dei risultati	34
3.10 Analisi immunocromatografica	37
3.10.1 Principio della metodica	37
3.10.2 Raccolta e preparazione dei campioni	38
3.10.3 Reagenti e materiali	38
3.10.4 Indicazioni d'uso per i campioni maschili di urina	39
3.10.5 Indicazioni d'uso per i campioni maschili di liquido seminali	40
3.10.6 Interpretazione dei risultati	41
4. RISULTATI	42
4.1 Correlazione tra le metodiche	42
4.2 Prevalenza dell'infezione nel campione	44
4.4 Associazione di Chlamydia trachomatis con altre infezioni delle vie genitali maschili	45
5. DISCUSSIONE	47
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	53

1.INTRODUZIONE

1.1 Le infezioni sessualmente trasmissibili

Le infezioni sessualmente trasmissibili (IST) comprendono un gruppo di malattie, aventi una diversa eziologia infettiva, che si contraggono attraverso qualsiasi tipo di rapporto sessuale (vaginale, anale, orale), per contatto diretto con i liquidi organici infetti, attraverso il sangue (ad esempio per mezzo di trasfusioni), con trapianti di tessuto o di organo ed infine, per passaggio diretto dalla madre al feto o al neonato durante la gravidanza, il parto o l'allattamento. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad oggi si conoscono circa 30 diversi patogeni in grado di provocare ITS, i principali, tra i batteri, sono: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Ureaplasma Urealyticum*, tra i virus figurano l'HIV e l'HPV, mentre tra i protozoi e i funghi vi sono rispettivamente *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*. Sicuramente popolazioni caratterizzate da precarie condizioni igienico sanitarie e socio-economiche sono più a rischio di sviluppare queste infezioni, così come gli adolescenti, in particolare le ragazze per via della struttura anatomica dell'apparato genitale, più complessa e più favorevole all'insediamento di patogeni. Anche il mancato utilizzo di contraccettivi barriera quali il preservativo rende i giovani più esposti al rischio di entrare in contatto con questi patogeni [1, 2]. Le ITS sono divenute un importante problema di sanità pubblica infatti il numero di nuovi casi aumenta progressivamente, interessando ogni anni milioni di individui. In Italia sono attive due sorveglianze sentinella, una basata su centri clinici attiva dal 1991 (segnala tutte le persone con una diagnosi confermata di IST) e una basata su laboratori di microbiologia clinica attiva dal 2009 (segnala le persone che si sottopongono a test di laboratorio per *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Neisseria gonorrhoeae*), entrambe coordinate dal Centro Operativo AIDS (COA) dell'Istituto Superiore di Sanità. Nel periodo 1° gennaio 1991 al 31 dicembre 2015, il sistema di sorveglianza ha segnalato un totale di 115.207 nuovi casi di IST: il 70,6% è stato diagnosticato in uomini ed il 29,4% in donne, tuttavia nel periodo 2011-2015 si è verificato un incremento dei casi di ITS in entrambi i sessi (Figura 1) e dall'inizio della sorveglianza si è registrato un raddoppio dei casi annui di ITS in soggetti stranieri [3].

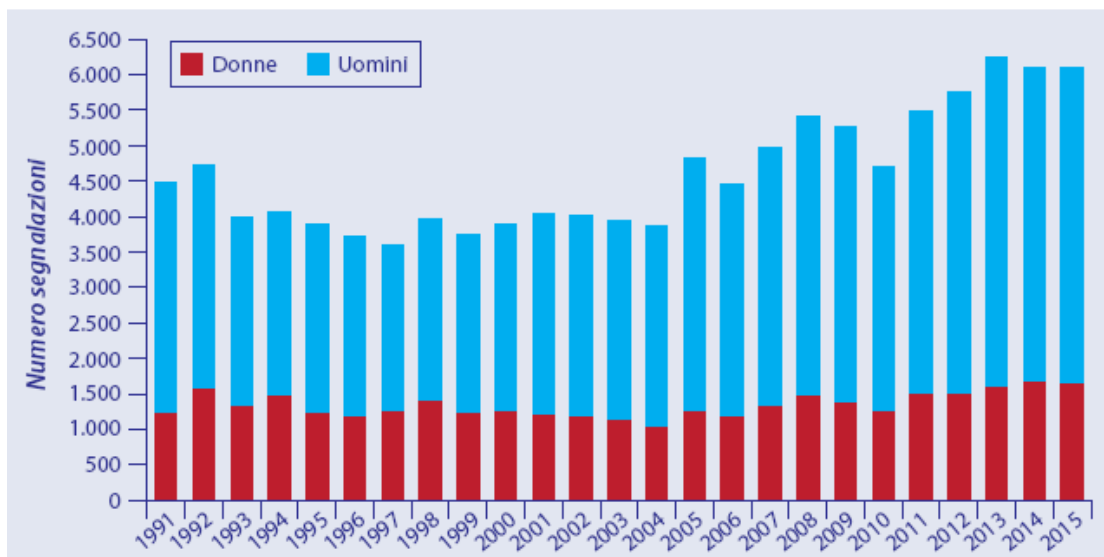


Figura 1. Andamento delle segnalazioni di IST per genere (Sistema di sorveglianza sentinella delle IST basato su centri clinici, 1991-2015).

Le ITS possono essere asintomatiche o manifestarsi in forma acuta e pur essendo nella maggior parte dei casi curabili, se non trattate adeguatamente e tempestivamente possono avere conseguenze gravi come la comparsa di neoplasie o la sterilità, quindi è importante incrementare le attività di informazione sulle stesse, favorire una diagnosi precoce e la prevenzione attraverso la vaccinazione, qualora sia possibile come nel caso di HPV e di epatite B, ed anche attraverso una adeguata educazione sessuale [1]

1.2 Le clamidie: classificazione

Le clamidie rappresentano un gruppo di parassiti intracellulari obbligati Gram negativi, hanno dimensioni ridotte, una caratteristica forma coccoide e sono in grado di moltiplicarsi esclusivamente all'interno dei vacuoli di endocitosi delle cellule ospiti, infatti per via di queste caratteristiche unite all'incapacità di crescere in terreni acellulari, inizialmente vennero classificate come virus. Successivamente la scoperta della loro moltiplicazione per scissione binaria e l'avvento delle tecniche di microscopia elettronica, hanno permesso di definire che le clamidie sono a tutti gli effetti dei batteri, pertanto, sono dotati di DNA, RNA, ribosomi, di una membrana tipica dei batteri, possiedono un'autonoma sintesi proteica e presentano, inoltre, sensibilità ad alcuni antibiotici [4].

Le clamidie appartengono al regno dei *Bacteria*, phylum *Chlamydiae*, ordine *Chlamydiales*, famiglia *Chlamydiaceae* e genere *Chlamydia*. Le clamidie parassite dei vertebrati sono classificate in quattro specie: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia pecorum*. *Chlamydia trachomatis* e *Chlamydia pneumoniae* sono patogeni caratteristici della specie umana mentre *Chlamydia psittaci* causa patologie in diverse specie di uccelli e mammiferi, con possibile contagio anche dell'uomo per zoonosi, invece *Chlamydia pecorum* infetta esclusivamente gli animali (ovini e bovini) [5].

In particolare *Chlamydia trachomatis* è considerata la più rilevante in patologia umana, il suo spettro d'ospite è rappresentato esclusivamente dall'uomo ed infetta le cellule delle mucose. E' suddivisa in 2 biotipi, 3 sierogruppi e 19 sierotipi che presentano differenti potenzialità patogene, la suddivisione in differenti sierotipi dipende dalla specificità antigenica della proteina maggiore della membrana esterna (MOMP) codificata dal gene *omp1* [5,6]. Le specificità antigeniche caratteristiche delle clamidie e responsabili dell'interazione ospite-parassita e quindi di interazioni con il sistema immunitario dell'ospite, oltre che dalla MOMP sono rappresentate da LPS, dalle proteine di membrana ricche in cisterna (CRP), da proteine termo shock (hsp) e da una lipoproteina di 29 kDa (MIP) che stimola la produzione di anticorpi dotati di attività neutralizzante [7, 8].

1.3 *Chlamydia trachomatis*: morfologia e ciclo replicativo

Chlamydia trachomatis si moltiplica all'interno di cellule eucariotiche seguendo un ciclo replicativo dimorfico e sulla base di questo possono essere distinte due forme microbiche: il corpo elementare (CE) ed il corpo reticolare (CR). Il CE rappresenta la forma infettante, ha dimensioni ridotte (200-300 nm di diametro), è denso, sferico, metabolicamente inerte ed è in grado di resistere all'ambiente extracellulare ostile e penetrando per endocitosi all'interno della cellula ospite da avvio al processo replicativo. Il CR presenta dimensioni maggiori rispetto al CE (800-1000 nm di diametro), il citoplasma è ricco in ribosomi e l'acido nucleico è denso e fibrillare, inoltre ha potere replicativo ed è attivo metabolicamente [9]. Il CR ha origine dalla progressiva disidratazione del CE, subito dopo la sua penetrazione nel vacuolo per endocitosi, e rappresentando la forma attiva metabolicamente è in grado di dividersi per scissione binaria all'interno della cellula ospite. All'interno di quest'ultima viene mantenuto vitale e successivamente, al termine del ciclo replicativo, attraverso una progressiva disidratazione e condensazione si trasforma in CE. *Chlamydia trachomatis* presenta una membrana interna ed una membrana esterna, in quest'ultima è presente la componente lipopolisaccaridica (endotossina o LPS) tipica dei batteri Gram negativi ma non è riscontrabile il peptidoglicano, la cui funzione viene esplicata da un complesso proteico costituito da: MOMP, da una proteina idrofila di 60 kDa ricca in cisteina e da una lipoproteina a basso peso molecolare anch'essa ricca in cisteina (CRP, Cysteine-Rich Protein). Tra queste proteine di superficie sono presenti numerosi ponti disolfuro che contribuiscono a mantenerle strettamente interconnesse nel CE garantendo la caratteristica rigidità di questo elemento, successivamente nel passaggio da CE a CR si assiste alla parziale riduzione di questi legami e alla conseguente idratazione. MOMP, ha un peso molecolare di 40 kDa, rappresenta la principale proteina di membrana esterna e costituisce il 60% delle proteine esterne di membrana. MOMP viene riconosciuta da anticorpi monoclonali ed è scindibile attraverso un trattamento con tripsina. Questa proteina oltre ad avere un ruolo strutturale fondamentale, partecipa al mantenimento della stabilità osmotica extracellulare del CE mentre nel CR svolge funzioni di porina in quanto regola i processi di assorbimento di sostanze nutritive e ATP ed inoltre si comporta come una potenziale citoadesina promuovendo le interazioni non specifiche con le cellule dell'ospite. In questo modo *Chlamydia trachomatis* evita la fusione tra fagosoma e lisosoma e riesce a sopravvivere all'interno della cellula infettata [10]. Nelle interazioni con la cellula ospite intervengono anche altre proteine denominate Inc, organizzate in strutture fibrillari, si proiettano dall'inclusione al nucleo e all'intero del citoplasma della cellula infetta, ed in questo modo interagendo con alcune chinasi cellulari, modificano le funzioni di segnale, inibiscono il legame tra

lisosomi, endosoma e inclusione e modulano il ciclo cellulare. Il ciclo replicativo ha una durata superiore alle 48 ore ed inizia con l'attacco del CE, mediato da un insieme di legami deboli tra la componente glucanica del MOMP e la superficie cellulare della cellula ospite. Successivamente si verifica la penetrazione per endocitosi e la trasformazione del CE in CR, quest'ultimo inizia a sintetizzare le proteine Inc, che inibiscono la fusione dei lisosomi alle vescicole endosomiali, e va incontro ad una divisione per scissione binaria; l'endosoma progressivamente si ingrandisce e si fonde con altri endosomi portando alla formazione di una microcolonia di clamide che vanno a costituire una grossa ed unica inclusione citoplasmatica. Intorno alla ventiquattresima ora del ciclo replicativo si assiste alla condensazione e disidratazione dei CR e alla successiva formazione di CE. Infine, nella fase terminale del ciclo attraverso un processo di endocitosi inversa si verifica la liberazione di 100-1000 CE infettanti per cellula. E' anche possibile che si instaurino infezioni persistenti (Figura 2) [11].

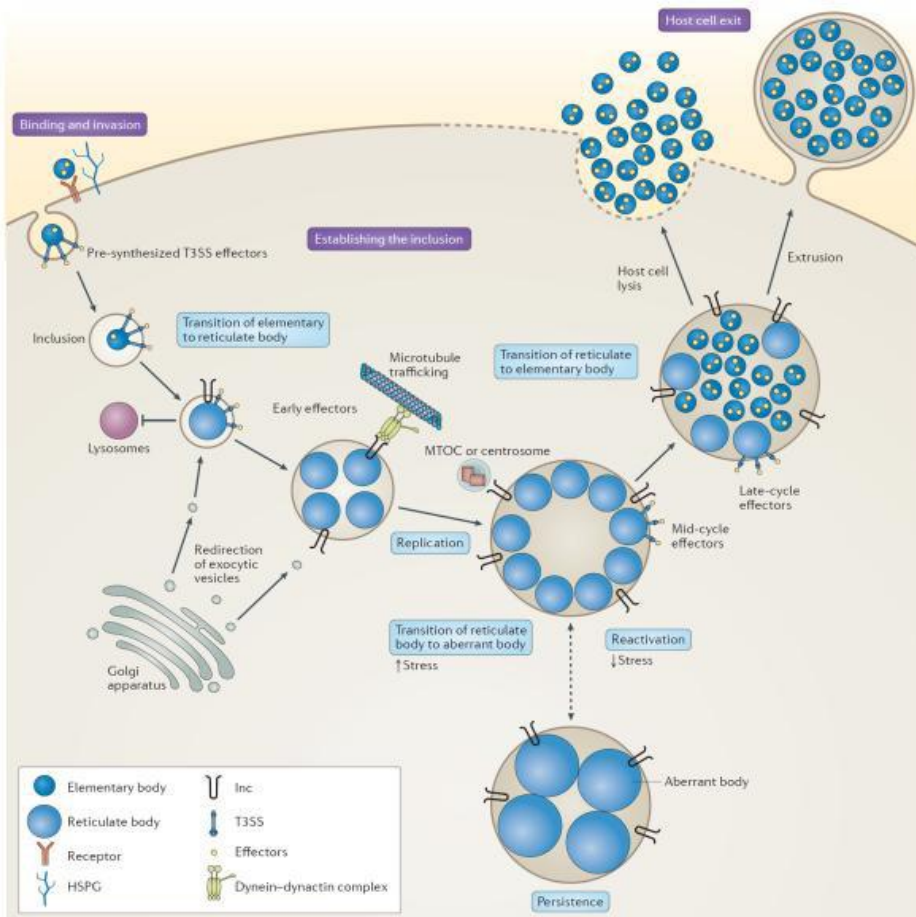


Figura 2. Ciclo replicativo di *Chlamydia Trachomatis*.

1.4 Il genoma

Il materiale genetico di *Chlamydia trachomatis* è formato da DNA genomico circolare di 1.042.519 bp (58.7% A-T) che codifica per 875 proteine. Attraverso la ricerca di similarità è stato possibile definire la funzione di 604 proteine codificate, mentre 35 risultavano simili a proteine già depositate nei database a partire da altri batteri e le restanti 255 non presentavano similarità con proteine depositate su GeneBank [12]. E' stata riscontrata la presenza di geni coinvolti nel controllo delle vie metaboliche, idonee alla produzione di ATP, oltre che di geni coinvolti nella sintesi del peptidoglicano ed è stato possibile definire che le clamidie differiscono da gli altri batteri anche per via di un diverso livello di espressione di alcuni geni [13]. In *Chlamydia trachomatis* è anche presente un plasmide criptico di 7,5 kpb, che comprende 8 principali ORF (Open Reading Frame) e quattro ripetizioni in tandem da 22 bp, che ha rivelato una notevole conservazione della sequenza (> 60%) presupponendo che sia importante nella crescita batterica e nella patogenesi dell'infezione, nonostante la sua precisa funzione biologica non sia stata ancora chiarita [14]. Il plasmide, inoltre, rappresenta il bersaglio principale nella diagnosi di infezione mediante metodi molecolari e talvolta viene perso in alcuni ceppi pertanto quest'ultimi non possono essere rilevati mediante metodi molecolari. Tuttavia non sono state riscontrate differenze significative nella sensibilità agli antibiotici tra i ceppi contenenti plasmide e ceppi privi di plasmide, un fenotipo caratteristico identificato nei ceppi di *Chlamydia trachomatis* privi di plasmide è la loro incapacità di accumulare glicogeno nell'inclusione anche se non è nota l'implicazione di questa caratteristica nella patogenesi dell'infezione. [15, 16]. Questo plasmide comunque non è essenziale per la crescita di *Chlamydia trachomatis* [17].

1.5 Modalità di trasmissione, fattori di rischio e sintomatologia

Chlamydia trachomatis si trasmette, per mezzo delle secrezioni genitali, attraverso rapporti sessuali vaginali, anali o orali. Se uno dei due partner è infetto la probabilità di trasmissione all'altro sono pari al 20% e, se l'infezione non è adeguatamente trattata, l'infettività può durare fino ad un anno. L'infezione può anche essere trasmessa per via verticale dalla madre al figlio al momento del parto, causando al neonato infiammazioni a carico degli occhi o dell'apparato respiratorio [18]. I soggetti più a rischio di contrarre l'infezione sono coloro che hanno comportamenti sessuali a rischio come i giovani adulti sessualmente attivi, di età compresa tra i 15 e 24 anni, individui omosessuali, individui che tendono a cambiare frequentemente partner o che hanno partner multipli, altri fattori di rischio sono rappresentati, dal mancato uso di contraccettivi barriera, da un'anamnesi positiva per altre malattie sessualmente trasmissibili e dall'utilizzo di contraccettivi orali che spesso riducono il ricorso al preservativo il quale riduce notevolmente il rischio di contrarre l'infezione [19, 20]. Inoltre è importante considerare anche la sensibilità biologica di alcuni soggetti, come le donne, che hanno un apparato genitale più complesso ed esteso nel quale i patogeni hanno una probabilità maggiore di stabilirsi e gli adolescenti, che hanno tessuti genitali ancora immaturi e più recettivi ai patogeni oppure gli individui portatori di stati di grave immunodeficienza.

Nella maggioranza dei soggetti infettati l'infezione è asintomatica, precisamente nel 70% delle donne e nel 50% degli uomini [21]. Gli eventuali sintomi associati all'infezione di *Chlamydia trachomatis* compaiono una-tre settimane dopo avere avuto rapporti sessuali non protetti con una persona infetta e nell'uomo comprendono: dolore durante la minzione, prurito uretrale, perdite uretrali, ingrossamento e dolore ai testicoli. Mentre nelle donne, l'infezione interessa la cervice e l'uretra, pertanto i sintomi caratteristici sono rappresentati da perdite vaginali, sanguinamento intermestruale, dolore durante la minzione, dolore durante o dopo i rapporti sessuali, dolore nella parte inferiore dell'addome e perdite vaginali anomale. Se trasmessa attraverso un rapporto anale, *Chlamydia trachomatis* può causare proctite che negli uomini è più frequente tra i maschi omosessuali. Invece, se trasmessa attraverso un rapporto orale, può infettare la gola [22].

1.6 Manifestazioni cliniche e complicanze

Le manifestazioni cliniche di *Chlamydia trachomatis* dipendono strettamente dal sierotipo responsabile dell'infezione [23].

I sierotipi A, B, Ba e C sono responsabili del tracoma, una grave cheratocongiuntivite cronica che rappresenta la principale causa di cecità di origine infettiva. Il tracoma si verifica frequentemente in aree geografiche caratterizzate da carenti condizioni igieniche e scarsità di acqua potabile, infatti risulta essere endemico in alcune zone dell'Africa, del Medio Oriente, dell'India, del Sud-Est asiatico e del Sud America [24]; in queste aree l'infezione colpisce quasi tutti i bambini nei primi due anni di vita e si trasmette direttamente (da persona a persona) attraverso secrezioni oculari infette oppure indirettamente, in seguito a contatto con materiale contaminato [25]. Anche le mosche che si nutrono di secrezioni oculari possono trasmettere la malattia. L'infezione può portare a cicatrici della congiuntiva tarsale, ipertrofia follicolare, inversione delle ciglia (trichiasi) e opacità corneale con conseguente cecità (Figura 3) [26].



Figura 3. Manifestazione clinica e classificazione del tracoma secondo l'OMS.

A Infiammazione a livello follicolare. B Infiammazione intensa. C Comparsa di cicatrici palpebrali. D Trichiasi. E Opacità corneale.

I sierotipi B e Ba, insieme ai D-K sono anche responsabili, di una forma più blanda di congiuntivite follicolare monolaterale, la congiuntivite da inclusioni o paratrachoma, la cui trasmissione avviene attraverso il contatto con secrezioni genitali contaminate che sono responsabili anche di infezioni oculari cui i neonati possono andare incontro durante l'attraversamento di canali di parto infetti (congiuntivite neonatale); in caso di infezione nei neonati, intorno alla seconda settimana dalla nascita, si può verificare anche polmonite (polmonite neonatale) [27].

I sierotipi D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja, K, sono i più diffusi nei Paesi industrializzati e sono responsabili di infezioni genitali trasmesse sessualmente che nell'uomo, generalmente, si manifestano come uretriti non gonococciche. Nei soggetti omosessuali si può verificare proctite [28]. Occasionalmente l'infezione si può causare prostatite o epididimite, la quale può determinare un'importante riduzione della fertilità, dovuta alla permanenza di una condizione di oligospermia o azospermia anche in seguito al trattamento con antimicrobici [29, 30]. In generale, le infezioni da *Chlamydia trachomatis* possono influire negativamente sulla fertilità maschile danneggiando direttamente lo sperma, poiché i parametri relativi allo sperma, la proporzione della frammentazione del DNA e la capacità di effettuare reazione acrosomiale sono compromesse nel caso di questa infezione. È stato anche segnalato un effetto dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* maschile sulla fertilità della partner femminile [31].

Nella donna si può verificare una condizione nota come malattia infiammatoria pelvica (PID) che può portare a sterilità o predisporre a una gravidanza ectopica [32].

Raramente, in entrambi i sessi si può verificare la comparsa della sindrome di Reiter caratterizzata dalla presenza di tre processi infiammatori: artrite, congiuntivite e uretrite/ cervicite [33].

L'insorgenza di questi tre processi infiammatori è legata ad un'infezione batterica, seguita da un improvviso malfunzionamento del sistema immunitario ed inoltre secondo alcuni ricercatori vi è un fattore predisponente rappresentato dalla positività al gene HLA-B27 [34, 35]. Il corso della malattia è spesso imprevedibile. Frequentemente a periodi asintomatici si associano periodi di esacerbazione ed inoltre non è rara la cronicizzazione con un decorso clinico progressivo [36].

I sierotipi L1, L2, L2a, L3 essendo in grado di invadere il sistema linfatico possono divenire responsabili del linfogranuloma sia oculare (congiuntivite oculo-ghiandolare di Parinaud) sia genitale (linfogranuloma venereo) [37]. La forma genitale porta alla formazione di una lesione primaria che si manifesta sotto forma di una piccola papula indolore, pustola, erosione superficiale o ulcera erpetiforme in corrispondenza del sito di ingresso dell'agente patogeno. Generalmente questa lesione cutanea passa inosservata e guarisce spontaneamente. Tuttavia la lesione primaria può evolvere in una lesione secondaria, questo secondo stadio inizia dopo 2-4 settimane e nei maschi si manifesta

con un ingrandimento bilaterale dei linfonodi inguinali che tendono a formare masse di grandi dimensioni, soffici e fluttuanti che aderiscono ai tessuti profondi causando una infiammazione della cute sovrastante; i linfonodi inguinali possono andare incontro a seppurazione e rottura. I sintomi sistemici, quale febbre, brividi, malessere, mialgie e artralgie, possono presentarsi durante questa seconda fase della malattia. Nelle donne, la lesione iniziale, può presentarsi al livello cervicale o presso la porzione vaginale alta, esitando nell'aumento delle dimensioni e nell'infiammazione dei linfatici pelvici e perirettali. Vi è anche una forma terziaria caratterizzata da fistolizzazioni, restringimenti, stenosi rettali ed esiti cicatriziali [38, 39]. L'infiammazione persistente è causata da un'infezione non trattata che ostruisce i vasi linfatici, causando gonfiore e piaghe della pelle. Il linfogranuloma venereo in passato risultava sostanzialmente diffuso in aree quali: Africa, India e Sud America ma attualmente risulta essere progressivamente in aumento anche in Europa [40]. Esiste anche una correlazione tra *Chlamydia trachomatis* e HIV, infatti le persone con *Chlamydia trachomatis* rischiano 6 volte di più di essere contagiate dall'infezione da HIV durante un rapporto non protetto con una persona sieropositiva. La possibile interrelazione tra infezione da HIV e *Chlamydia trachomatis* include la patogenesi intracellulare invasiva di *Chlamydia trachomatis* che può causare un danno sostanziale allo strato epiteliale genitale facilitando in questo modo l'infezione da HIV, allo stesso tempo i cambiamenti immunologici dovuti all'infezione da HIV possono favorire l'infezione da *Chlamydia trachomatis* [41, 42].

1.7 Patogenesi

Chlamydia trachomatis è un potente immunogeno, che stimola risposte immunitarie sia umorali che cellulo-mediate. Oltre agli antigeni immunogenici, l'esito dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* dipende dall'equilibrio delle citochine secrete dai linfociti attivati. L'interferone gamma (IFN- γ) rappresenta la citochina più importante nella difesa dell'ospite contro *Chlamydia trachomatis*, mentre la suscettibilità alla malattia è collegata con l'espressione dell'interleuchina 10 (IL-10) [43]. L'infezione determinata da *Chlamydia trachomatis* può rappresentare un'infezione primaria oppure una recidiva o infezione cronica.

Durante l'infezione primaria si osserva un'infezione a carico delle mucose. Precisamente le cellule epiteliali dannose e infette secernono numerose chemochine pro-infiammatorie e citochine, tra cui IL-1, IL-6, IL-8, fattore stimolante le colonie dei macrofagi e dei granulociti (GM-CSF), e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) [44]. Le citochine rilasciate causano vasodilatazione, aumento della permeabilità endoteliale, attivazione e afflusso di neutrofili, monociti e linfociti T ed elevata espressione di molecole con funzione di adesione. I neutrofili, nello specifico, sembrano avere un ruolo limitante la diffusione di *Chlamydia trachomatis* e all'interno del tratto genitale femminile. Durante lo stesso periodo, *Chlamydia trachomatis* passa attraverso i vasi linfatici ai linfonodi locali. Le cellule epiteliali in decomposizione rilasciano alcuni corpi elementari che sono fagocitati da neutrofili attraverso i fagolisosomi [45]. I linfociti T principalmente le cellule T helper (Th1) svolgono un ruolo importante durante la fase iniziale dell'infezione, infatti secernono IFN- γ , aumentano l'azione dei vari fagociti per distruggere il patogeno e stimolano la secrezione di altre citochine, tra cui IL-1. Quest'ultimo a sua volta, stimolando la secrezione di IL-2 da parte delle cellule Th1 causa una maggiore replicazione dei linfociti citotossici e delle cellule NK. Nella neutralizzazione dell'infezione primaria intervengono anche le IgA secretorie [46].

Le infezioni croniche, re infezioni o infezioni ricorrenti sono le più pericolose in quanto molto spesso sono associate a complicanze. Queste infezioni croniche possono essere causate da una mancanza di trattamento o da una gestione terapeutica inadeguata. Durante queste infezioni si verificano danni quali fibrosi e cicatrizzazione all'interno degli organi interessati. Le infezioni croniche e occulte pongono diversi problemi diagnostici e terapeutici, in particolare causa della struttura antigenica variabile delle forme atipiche, che sono difficilmente identificabili con i metodi diagnostici di routine. Inoltre, queste forme hanno un MOMP ridotto che porta ad un diminuito trasporto di antibiotici attraverso la cellula. Pertanto, in caso di infezioni croniche, la terapia ha spesso esito negativo. Le forme atipiche hanno grandi dimensioni, non sono infettive, hanno una ridotta attività meta-

bolica e non si replicano, ma rimangono vive. Tali forme oltre a mostrare livelli diminuiti di MOMP e lipopolisaccaride presentano un'alta produzione della proteina hsp, che è in grado di indurre infiammazione cronica e cicatrizzazione. La reinfezione è dovuta all'infezione ripetuta, mentre la recidiva è causata dalla presenza di *Chlamydia trachomatis* nel linfonodo e nella milza. È stato inoltre scoperto che i macrofagi svolgono un ruolo importante nella ricorrenza dell'infezione poiché *Chlamydia trachomatis* circola all'interno dei macrofagi, trovando un rifugio temporaneo nei linfonodi, nella milza e nelle cavità sierose (Figura 4) [47].

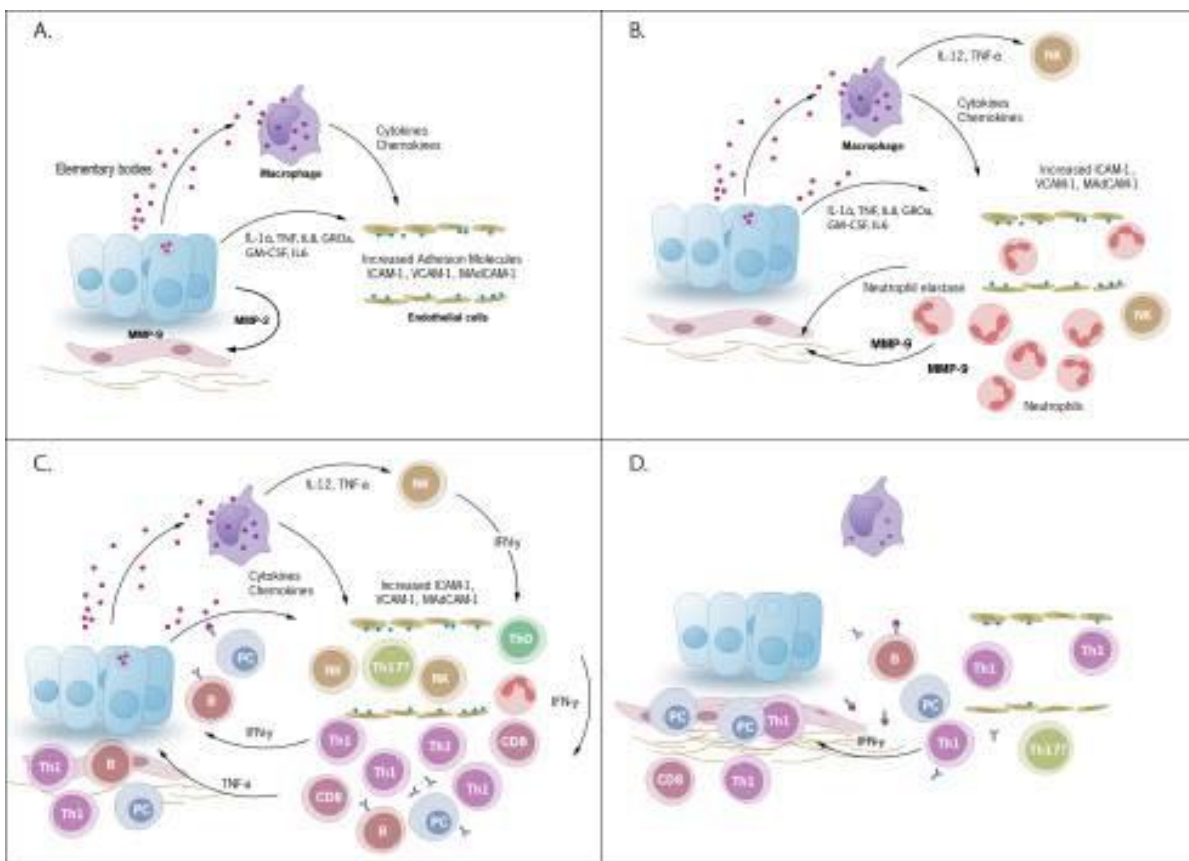


Figura 4. Patogenesi dell'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis*.

1.8 Diagnosi

Per la diagnosi di *Chlamydia trachomatis*, esistono attualmente numerose tecniche di laboratorio che vengono effettuate a partire da diversi tipi di campioni biologici come il tampone uretrale, il tampone cervicale, il liquido seminale e le urine. Queste indagini, in caso di positività, devono essere caldamente raccomandate anche per la/il partner abituale nonché, se possibile, per i partner precedenti allo scopo prioritario di curare i soggetti asintomatici e di limitare la circolazione dell'agente patogeno.

- L'esame colturale, risulta essere particolarmente indaginoso in quanto *Chlamydia trachomatis* non cresce nei normali terreni di coltura ma è necessario infettare particolari colture cellulari quali le HeLa 229 (isolate da un caso di carcinoma alla cervice uterina) e le McCoy (derivate da fibroblasti L di topo). E' richiesto un tempo di incubazione di 48-72 ore e per l'evidenziazione del loro sviluppo è necessaria la dimostrazione dell'avvenuta formazione dei tipici corpi di inclusione, osservabili con microscopio ottico in campo chiaro in seguito a trattamento con liquido di Lugol (Figura 5) [49]. L'indagine colturale presenta una selettività elevata ed una sensibilità piuttosto alta ma comunque variabile e strettamente dipendente dall'entità del processo infettivo, dalla corretta raccolta del campione, dalle modalità di trasporto in laboratorio e dall'impiego di adeguate tecniche colturali [50].

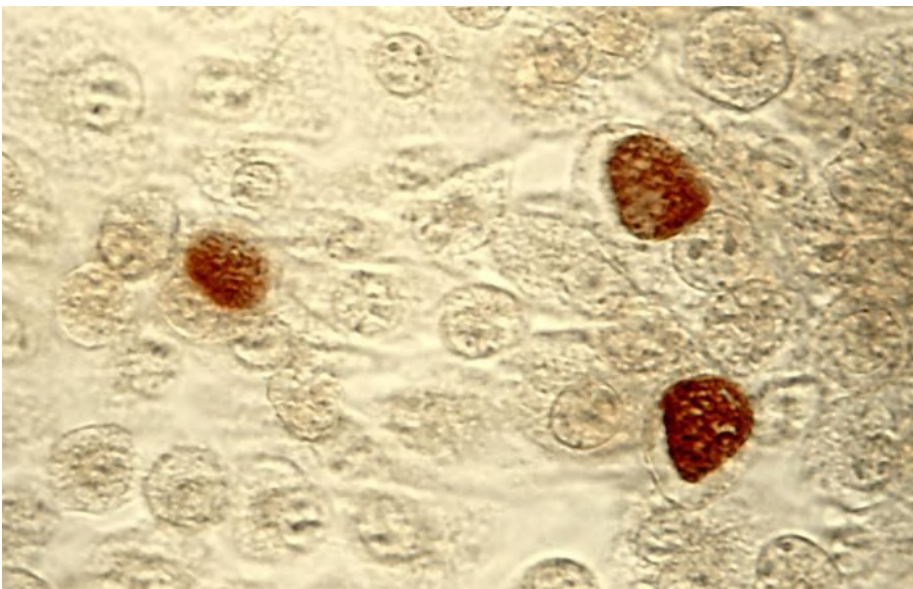


Figura 5. Corpi di inclusione di *Chlamydia trachomatis* in coltura cellulare.

- I metodi di immunofluorescenza (IFA) invece hanno il vantaggio di permettere una diagnosi rapida, ma hanno una sensibilità limitata e la loro esecuzione necessita di personale esperto, di particolari attrezzature di laboratorio e non sono adatti ad un elevato numero di campioni. Mediante il test di immunofluorescenza diretta la rilevazione di *Chlamydia trachomatis* avviene attraverso l'uso di un anticorpo monoclonale coniugato con fluoresceina, il quale è in grado di identificare direttamente i corpi elementari del patogeno. La rilevazione viene poi eseguita con il microscopio a fluorescenza [51].
- Le tecniche immunoenzimatiche (EIA/ELISA) consentono di ricercare qualitativamente antigeni batterici (LPS o MOMP) nei campioni clinici esaminati. Queste tecniche hanno contenuti tempi di esecuzione, sono automatizzate, standardizzate e permettono di processare un elevato numero di campioni ma presentano una bassa sensibilità [52].
- I metodi di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) rappresentano il gold standard per la rilevazione di *Chlamydia trachomatis* infatti hanno determinato un netto incremento della specificità e soprattutto della sensibilità nella diagnosi di infezioni provocate da *Chlamydia trachomatis*. Attraverso la tecnica PCR (Reazione a catena della polimerasi) è possibile la determinazione diretta del DNA del patogeno per mezzo dell'amplificazione di una specifica regione del genoma di *Chlamydia trachomatis* permettendo così una diagnosi precisa anche in quei campioni in cui il patogeno può avere scarsa o nulla vitalità oppure carica microbica molto bassa come ad esempio il secreto congiuntivale oppure il liquido seminale [53]. Inoltre è possibile utilizzare anche tecniche di PCR Real-time che consentono una quantificazione del prodotto di amplificazione [54, 55].
- I metodi diagnostici immunocromatografici rapidi, per la determinazione di *Chlamydia trachomatis*, si basano sulla rilevazione qualitativa dell'antigene del patogeno in differenti campioni biologici maschili e femminili. Presentano rapidità di esecuzione e di refertazione ma scarsa sensibilità [56].
- I test diagnostici sierologici, come ad esempio la microimmunofluorescenza (MIF), si basano sulla rilevazione di anticorpi specifici, infatti le infezioni primarie da *Chlamydia tracomatis* sono caratterizzate da una reazione immunitaria con conseguente comparsa dapprima di anticorpi specifici IgM seguiti da IgG e IgA. Nelle reinfezioni non si riscontrano più anticorpi IgM, mentre la produzione di IgG e IgA risulta rapida ed intensa. Questi metodi possono essere utilizzati come ausilio in caso di infezioni croniche, invasive (come il LGV) o nel caso di re-infezioni [57].
- La citologia rappresenta una metodica facilmente eseguibile e conveniente. Solitamente per rilevare le inclusioni di *Chlamydia trachomatis* vengono utilizzati i metodi di colorazione di May-

Grunwald Giemsa. Questo metodo può essere utilizzato per la diagnosi di infezioni oculari da *Chlamydia trachomatis* nei neonati ma tuttavia non è raccomandato per diagnosticare congiuntivite o infezioni genitali negli adulti a causa di una bassa sensibilità [50].

1.9 Terapia e prevenzione

L'infezione da *Chlamydia trachomatis*, essendo di natura batterica, può essere trattata con antibiotici. Il trattamento, nel caso di infezioni non complicate del tratto genitale inferiore, avviene attraverso la somministrazione di una singola dose di azitromicina (1g) oppure con un ciclo settimanale di doxiciclina (100 mg) tuttavia in determinate condizioni, quali la gravidanza, il trattamento può avvenire con eritromicina o amoxicillina. Invece nel caso di manifestazioni cliniche più gravi come malattia infiammatoria pelvica, linfogranuloma venereo o epididimite il trattamento prevede l'utilizzo di doxiciclina per 10 giorni [58, 59]. E' fondamentale la valutazione ed il trattamento anche dei partner sessuali, inoltre i rapporti sessuali andrebbero evitati per tutta la durata della terapia, in caso contrario si potrebbe verificare una re-infezione che aumenta notevolmente la possibilità che le conseguenze dell'infezione siano più serie. Dopo 3-4 settimane dall'inizio della terapia è consigliabile ripetere un test di screening [58].

Per quanto riguarda la prevenzione, essa può essere effettuata oltre che attraverso un miglioramento delle condizioni igieniche e socio economiche delle popolazioni e per mezzo di una adeguata educazione sessuale anche attraverso l'esecuzione annuale di un test di screening, raccomandato soprattutto, nelle donne in stato di gravidanza, nei soggetti sessualmente attivi al di sotto dei 25 anni e più in generale negli individui con comportamenti sessuali considerati a rischio (ad esempio per via di un frequente cambio di partner sessuale) [60].

Sarebbe auspicabile avere un'immunoprofilassi vaccinale per l'infezione da *Chlamydia trachomatis* infatti la somministrazione di un vaccino protettivo agli adolescenti, prima dell'inizio della loro attività sessuale, potrebbe determinare una riduzione significativa della prevalenza dell'infezione [61]. Sfortunatamente, non sono disponibili vaccini protettivi, anche se sono in corso, da numerosi anni, tentativi di svilupparne uno.

Per bloccare l'infezione da *Chlamydia trachomatis*, il vaccino dovrà suscitare alti livelli di anticorpi protettivi mucosali/sistemici che vengano mantenuti per tutta la vita dell'individuo, o almeno per tutta la durata della loro vita riproduttiva, un obiettivo non facilmente ottenibile. L'utilizzo di un vaccino basato sulle tecniche del DNA ricombinante, come ad esempio un vaccino con antiagene sintetico MOMP che include specifici epitopi di vari sierotipi potrebbe essere interessante [62].

1.10 Epidemiologia

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ogni anno si verificano 105,7 milioni di nuovi casi di infezione da *Chlamydia trachomatis*. Quest'ultima rappresenta la IST più frequente in Europa infatti nel 2016 sono stati segnalati 403.807 casi in 26 paesi membri dell'UE/EEA, precisamente l'81% dei casi sono stati riportati in Danimarca, Svezia, Norvegia e Regno Unito, in particolare quest'ultimo rappresenta il 57% dei casi segnalati, per via di un programma di screening attivo dal 2008 che ha notevolmente incrementato le diagnosi di *Chlamydia trachomatis* [63].

Anche negli USA l'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis* rappresenta la ITS notificabile più comune, precisamente nel 2016 sono state segnalate al CDC (Centers for Disease Control and Prevention) un totale di 1.598.354 infezioni in 50 stati, questo numero di casi corrisponde a un tasso di 497,3 casi per 100.000 abitanti. Nei maschi i casi segnalati, nel 2016, sono stati 522 870 che corrispondono ad un tasso di 330,5 casi per 100 000 uomini, mentre tra le donne il numero di casi di *Chlamydia trachomatis* segnalati è stato pari a 1.072.718 per un tasso di 657,3 casi per 100 000 persone. Nel periodo 2000-2016 il numero di casi tra gli uomini ha subito un aumento invece per quanto riguarda le donne, il numero dei casi di questa infezione sessualmente trasmissibile è aumentato nel periodo compreso tra il 2000 e il 2011, per poi andare incontro ad una diminuzione dal 2011 al 2013 al quale è seguito un aumento fino al 2016 (Figura 6).

La maggior parte dei casi segnalati di *Chlamydia trachomatis*, in entrambi i sessi, riguarda i giovani di età compresa tra i 15 e i 24 anni [64].

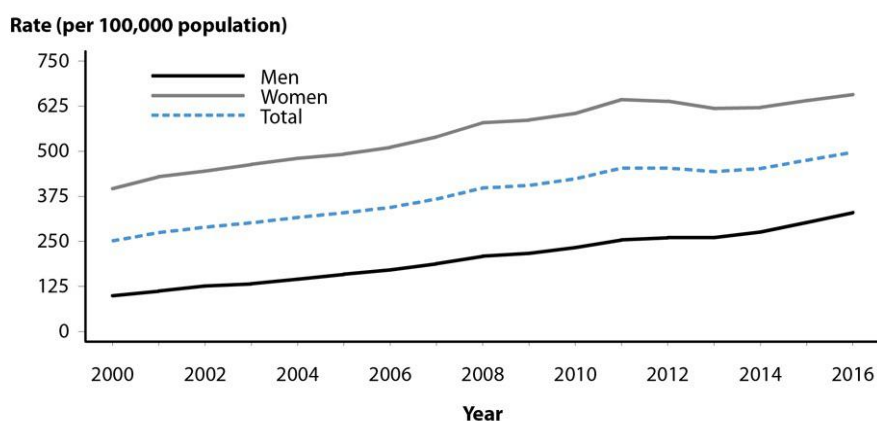


Figura 6. Casi segnalati di *Chlamydia trachomatis* negli USA, in entrambi i sessi.

Chlamydia trachomatis in Italia, a differenza di altre ITS, non è soggetta a notifica obbligatoria pertanto sono stati attivati due sistemi di sorveglianza sentinella, coordinati dall'Istituto Superiore di Sanità: uno basato su centri clinici ed uno basato su laboratori di microbiologia clinica. In questa sorveglianza sono incluse le seguenti ITS: l'infezione da *Chlamydia trachomatis*, da *Trichomonas vaginalis* e da *Neisseria gonorrhoeae* [65].

Nel periodo compreso tra aprile 2009 e dicembre 2015 è stato condotto uno studio che ha preso in considerazione 125.722 campioni totali prelevati da donne e uomini di età media pari a 34 anni, di questi 94.608 (75,2%) sono stati utilizzati per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*. Precisamente per le donne è stato utilizzato il tampone cervicale mentre per gli uomini il tampone uretrale o in alternativa il primo getto di urine mattutine. La diagnosi è stata eseguita tramite NAAT.

Questo studio ha permesso di definire che la prevalenza dell'infezione da *Chlamydia trachomatis* è risultata pari al 3,4% (quindi 3.199 casi): in particolare, 7,9% tra gli uomini e 2,6% tra le donne. Nell'intero periodo, la prevalenza di *Chlamydia trachomatis* è risultata più elevata tra i soggetti di età compresa tra i 15 e i 24 anni, rispetto ai soggetti con più di 24 anni). In particolare, la prevalenza di *Chlamydia trachomatis* diminuisce al crescere dell'età, dall'8,6% tra i soggetti di 15-24 anni, al 3,6% tra i soggetti di 25-34 anni, all'1,9% tra i soggetti di età superiore ai 34 anni (Figura 7).

Sempre nell'intero periodo la prevalenza è risultata essere maggiore nei soggetti che hanno dichiarato un non costante uso del condom e che cambiano frequentemente partner sessuale rispetto a quello che hanno riferito un costante utilizzo di contraccettivi barriera e di avere un partner stabile da almeno tre mesi. Nel 2015 la prevalenza di *Chlamydia trachomatis* è risultata pari al 3,6%, precisamente: 6,3% tra gli uomini e 2,8% tra le donne [65].

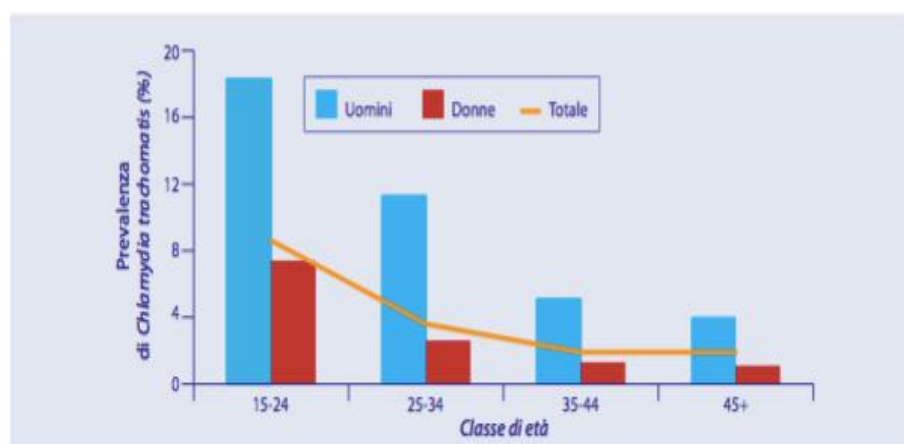


Figura 7. Prevalenza di *Chlamydia trachomatis* in entrambi i sessi: 80.107 donne e 14.493 uomini testati attraverso il Sistema di sorveglianza sentinella delle ITS basato sui laboratori di microbiologia clinica (aprile 2009- dicembre 2015).

2. SCOPO DELLA TESI

L'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis* costituisce un importante problema di salute pubblica a livello mondiale, rappresentando una delle IST maggiormente diffuse. Ogni anno si contano nel mondo oltre 90 milioni di nuovi casi, mentre in Italia l'infezione colpisce, mediamente, da 2 a 10 persone sessualmente attive su 100. Le cause di questa diffusione possono essere ricercate nei cambiamenti economici, sociali e biologici ma soprattutto nel cambiamento dei comportamenti sessuali individuali e collettivi. Infatti circa un terzo delle nuove infezioni coinvolge giovani sessualmente attivi di età compresa tra i 15 e i 24 anni, ovvero ragazzi alle prime esperienze sessuali, che a causa di un'inadeguata educazione sanitaria e di un difficile accesso ai servizi sanitari hanno una scarsa consapevolezza della gravità dell'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*. L'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis*, comunemente, viene definita "silenziosa" per via del fatto che è asintomatica nella maggior parte dei casi, in entrambi i sessi, e spesso insorge dopo vario tempo con una complicità.

In quest'ottica risulta fondamentale disporre di un sistema diagnostico in grado di identificare precocemente i soggetti infetti così da iniziare tempestivamente un trattamento ed impedire la diffusione e il contagio di questa ITS. Inoltre sarebbe auspicabile mettere in atto un adeguato sistema di screening che consenta di offrire gratuitamente il test diagnostico, ai soggetti considerati a rischio, con l'obiettivo di ridurre la diffusione dell'infezione. Pertanto il test diagnostico ideale, per soddisfare, queste finalità deve essere sensibile, specifico, economico e rapido nell'esecuzione e nella refertazione.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di valutare se il test rapido basato sul principio immunocromatografico (*Chlamydia Rapid Test Device*) prodotto della ditta Innovacon, per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, possa rappresentare una valida alternativa diagnostica nell'ambito dell'identificazione di questo patogeno in differenti materiali biologici, è stato quindi eseguito un confronto tra questa metodica e quella che invece viene considerata come il gold standard, nella diagnosi di *Chlamydia trachomatis*, ovvero la Real-Time PCR. Quest'ultima rappresenta la tecnica diagnostica che viene infatti utilizzata dal *Laboratorio di Analisi Cliniche BioLab* per la ricerca di *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea* e *Trichomonas vaginalis* in differenti campioni biologici.

Nell'ambito dell'analisi immunocromatografica l'obiettivo era anche quello di valutare se l'utilizzo del liquido seminale, non previsto dal kit Innovacon, potesse rappresentare una alternativa valida ed affidabile alle matrici previste dal kit ovvero, nel caso degli uomini, il tampone uretrale e

l'urina. Pertanto per la prima parte dell'analisi è stato considerato unicamente il liquido seminale per entrambe le metodiche, successivamente, per l'esecuzione del test rapido è stato utilizzato anche un campione di urina.

La scelta dell'utilizzo del liquido seminale è stata determinata dalla volontà di utilizzare un unico campione per l'esecuzione di più tecniche, precisamente: immunocromatografia, Real-Time PCR e spermicoltura, in modo tale da contenere i costi e soprattutto mantenere alta la compliance del paziente evitando di sottoporlo a più prelievi. Infatti il liquido seminale rappresenterebbe una alternativa al tampone uretrale che oltre ad avere difficili modalità di conservazione spesso per via della sua invasività non è facilmente accettato dai pazienti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi biomolecolare

Nel periodo compreso tra aprile 2018 e gennaio 2019, è stata ricercata tramite analisi biomolecolare (Real-Time PCR), presso il *Laboratorio di Analisi Cliniche Biolab*, la presenza di *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis* in 220 campioni maschili di liquido seminale di individui di età compresa tra i 15 e i 67 anni che ne facevano richiesta. Gli strumenti utilizzati per lo svolgimento di questa analisi sono rappresentati da QIASymphony SP/AS (Figura 8) e Rotor Gene Q Mdx 5plex HRM entrambi della ditta QIAGEN.



Figura 8. Strumento QIASymphony SP/AS

3.2 Fase pre analitica: prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Il prelievo del campione deve avvenire da due fino a quattro giorni dopo l'ultima eiaculazione, utilizzando la normale prassi di laboratorio, ovvero il campione di sperma può essere prelevato, attraverso masturbazione direttamente in un contenitore per campioni sterile, pulito e asciutto, oppure il prelievo può anche avvenire attraverso masturbazione utilizzando un preservativo. Dopo l'eiaculazione occorre rimuovere il preservativo e chiuderne bene la parte superiore con un elastico per trattenere il campione di sperma all'interno del preservativo, in seguito è importante porre il preservativo nel contenitore da trasporto. La spedizione dei campioni deve avvenire a 20°C entro sei ore dalla raccolta dei campioni, in conformità alle disposizioni statali vigenti per il trasporto di materiali potenzialmente patogeni. E' importante evitare la formazione di schiuma all'interno o sui campioni che devono essere termostatati a temperatura ambiente (15-25 °C) prima dell'avvio della procedura. Per quanto riguarda la conservazione dei campioni, fino a 7 giorni dall'arrivo al sito di analisi i campioni devono essere conservati a 20°C o 4°C in funzione delle condizioni locali, a 4°C fino a due settimane mentre in caso di conservazione prolungata la temperatura ottimale è pari a -20°C.

3.3. Caratteristiche del QIASymphony SP

Il sistema QIASymphony esegue tutte le fasi della procedura di purificazione garantendo una processazione sicura e riproducibile di campioni potenzialmente infetti.

Gli acidi nucleici purificati poi possono essere usati per lo svolgimento, in seguito, di altre procedure quali l'amplificazione. Il sistema QIASymphony SP esegue una purificazione completamente automatizzata degli acidi nucleici utilizzando la tecnologia a particelle magnetiche; la procedura di purificazione comprende 4 fasi: lisi, legame, lavaggio ed eluizione. Precisamente, i campioni vengono lisati nella stazione di lisi, poi gli acidi nucleici si legano alla superficie delle particelle magnetiche e vengono lavati per rimuovere i contaminanti. Infine l'acido nucleico purificato viene eluito.

La procedura schematicamente prevede che una barra magnetica protetta da un coperchio entri in un pozzetto contenente il campione ed attragga le particelle magnetiche. Poi la banda magnetica con coperchio viene posizionata in un altro pozzetto e le particelle magnetiche vengono rilasciate (Figura 9). Durante la processazione dei campioni queste due fasi vengono ripetute più volte. Il sistema QIASymphony SP avendo una testa magnetica contenente 24 barre magnetiche può processare in una sola sessione fino a 96 campioni in batch da massimo 24 campioni ciascuno. Lo strumento QIASymphony SP è costituito da una testa magnetica, una stazione di lisi, un braccio robotico ed un lettore di codici a barre.

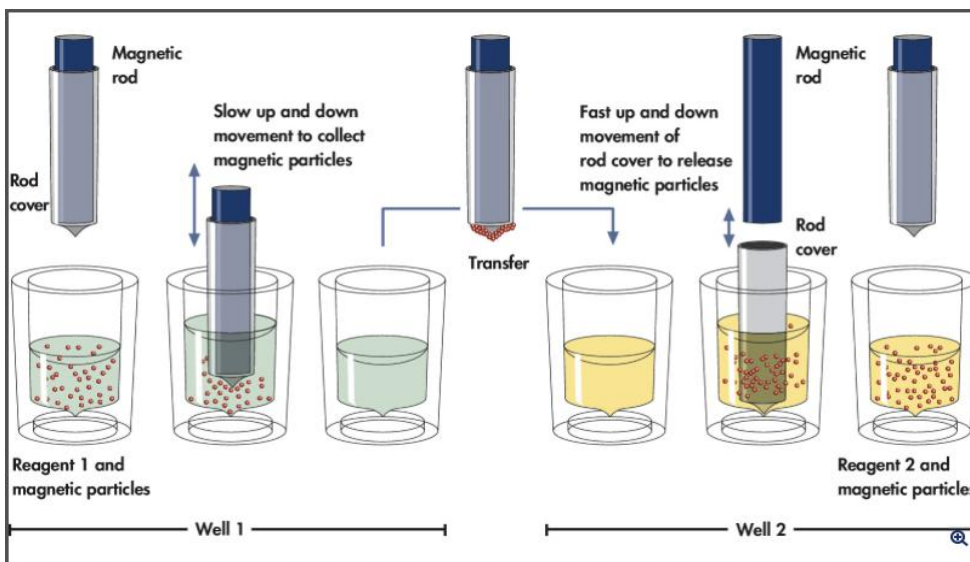


Figura 9. Rappresentazione schematica del principio di funzionamento del sistema QIASymphony SP.

3.4 Estrazione e purificazione del DNA

Per l'estrazione di DNA è stato utilizzato il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi in combinazione con il sistema QIASymphony SP della ditta QIAGEN (Figura 10).

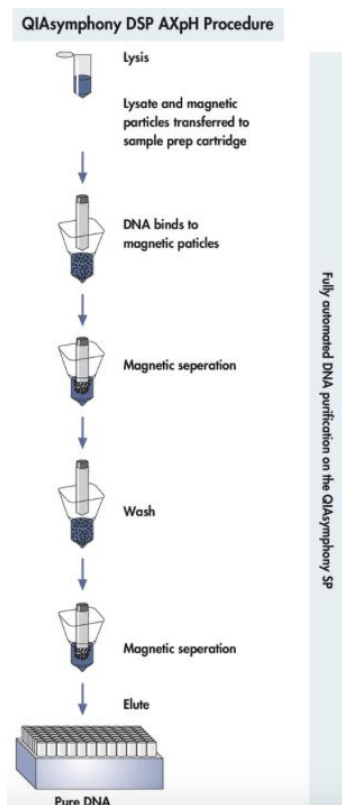


Figura 10. Procedura QIASymphony Virus/Pathogen.

Il kit QIASymphony DISP Virus/Pathogen Midi contiene:

- RC Cartuccia reagenti
- ER Rack per enzima
- PL coperchio perforante
- AVE Tampone AVE (20 ml)
- CARRIER Carrier RNA (1.350 µg)
- RSS Set sigillante riutilizzabile

I componenti del kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi devono essere conservati a temperatura ambiente (15-25 °C).

3.5 Purificazione automatizzata sul sistema QIASymphony SP

Il sistema QIASymphony SP consente di eseguire una preparazione completamente automatizzata dei campioni. I campioni, i reagenti, i materiali di consumo e gli eluati vengono separati in diversi cassettei (Figura 11).

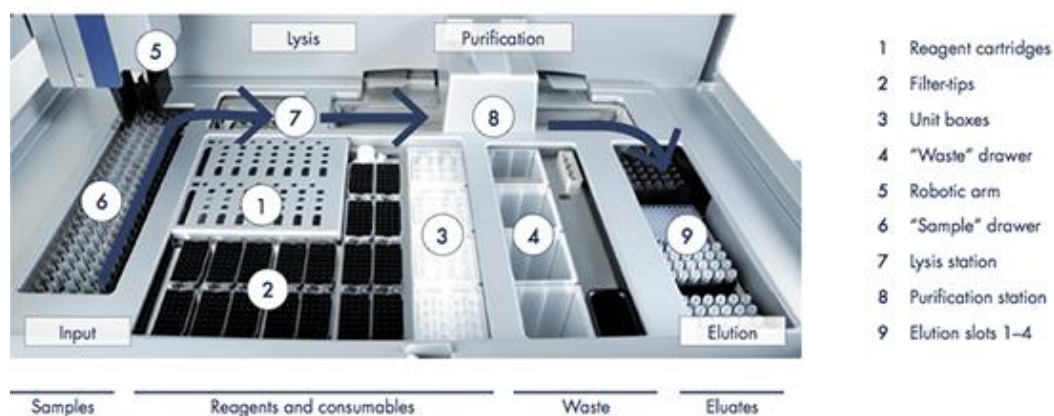


Figura 11. Contenuto dei differenti cassettei del sistema QIASymphony SP.

La procedura di purificazione automatizzata sul sistema QIASymphony SP si articola in differenti fasi, schematicamente riassunte come segue:

1. Caricare le cartucce reagenti (RC) nel cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo). I reagenti per la purificazione del DNA sono contenuti in una cartuccia reagenti (RC). Ciascun recipiente della cartuccia reagenti (RC) contiene un particolare reagente: particelle magnetiche (che devono essere opportunamente risospese), tampone di lisi, tampone di lavaggio oppure tampone di eluizione (Figura 12).



Figura 12. Cartuccia reagenti QIASymphony (RC). La cartuccia reagenti (RC) contiene tutti i reagenti necessari per l'esecuzione del protocollo.

2. Caricare la plasticheeria nel cassetto "Reagents and Consumables". In questo passaggio è necessario, dopo averlo scansionato, caricare nell'apposito cassetto il tampone ALT (ALT) ed in seguito eseguire il caricamento del cassetto "Waste" (Materiali di scarto).
3. Caricare il cassetto "Eluate", quindi caricare il rack per eluizione necessario nel cassetto "Eluate" utilizzando l'adattatore di raffreddamento. Il volume di eluizione preselezionato è pari a 60 µl. Avviare la procedura di inventario.
4. Preparare i campioni e i controlli. I campioni sono rappresentati da 500 µl di liquido seminale posti all'interno di un eNaT da 2 ml. I campioni, provvisti di codice a barre, vengono disposti uno di seguito all'altro all'interno dei portaprovette costituenti un batch. In quest'ultimo, devono essere posti anche i controlli positivi e negativi di *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria Gonorrhoeae* del kit *artus CT/NG QS-RGQ* ovvero: CT/NG Control CT+/ NG- e CT/NG Control NG+/CT-. I campioni e i relativi controlli devono essere caricati nel cassetto "Campione", in uno dei primi quattro slot (Figura 13).
5. Preparare il carrier RNA e aggiungere il controllo interno ai campioni. Il kit QIASymphony DPS Virus/Pathogen Midi in combinazione con il kit *artus Chlamydia trachomatis/Neisseria Gonorrhoeae* richiede l'inserimento del controllo interno (CT/NG RG IC) nella procedura di purificazione per monitorare l'efficienza della preparazione dei campioni e del test a valle. I controlli interni vanno aggiunti alla miscela di carrier RNA (CARRIER)- tampone AVE (AVE). Il volume totale della miscela controllo interno- carrier RNA (CARRIER)- tampone AVE

(AVE) deve rimanere pari a 120 µl, precisamente: 3 µl di soluzione madre con carrier RNA (CARRIER), 9 µl di controllo interno e 108 µl di tampone AVE (AVE). In seguito occorre collocare la provetta contenente la miscela di carrier RNA (CARRIER), tampone AVE (AVE) e il controllo interno (CT/NG RG IC) nel batch portaprovette e caricare quest'ultimo nel cassetto "Campione", precisamente nello slot A.

6. Inserire le informazioni relative ad ogni batch di campioni da processare, attraverso il touch screen, ovvero informazioni relative al campione, protocollo da eseguire, volume di eluizione e posizione di uscita, provette contenenti la miscela di carrier RNA (carrier), tampone AVE (AVE) ed il controllo interno (CT/NG RG IC). In questa fase è importante selezionare la modalità Processo integrato attraverso il touch screen del QIASymphony. A questo punto è possibile avviare la procedura di purificazione che comprende fasi di processazione completamente automatizzate. Al termine delle quali è possibile estrarre il rack per eluizione contenente gli acidi nucleici purificati dal cassetto "Eluate".

3.6 Funzionamento integrato con il modulo QIASymphony AS

Il sistema QIASymphony SP si interfaccia direttamente con il modulo QIASymphony AS attraverso un processo integrato quindi tutti i campioni purificati con QIASymphony SP possono essere trasferiti automaticamente al modulo QIASymphony AS per l'impostazione del dosaggio PCR. Nello specifico i rack per eluizione possono essere trasferiti automaticamente mediante il modulo di trasferimento dal QIASymphony SP allo slot 2 del cassetto "Eluati e reagenti" dello strumento. Il modulo QIASymphony AS utilizza un sistema di pipettaggio a 4 canali.

Il QIASymphony AS è costituito da un coperchio, da LED di stato dello strumento, da un braccio robotico e da una serie di cassette quali il cassetto "Eluati e reagenti" ed il cassetto "Test". In questo modulo AS, dopo avere caricato i componenti necessari e i materiali di consumo, è necessario caricare i rack per test nel corrispondente adattatore preraffreddato e caricare il rack per reagenti collocando le provette per reagenti, senza coperchi, nelle rispettive posizioni degli adattatori preraffreddati. Precisamente in questa fase occorre caricare CT/NG RG Master (660 µl), CT/NG RG Mg-Sol (200 µl) e il Bianco CT/NG RG NTC, tutti del kit *artus* CT/NG QS-RGQ. Terminato il processo è necessario scaricare il rack per test e passare al protocollo Real-Time PCR sul Rotor Gene Q.

3.7 Kit artus CT/NG QS-RGQ

Il kit utilizzato per l'analisi biomolecolare è rappresentato dal kit artus CT/NG QS-RGQ della ditta QIAGEN ovvero un sistema pronto all'uso per la rilevazione del DNA di *Chlamydia trachomatis* (CT) e/o di *Neisseria gonorrhoeae* (NG) tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) sugli strumenti Rotor-Gene Q con preparazione dei campioni e setup del test eseguiti con lo strumento QIASymphony SP/AS. Precisamente il kit artus CT/NG QS-RGQ viene utilizzato in combinazione con il kit QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi attraverso l'utilizzo del modulo QIASymphony SP per la purificazione ed estrazione del DNA, con il modulo QIASymphony AS per l'impostazione del dosaggio di PCR ed infine per mezzo dell'utilizzo del Rotor-Gene Q è possibile eseguire l'amplificazione e quindi il rilevare il DNA degli agenti patogeni. Il master RG per CT/NG contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una regione di 86 bp del plasmide criptico *Chlamydia trachomatis*, una regione di 66 bp del genoma *Chlamydia trachomatis* e un bersaglio di 74 bp del genoma *Neisseria gonorrhoeae* per la rilevazione diretta dell'amplicone specifico nel canale di fluorescenza Cycling Green (Ciclo verde) e Cycling Orange (Ciclo arancione) del Rotor-Gene Q. Il kit artus CT/NG QS-RGQ contiene anche un quarto sistema di amplificazione eterologa per la rilevazione di una possibile inibizione della PCR. Questa viene rilevata come controllo interno (IC) nel canale di fluorescenza Cycling Yellow (Ciclo giallo) del Rotor-Gene Q. Tuttavia questo controllo non riduce il limite di rilevazione della PCR di CT/NG.

3.7.1 Specificità, sensibilità e limite di rilevamento analitico (LOD) del kit

Per quanto riguarda specificità e sensibilità il kit artus CT/NG QS-RGQ ha mostrato una specificità diagnostica del 99,8% e una sensibilità del 98,1% per *Chlamydia trachomatis* e una specificità diagnostica del 99,8% e una sensibilità del 96,3% per *Neisseria gonorrhoeae* rispetto al saggio Abbott *Chlamydia trachomatis* / *Neisseria gonorrhoeae*. Invece, il limite di rilevamento analitico (LOD) del kit artus CT/NG QS-RGQ, considerando la fase di purificazione, è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni di cellule di *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* arricchite con terreno eNAT in combinazione con l'estrazione su QIASymphony SP. Il LOD ha dato una probabilità del 95% che 5 EB / ml di *Chlamydia trachomatis* e 3 CFU / ml di *Neisseria gonorrhoeae* possano essere rilevati.

3.7.2 Contenuto del kit e conservazione dei reagenti

Il kit artus CT / NG QS-RGQ contiene (Figura 13):

- Due controlli volti a monitorare la procedura di estrazione e la PCR ovvero il controllo CT/NG CT+/NG- (500 µl) e il controllo CT/NG NG+/CT- (500 µl) che vengono caricati sullo strumento QIASymphony SP/AS (precisamente nel modulo SP) e trattati come gli altri campioni.
- Un controllo interno CT/NG RG IC che viene aggiunto al campione durante il processo di estrazione del DNA ed è presente in tutti i campioni.
- Il bianco CT/NG RG NTC (100 µl).
- Un soluzione di Mg ovvero CT/NG RG Mg-Sol (220 µl).
- Master Mix CT/NG RG Master (660 µl).

I componenti del kit artus CT/NG QS-RGQ devono essere conservati ad una temperatura fra -15°C e -30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta



Figura 13. Componenti del kit kit artus CT / NG QS-RGQ.

3.8 Amplificazione del DNA batterico: principio della Real-Time PCR

Svolgendo una procedura diagnostica tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) è possibile amplificare specifiche regioni del genoma dell'agente patogeno. Utilizzando la Real-Time PCR (RT-PCR) la rilevazione richiede l'impiego di sostanze fluorescenti, di solito associate a sonde oligonucleotidiche, che si legano specificatamente al prodotto di amplificazione. La Real-Time PCR permette, inoltre, per ogni campione di ottenere una curva di amplificazione ed il relativo Ct (Threshold Cycle) che è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale contenuto nel campione.

3.8.1 Rotor-Gene Q

Per l'amplificazione del DNA estratto, è stato utilizzato il Rotor-Gene Q della ditta QIAGEN (Figura 14), precisamente il Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM. Questo strumento garantisce che ogni provetta giri in una camera di aria in movimento, mantenendo tutti i campioni esattamente alla stessa temperatura durante il ciclo termico permettendo un rilevamento uniforme. Quando ciascun tubo si allinea con l'ottica di rilevamento, il campione viene illuminato e il segnale fluorescente viene raccolto rapidamente. Questa uniformità termica e ottica, determinata dal fatto che tutti i campioni ruotano contemporaneamente a 400 RPM, consente di produrre un'analisi di RT-PCR sensibile, precisa e veloce.



Figura 14. Rotor-Gene Q

Il Rotor-Gene Q offre la gamma ottica più ampia attualmente disponibile infatti ha un massimo di 6 canali per il rilevamento ottico (Figura 15), questa caratteristica combinata ad un percorso ottico corto e fisso, rende il Rotor-Gene Q particolarmente adatto reazioni multiplex, garantendo una minima variabilità di fluorescenza tra i campioni ed eliminando la necessità di calibrazione o compensazione. Attraverso l'utilizzo del Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM è anche possibile eseguire un High Resolution Melt (HRM) continuando comunque ad assicurare un'ottima qualità strumentale per le classiche reazioni di RT-PCR.

Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Examples of fluorophores detected
Blue	365±20	460±20	Marina Blue®, Edans, Bothell Blue, Alexa Fluor® 350, AMCA-X
Green	470±10	510±5	FAM™, SYBR Green I, Fluorescein, EvaGreen®, Alexa Fluor 488
Yellow	530±5	557±5	JOE™, VIC®, HEX, TET™, MAX™, CAL Fluor®, Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585±5	610±5	ROX™, CAL Fluor Red 610, Cy®3.5, Texas Red®, Alexa Fluor 568
Red	625±5	660±10	Cy5, Quasar® 670, LightCycler®, Red640, Alexa Fluor 633
Crimson	680±5	712 high pass	Quasar 705, LightCycler Red705, Alexa Fluor 680
HRM	460±20	510±5	SYBR Green I, SYTO®9, LC Green®, LC Green Plus+, EvaGreen

Figura 15. I sei canali di rilevamento ottico del Rotor-Gene Q.

3.9 RT-PCR sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM

Il kit artus CT/NG è stato eseguito su Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM. Dopo avere scaricato il rack per test, le provette per PCR (provette per strisce 0,1 ml) devono essere chiuse e caricate sul rotore a 72 pozzetti che si trova sul relativo supporto, il quale deve essere riempito a partire dalla posizione 1 e le provette devono essere trasferite con il corretto orientamento (Figura 16). Poi è necessario collegare l'anello di bloccaggio e caricarlo insieme al sul Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

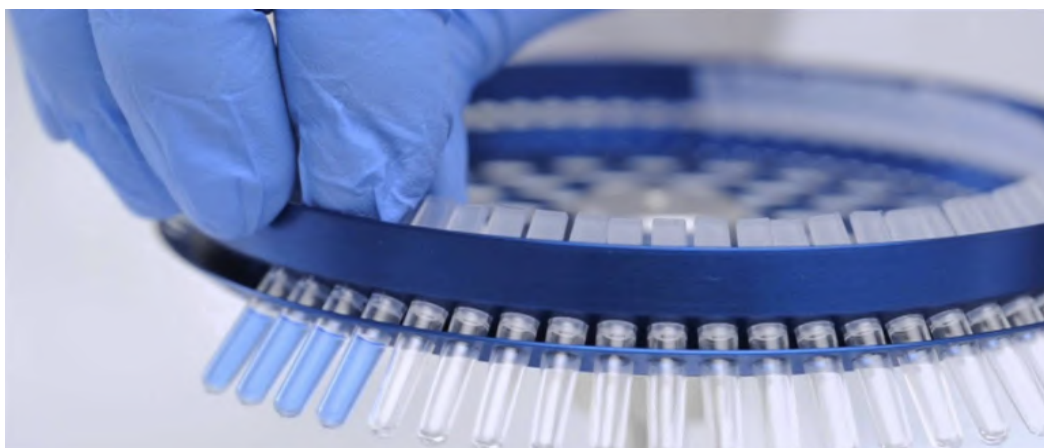


Figura 16. Posizionamento delle provette per strisce chiuse all'interno del rotore a 72 pozzetti.

Il file del termociclatore deve essere scaricato dal QIASymphony AS e trasferito al computer collegato al Rotor-Gene Q. Poi occorre impostare il profilo termico per la rilevazione del DNA di CT/NG e avviare il processo. Il profilo termico specifico per la rilevazione di questi due patogeni per il kit *artus* CT/NG QS-RGQ eseguito sul Rotor-Gene Q Mdx 5plex HRM utilizzando l'analisi manuale con il software Rotor Gene Q 2.1 è riportato in Figura 17.

Volume di reazione (µL)	25
Mantenimento	Temperatura di mantenimento: 95° Durata di mantenimento: 15 minuti
Ciclizzazione	45 volte 95° per 11 s 60° per 20 s 72° per 20 s
Setup di ottimizzazione dell'auto-gain	60° (Campioni: CT: Green (verde), NG: Orange (arancione); IC: Yellow (giallo))

Figura 17. Impostazioni specifiche per il kit artus CT/NG QS-RGQ Kit utilizzando il software Rotor-Gene 2.1.

3.9.1 Interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei risultati del kit *artus* CT/NG QS-RGQ è stata eseguita utilizzando l'analisi manuale con Rotor Gene Q 2.1.

Vengono considerati tra canali di fluorescenza:

- Cycling Green (Ct 0,07) per *Chlamydia Trachomatis*
- Cycling Orange (Ct 0,10) per *Neisseria Gonorrhoeae*
- Cycling Yellow (0,03) per il controllo unico interno

In base alla rilevazione dei segnali nei tre canali è possibile trarre conclusioni relativamente alla presenza o meno del DNA dei patogeni considerati ovvero *Chlamydia Trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (Figura 18).

Segnale nel canale Cycling Green (ciclo verde)	Segnale nel canale Cycling Orange (ciclo arancione) ≤ 40 Cts	Segnale nel canale Cycling Orange (ciclo arancione) >40 Cts	Segnale nel canale Cycling Yellow (ciclo giallo)	Interpretazione
Sì	No	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT rilevato, DNA di NG non rilevato
Sì	No	Sì	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT rilevato, DNA di NG non rilevato
No	Sì	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT non rilevato, DNA di NG rilevato
Sì	Sì	No	Sì/No*	Risultato valido: DNA di CT e NG rilevato
No	No	Sì	Sì	Risultato valido: nessun DNA di CT o NG rilevato [†]
No	No	No	Sì	Risultato valido: nessun DNA di CT o NG rilevato [†]
No	No	Sì	No	Risultato non valido: non si può trarre alcun risultato [‡]
No	No	No	No	Risultato non valido: non si può trarre alcun risultato [‡]

Figura 18. Rilevazione dei segnali e relative conclusioni.

Nel canale Cycling Green dovrà essere presente la curva relativa al controllo positivo per *Chlamydia Trachomatis* (CT/NG CT+/NG-) ed eventualmente un'altra curva relativa ad un campione di un paziente positivo a questo patogeno (Figura 19).

Così come nel caso del canale Cycling Orange, si dovrà osservare una curva relativa al controllo positivo (CT/NG NG+/CT-) per *Neisseria Gonorrhoeae* ed eventualmente un'altra curva relativa ad un campione di un paziente positivo a questo patogeno (Figura 20).

Invece nel segnale Cycling Yellow è possibile osservare le curve relative al controllo interno che tutti i campioni devono avere (Figura 21).

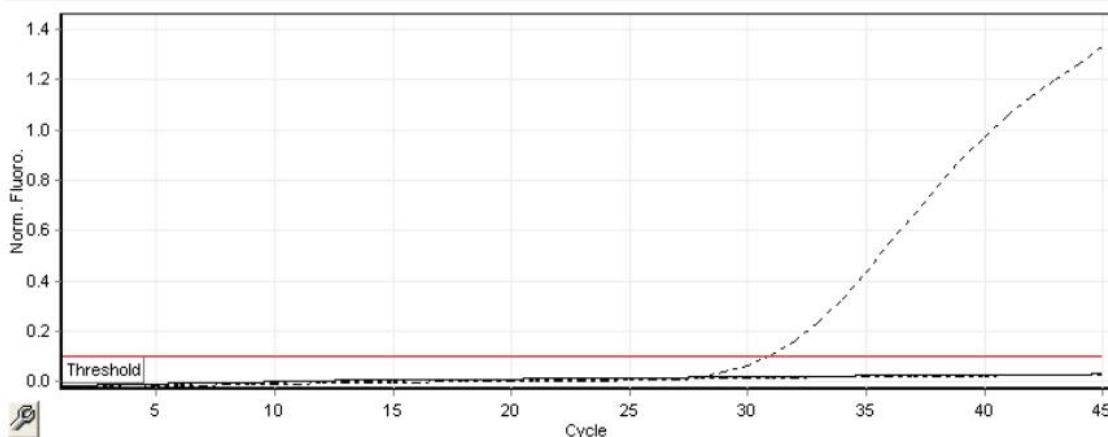


Figura 19. Cycling Green: controllo positivo per *Chlamydia Trachomatis*. Risultati di un'analisi con il controllo CT/NG CT+/NG-.

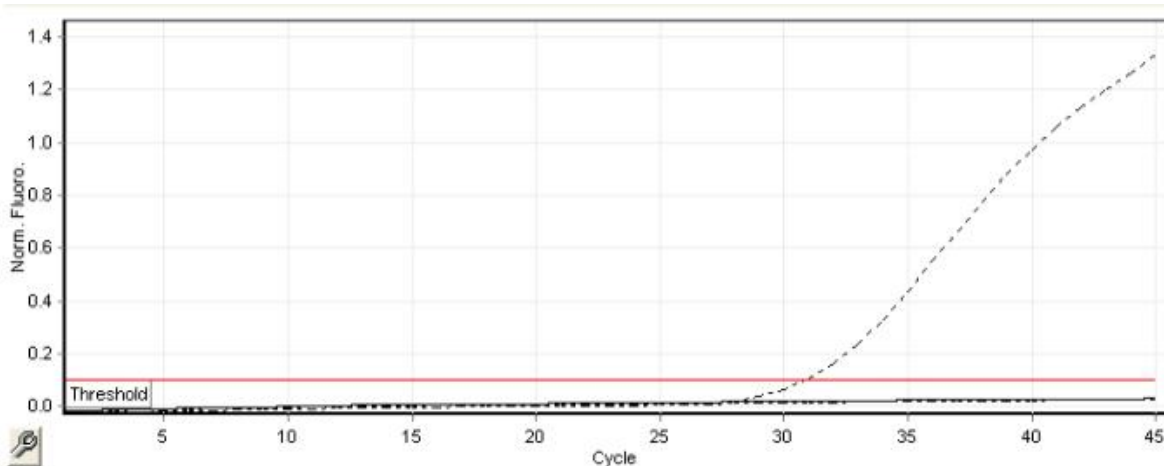


Figura 20. Cycling Orange: controllo positivo per *Neisseria Gonorrhoeae*. Risultati di un'analisi con il controllo CT/NG NG+/CT-.

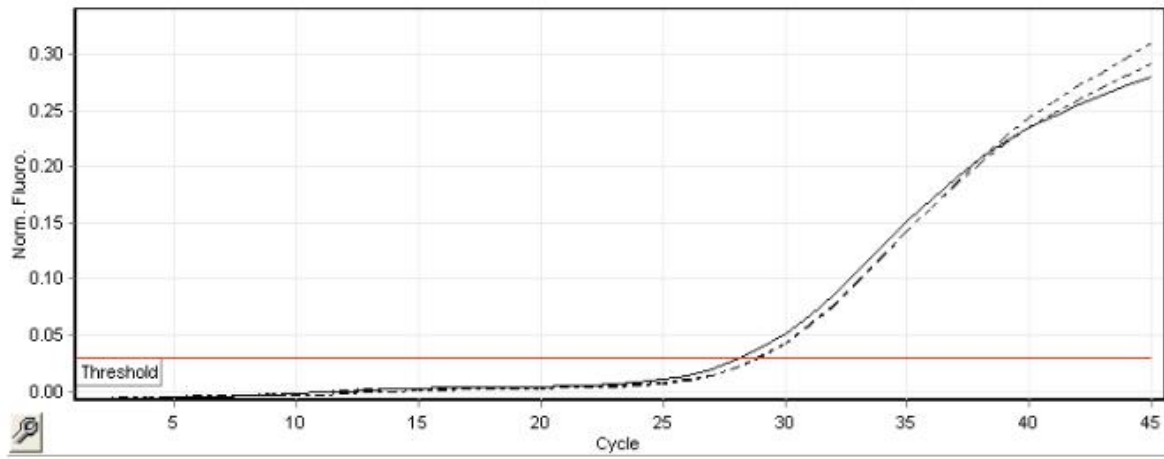


Figura 21. Cycling Yellow: controllo interno. Risultati di un'analisi con il controllo interno CT/NG RG IC.

3.10 Analisi immunocromatografica

Il kit utilizzato per lo svolgimento dell'analisi immunocromatografica, sia su liquido seminale che su urina maschile, è il Chlamydia Rapid Test Device della ditta Innovacon. Il test è stato svolto, unicamente a scopo di ricerca, sugli stessi 220 campioni di liquido seminale considerati per l'analisi biomolecolare. Inoltre, agli ultimi 114 pazienti che richiedevano l'esecuzione dell'analisi biomolecolare per la determinazione di *Chlamydia trachomatis* e degli altri patogeni, è stato richiesto anche un campione di urina per lo svolgimento del Chlamydia Rapid Test Device.

3.10.1 Principio della metodica

Chlamydia Rapid Test Device è un test immunocromatografico rapido per la rilevazione qualitativa di *Chlamydia trachomatis* in campioni femminili da tamponi cervicali, campioni maschili da tamponi uretrali e campioni maschili di urina. Il test rappresenta un immunodosaggio a flusso laterale qualitativo per la rilevazione dell'antigene di *Chlamydia trachomatis*, precisamente in questo test l'antigene di *Chlamydia trachomatis* è adeso sull'area di test. Nell'analisi la soluzione con l'antigene estratto reagisce con un anticorpo diretto contro *Chlamydia trachomatis* che riveste le particelle, la miscela poi migra lungo la membrana per reagire con l'anticorpo e generare una linea colorata nell'area del test. La presenza di tale linea colorata indica un risultato positivo, mentre la sua assenza indica un risultato negativo; nell'area di controllo compare sempre una linea colorata che funge da controllo procedurale interno, che fornisce la conferma che è stato applicato un volume di campione sufficiente, che si è verificato un adeguato assorbimento da parte della membrana e che la tecnica procedurale applicata risulta corretta. L'anticorpo utilizzato dal kit Chlamydia Rapid Test Device è in grado di rilevare tutti i sierotipi attualmente noti.

3.10.2 Raccolta e preparazione dei campioni

Per la raccolta di **campioni maschili di liquido seminale**:

- 1 ml di liquido seminale devono essere posti all'interno di un contenitore sterile.
- La conservazione dei campioni di liquido seminale deve avvenire per un massimo di 72 ore in frigorifero.

Per la raccolta dei **campioni maschili di urina**:

- 20 ml della prima urina del mattino, che contengono le più elevate concentrazioni dell'antigene di *Chlamydia trachomatis*, devono essere posti in un apposito contenitore sterile.
- Dopo avere miscelato il campione di urina capovolgendo il contenitore occorre inserire 20 ml del campione di urina in una provetta per centrifuga, aggiungere 10 ml di acqua distillata e poi centrifugare a 3.000 rpm per 15 minuti.
- Scartare il supernatante, tenendo la provetta capovolta e rimuovere qualsiasi traccia di supernatante dal bordo della provetta tamponando con carta assorbente.

Essendo la qualità dei campioni di fondamentale importanza, per l'esecuzione del test i campioni andrebbero processati il prima possibile dopo la raccolta. In alternativa i campioni di urina possono essere conservati in frigorifero (2-8°C) per 24 ore. Prima dell'analisi è necessario lasciare riequilibrare tutti i campioni, il test ed i reagenti a temperatura ambiente (15-30°C).

3.10.3 Reagenti e materiali

Il test contiene particelle rivestite con l'anticorpo contro *Chlamydia trachomatis* e anticorpi contro il patogeni adesi alla membrana.

I materiali forniti dal kit sono rappresentati da:

- Dispositivi di analisi
- Provette di analisi
- Punte contagocce
- Tamponi sterili
- Pipette quantitative
- Reagente A (NaOH 0,2 M)
- Reagente B (HCl 0,2 N)

3.10.4 Indicazioni d'uso per i campioni maschili di urina

Chlamydia Rapid Test Device su urina maschile mostra una specificità > 99% ed una sensibilità pari al 90,9%.

Dopo avere riempito la pipetta quantitativa per il Reagente B fino alla linea contrassegnata (200 μ l), aggiungere il Reagente B al pellet di urina nella provetta per centrifuga, quindi aspirare e spingere il liquido ripetutamente con una pipetta per miscelare vigorosamente finché la sospensione non risulta omogenea. Tutta la soluzione presente nella provetta per centrifuga deve essere trasferita nella provetta di estrazione. A questo punto lasciare riposare per 1 minuti.

In seguito tenendo il flacone del Reagente A in posizione verticale, dispensare 300 μ l (5 grandi gocce) nella provetta di estrazione. Per miscelare la soluzione agitare tramite vortex. Lasciare riposare 2 minuti. Infine è necessario inserire la punta contagocce sulla sommità della provetta di estrazione per poi posizionare il dispositivo di analisi su una superficie piana pulita e dispensare 100 μ l (3 grandi gocce) della soluzione estratta nel pozzetto del campione (S) del dispositivo di analisi. E' importante evitare la formazione di bolle d'aria nel pozzetto del campione (S) (Figura 22). Dopo 10 minuti è possibile leggere il risultato, valutando la comparsa della linea colorata o linee colorate.

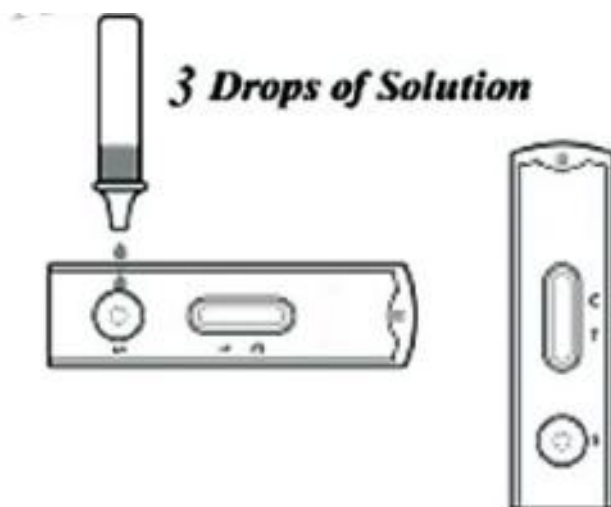


Figura 22. Caricamento delle tre gocce della soluzione estratta nel pozzetto del campione (S).

3.10.5 Indicazioni d'uso per i campioni maschili di liquido seminale

Il kit Chlamydia Rapid Test Device non prevede l'utilizzo di liquido seminale per l'esecuzione del test rapido pertanto la metodica da utilizzare per valutare la prestazione del Chlamydia Rapid Test Device nella rilevazione di *Chlamydia trachomatis* a partire da campioni di liquido seminale è stata concordata direttamente con la ditta Innovacon produttrice del kit.

Tenendo il flacone del Reagente A in posizione verticale, dispensare 300 µl (5 gocce) nella provetta di estrazione. Il Reagente A è incolore. In seguito occorre bagnare il tampone sterile nel contenitore sterile contenente il liquido seminale di partenza per poi inserire immediatamente il tampone nella provetta di estrazione, comprimere il fondo della provetta, ruotare il tampone per 15 volte e lasciare riposare per 2 minuti.

Poi riempire la pipetta quantitativa per il Reagente B fino alla linea contrassegnata (200 µl) e poi dispensare il Reagente B nella provetta di estrazione. Il Reagente B è di colore giallo torbido. In seguito comprimere il fondo della provetta e ruotare il tampone per 15 volte finché la soluzione non assume un colore limpido tendente al verde/blu; se nel campione di partenza vi è sangue la soluzione assumerà una colorazione gialla. Lasciare poi riposare 1 minuto. Infine premere il tampone contro le pareti della provetta e rimuovere il tampone comprimendo energicamente la provetta, cercando di trattenere la maggiore quantità possibile di liquido all'interno della provetta. Inserire la punta contagocce sulla sommità della provetta di estrazione per poi posizionare il dispositivo di analisi su una superficie piana pulita e dispensare 100 µl (3 grandi gocce) della soluzione estratta nel pozzetto del campione (S) del dispositivo di analisi. E' importante evitare la formazione di bolle d'aria nel pozzetto del campione (S). Dopo 10 minuti è possibile leggere il risultato, valutando la comparsa della linea colorata o linee colorate.

3.10.6 Interpretazione dei risultati

- A. **POSITIVO**: se compaiono due linee colorate distinte: una linea deve trovarsi nell'area del controllo (C) ed una nell'area del test (T). Anche una linea debolmente colorata nell'area del test deve essere considerata come indice di un risultato positivo.
- B. **NEGATIVO**: se compare solo una linea colorata nell'area del controllo (C) ma non compare alcuna linea colorata nell'area del test (T).
- C. **NON VALIDO**. Se non compare la linea colorata nell'area di controllo (C). Questa situazione
I risultati vanno interpretati 10 minuti dopo avere inserito le tre gocce nel pozzetto del campione (S)
(Figura 23).

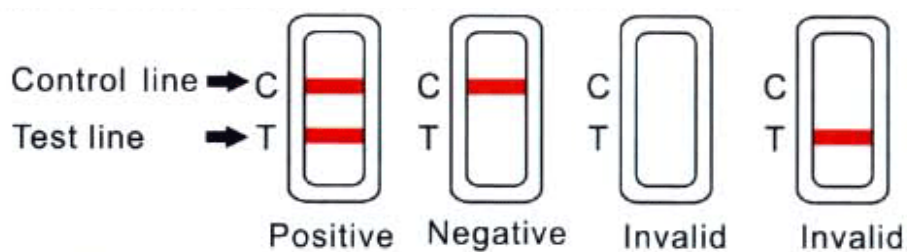


Figura 23. Interpretazione dei risultati.

4. RISULTATI

4.1 Correlazione tra le metodiche

Per l'analisi dei risultati, la Real-Time PCR è stata considerata come il metodo di riferimento per la diagnosi dell'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, pertanto se essa indicava un risultato positivo i campioni sono stati considerati positivi all'infezione, allo stesso modo se la Real-Time PCR forniva un risultato negativo i campioni sono stati considerati negativi.

L'analisi è iniziata considerando come unica matrice per ambedue le metodiche (biomolecolare e immunocromatografica) il solo liquido seminale pertanto sono stati analizzati in questo modo i primi 106 campioni maschili. All'interno di essi sono stati individuati 3 campioni positivi all'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, i quali però per mezzo del test rapido basato sul principio immunocromatografico (Chlamydia Rapid Test Device) sono risultati essere falsi negativi.

Vista la presenza di risultati falsamente negativi con l'applicazione della metodica immunocromatografica su liquido seminale per i successivi individui maschili che facevano richiesta di un'analisi biomolecolare per l'individuazione di *Chlamydia trachomatis* e degli altri patogeni è stato preso in considerazione, anche un campione di urina per l'esecuzione del Chlamydia Rapid Test Device.

In quanto l'urina, secondo il kit Chlamydia Rapid Test Device della ditta Innovacon utilizzato per l'analisi immunocromatografica presentava specificità e sensibilità particolarmente alte, quindi l'obiettivo era quello di valutare se lo stesso test applicato però su matrici differenti mostrasse delle differenze in termini di sensibilità e di specificità. Mentre per l'esecuzione della Real-Time PCR ha continuato ad essere considerato unicamente il liquido seminale.

Quindi all'interno degli ultimi 114 campioni considerati in questo elaborato di tesi, con la metodica di riferimento sono stati individuati 8 soggetti positivi all'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, corrispondente ad una prevalenza 7.9% (IC 99%, 3-12.9%), i quali sono tutti risultati falsamente negativi con l'esecuzione di Chlamydia Rapid Test Device su liquido seminale, mentre applicando il medesimo test su urina maschile 3 degli 8 sono risultati positivi, invece i restanti 5 sono risultati essere dei falsi negativi.

La sensibilità e la specificità del Chlamydia Rapid Test Device applicato su urina sono risultate pari, rispettivamente, al 37,50% (95% IC, 8.52-75.51%) e al 100% (95% IC, 96.58-100.00%). Mentre l'applicazione del test rapido su campioni di liquido seminale ha prodotto una sensibilità dello 0% (95% IC, 0.00-28.49%) ed una specificità del 100% (95% IC, 98.25-100.00%).

I dati ottenuti dal confronto tra Real Time PCR e Chlamydia Rapid Test Device applicato su liquido seminale sono riportati nella tabella 1; mentre la tabella 2 mostra i risultati ottenuti dal confronto tra Real-Time PCR e Chlamydia Rapid Test Device quest'ultima svolta su campioni di urina maschile.

		REAL TIME PCR		TOTALE
		<u>POSITIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>	
T E S T RAPIDO	<u>POSITIVO</u>	0	0	0
	<u>NEGATIVO</u>	11	209	220
TOTALE		11	209	220

Tabella 1. Risultati del confronto tra Chlamydia Rapid Test Device applicato su liquido seminale e Real-Time PCR.

		REAL TIME PCR		TOTALE
		<u>POSITIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>	
T E S T RAPIDO	<u>POSITIVO</u>	3	0	3
	<u>NEGATIVO</u>	5	106	111
TOTALE		8	106	114

Tabella 2. Risultati del confronto tra Chlamydia Rapid Test Device applicato su urina e Real-Time PCR.

4.2 Prevalenza dell'infezione nel campione

Gli individui, da cui provenivano i campioni di liquido seminale, sono stati in totale 220, all'interno dei quali 11 sono risultati positivi all'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis* con il metodo di riferimento ovvero la Real-time PCR. Quindi la prevalenza dell'infezione in soggetti maschili di età compresa tra i 15 e i 67 anni nella provincia di PU è risultata pari al 5% (99% IC, 4.4-11.6%). Precisamente dei 220 individui totali: 37 avevano un'età compresa tra i 15 e i 24 anni (16,81 %) e 5 di essi sono risultati positivi all'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis*, 56 individui presentavano un'età compresa tra i 25 e i 34 anni (25,45 %) e 4 di questi sono risultati positivi all'infezione, mentre 70 avevano un'età compresa tra i 35 e i 44 anni (31,81 %) ed all'interno di questa fascia di età non sono stati riscontrati soggetti positivi all'infezione. Infine 57 individui possedevano un'età superiore ai 45 anni (25,90 %), e tra questi solo due uomini sono risultati positivi all'infezione. La prevalenza di *Chlamydia trachomatis* è risultata più elevata tra i soggetti di età 15-24 anni 13,51% (95% IC, 4.54- 28.77%) rispetto a quelli di età superiore. Infatti si può osservare un decremento della prevalenza all'aumentare dell'età (Figura 24).

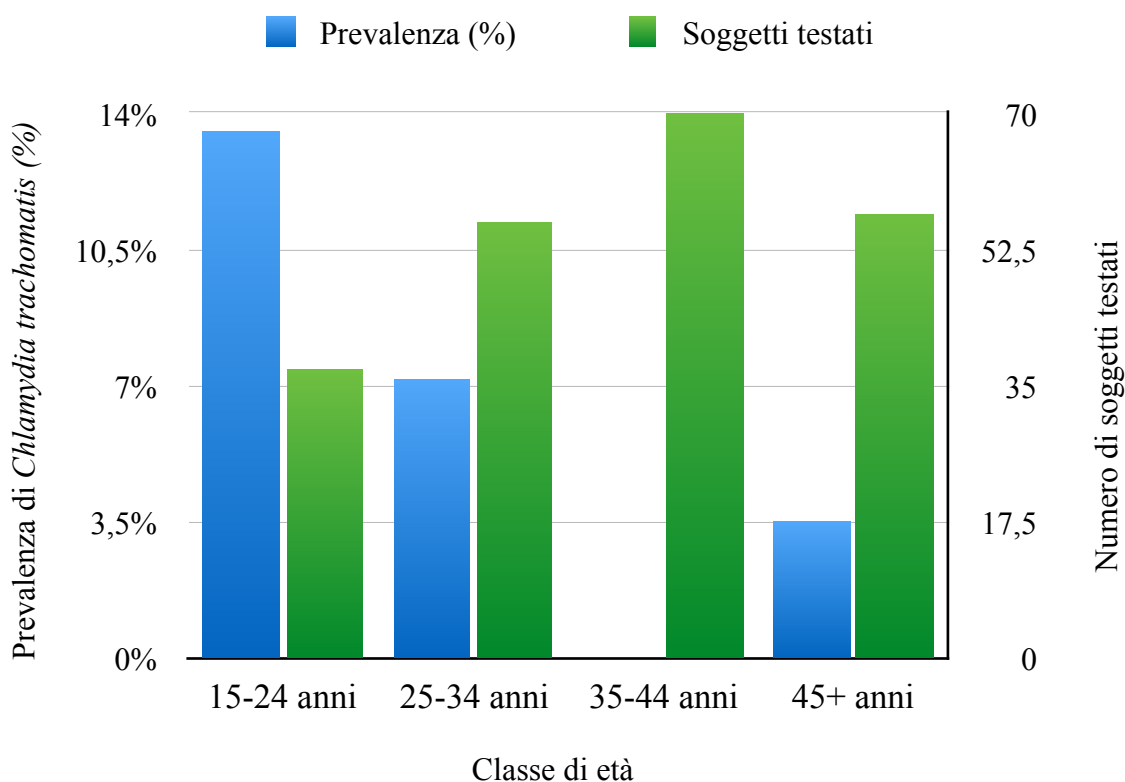


Figura 24. Prevalenza dell'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis* per fasce di età. A destra sono indicati i valori relativi al numero di soggetti testati, mentre a sinistra sono riportati i valori relativi alla prevalenza, espressi in percentuale, di *Chlamydia trachomatis* nelle varie fasce di età dei soggetti testati.

Per quanto riguarda la prevalenza, nel campione considerato quindi nei 220 soggetti maschili di età compresa tra i 15 e i 67 anni della provincia di PU, delle altre infezioni determinate sempre attraverso l'analisi biomolecolare, essa risulta essere pari al 7,73 % (95% IC, 4.57-12.08%) per *Gardnerella vaginalis* ed allo 0.45 % (95% IC, 0.01-2.51%) sia per *Neisseria Gonorrhoeae* che per *Trichomonas vaginalis*.

4.3 Associazione di *Chlamydia trachomatis* con altre infezioni delle vie genitali maschili

Con l'obiettivo di valutare eventuali associazioni, dell'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, con altre patogeni responsabili di infezioni che coinvolgono le vie genitali maschili, per ognuno dei 220 individui considerati in questo lavoro di tesi, sono stati presi in considerazione i risultati dell'analisi biomolecolare completa quindi volta all'identificazione anche di *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Gardnerella vaginalis* ed anche i risultati delle relative spermocolture. Le ricerche eseguite nell'ambito della spermocoltura mirano all'identificazione di: Enterobatteri, Pseudomonas, Stafilococchi, Streptococchi, Emolifi, Mycoplasma Hominis, Ureaplasma Urealyticum, Candida ed altri lieviti.

Degli 11 pazienti risultati positivi all'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis*, 4 (36%) risultavano positivi anche a *Ureaplasma Urealyticum*, 2 (18 %) anche a *Candida Albicans*, al contrario i restanti 5 (46%) non presentavano associazioni con altre infezioni identificabili mediante esame colturale. Inoltre, nessuno degli 11 mostrava positività per le altre infezioni identificate mediante analisi biomolecolare (Figura 25).

- Nessuna associazione con altri patogeni
- Associazione con *Candida Albicans*
- Associazione con *Ureaplasma Urealyticum*

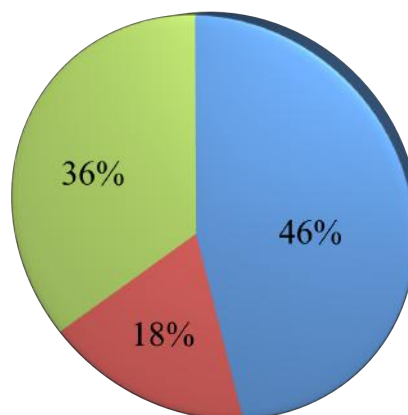


Figura 25. Rappresentazione grafica dell'associazione di *Chlamydia Trachomatis* con altre infezioni delle vie genitali maschili.

I risultati delle spermocolture e dell'analisi biomolecolare completa, di tutti i 220 pazienti, hanno permesso di definire la distribuzione dei vari patogeni, responsabili di infezioni che interessano le vie genitali maschili, nel campione considerato (Figura 26 e Figura 27).

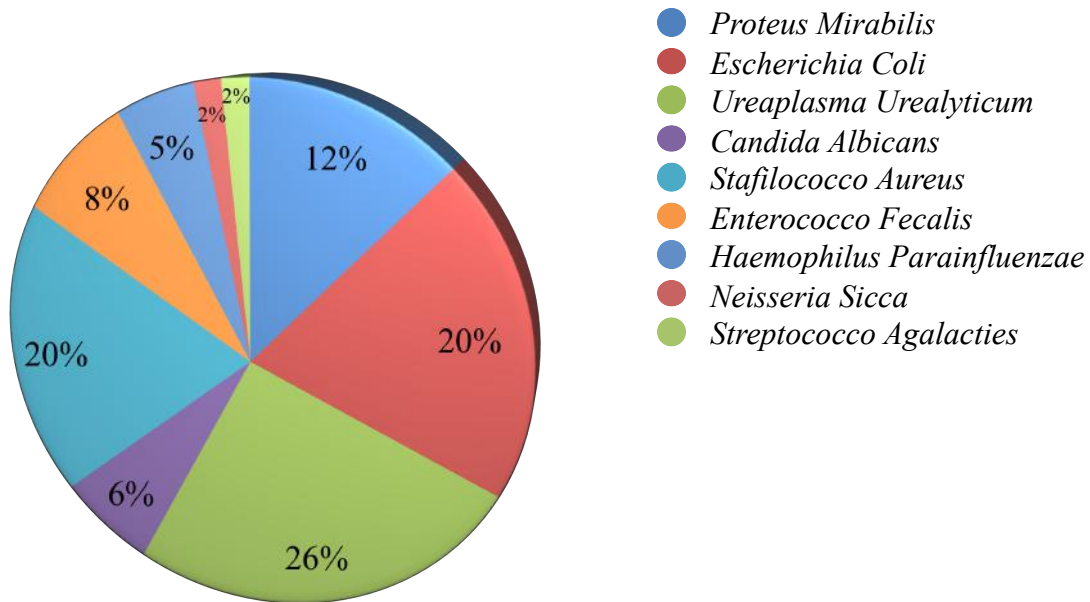


Figura 26. Distribuzione, espressa in percentuale, dei patogeni identificabili mediante spermocoltura, nel campione considerato.

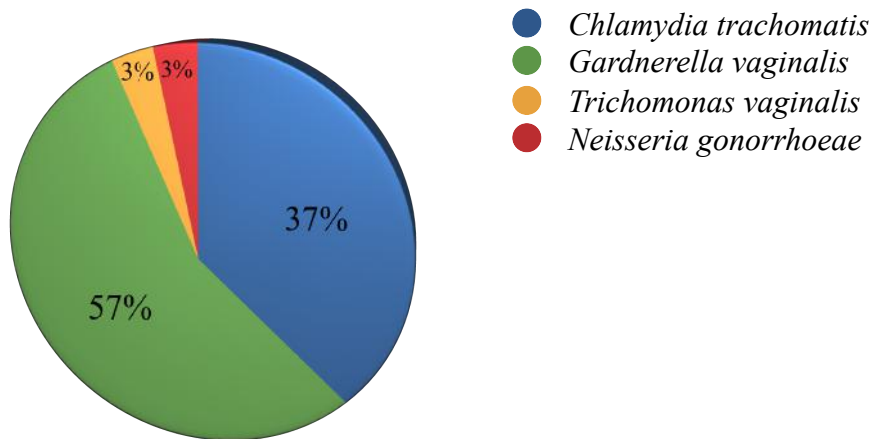


Figura 27. Distribuzione, espressa in percentuale, dei patogeni identificabili mediante analisi biomolecolare, nel campione considerato.

5. DISCUSSIONE

Gli esami diagnostici volti all'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, includono sia metodi diretti che metodi indiretti, e sono indicati in pazienti con sintomi urogenitali, anorettali e oculari, pazienti con ITS differenti da *Chlamydia trachomatis* ed individui considerati a rischio, ad esempio per via del contatto con individui infetti o potenzialmente tali.

Chlamydia trachomatis rappresenta un batterio intracellulare obbligato che infetta le cellule epiteliali e i fibroblasti [66]. A causa dell'interazione con un numero elevato di fattori ospiti e di microbi commensali, la replicazione nelle cellule ospiti infette, varia considerevolmente e nel caso di infezioni asintomatiche e persistenti può essere molto bassa. Pertanto, il rilevamento diretto di *Chlamydia trachomatis* richiede un test ad alta sensibilità. Tra tutte le tecniche diagnostiche, i metodi diagnostici di amplificazione degli acidi nucleici sono i test più sensibili rappresentando quindi il "gold standard" nella rilevazione di *Chlamydia trachomatis* in differenti campioni biologici.

Tuttavia, soprattutto negli ultimi tempi, sono stati sviluppati dei test diagnostici rapidi in grado di rilevare velocemente gli antigeni di *Chlamydia trachomatis* fornendo un risultato in pochi minuti [50, 54].

In questo lavoro di tesi sono state eseguite ambedue queste metodiche su i medesimi campioni con l'obiettivo di mettere in luce vantaggi e svantaggi di ognuna e di valutare se il test rapido Chlamydia Rapid Test Device, possa rappresentare uno strumento efficace nella gestione dell'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis*.

Il principale vantaggio dei test rapidi, per la rilevazione dell'antigene di *Chlamydia trachomatis*, è rappresentato dall'estrema rapidità di esecuzione e di conseguenza di refertazione rendendo possibile fornire un risultato, esclusivamente qualitativo, al paziente in circa 30 minuti. I test rapidi sono, inoltre, molto semplici da eseguire e non necessitano di particolari attrezzature o di personale specializzato. Infatti, potenzialmente, possono anche essere eseguiti nello studio del medico.

Tuttavia, il test rapido immunocromatografico, applicato su liquido seminale, ha mostrato una sensibilità deludente pari allo 0% (95% IC, 0.00%-128,49%). Mentre nel caso dell'urina la sensibilità del test aumenta leggermente 37,50 % (95% IC, 8.52%-75.51%) ma in ogni caso Chlamydia Rapid Test Device mostra una sensibilità insufficiente per poter essere raccomandato come test di screening e come metodica diagnostica per individuare *Chlamydia trachomatis* in soggetti sintomatici e asintomatici. La sensibilità rappresenta un fattore critico nell'ambito dell'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, infatti il pericolo principale correlato all'applicazione di questa metodica diagnostica, caratterizzata da una bassa sensibilità, è proprio dovuto all'identificazione di risultati falsi

negativi che permettono alla malattia di diffondersi ulteriormente e di ritardare l'inizio della terapia, rendendo molto probabili le conseguenti complicazioni. E' molto probabile che le scarse prestazioni del Chlamydia Rapid Test Device possano essere correlate al carico microbico, infatti la rilevazione di *Chlamydia trachomatis* mediante l'applicazione di questo test dipende strettamente dal numero di organismi presenti nel campione. Il carico microbico varia per ogni paziente potendo essere influenzato dai metodi di raccolta dei campioni e da fattori associati al paziente, quali età, storia clinica relativa a ITS, presenza di sintomi o altro. Il livello minimo di rilevazione di questo test dipende strettamente dal sierotipo.

La differenza di sensibilità tra il test rapido eseguito su campioni diversi (urine e liquido seminale) è probabilmente il risultato della differenza di carica batterica in questi campioni.

Inoltre, il fatto che alcuni campioni provenienti dallo stesso paziente fornissero un risultato positivo con l'applicazione di Chlamydia Rapid Test Device su urina ed un risultato falso negativo con l'applicazione del test rapido su liquido seminale è probabilmente riconducibile anche al quantitativo di campione di partenza, certamente più elevato nel caso dell'urina (20-30 ml) rispetto al liquido seminale (1 ml circa), al fatto che i campioni di liquido seminale fossero molto spesso contaminati da sangue (la presenza di sangue può alterare i risultati, come riportato dal kit del test rapido utilizzato) ma anche dalla metodica utilizzata unita alle caratteristiche intrinseche dei due fluidi biologici, infatti nel caso dei campioni di urine, questi essendo sottoposti ad un processo di centrifugazione, determinano una concentrazione che, in alcuni casi, favorisce una successiva rilevazione del patogeno. Al contrario, nel caso del liquido seminale, esso è fisiologicamente composto prevalentemente da una parte plasmatica che favorisce una dispersione, non contrastata da una procedura di centrifugazione e quindi questo potrebbe compromettere la rilevazione di *Chlamydia trachomatis*.

Inoltre, Chlamydia Rapid Test Device non è utile per determinare gli esiti dei trattamenti terapeutici in quanto l'antigene può persistere in seguito alla terapia antibiotica.

Anche la qualità dei campioni è di fondamentale importanza infatti ad esempio la presenza di sangue può determinare dei risultati errati.

Invece la specificità di Chlamydia Rapid Test Device, si è dimostrata eccellente, sia su urina 100% (95% IC, 96.58-100.00%) che su liquido seminale 100% (95% IC, 98.25-100.00%) non determinando l'identificazione di risultati falsi positivi che possono essere motivo di stress psicologico e di un trattamento non necessario.

Allo stesso modo Chlamydia Rapid Test Device non ha prodotto risultati non validi, infatti con entrambe le matrici, urine e liquido seminale, compariva sempre la linea del controllo procedurale interno.

Un'altro vantaggio dei test rapidi è rappresentato dal fatto che sono piuttosto economici infatti il costo per l'esecuzione del Chlamydia Rapid Test Device presso il *Laboratorio di Analisi Cliniche Biolab* è di circa 10 euro.

Queste mie conclusioni sono avvalorate da numerosi studi presenti in letteratura. Tra questi, è possibile citare l'analisi eseguita nel 2016 da N. S. Abbai-Shaik, in cui sono state valutate le prestazioni diagnostiche del kit Chlamydia Rapid Test Device (Innovacon) applicato su campioni di urina maschile. Le prestazioni del kit Chlamydia Rapid Test Device sono state confrontate con saggio BD ProbeTec ET PCR in una popolazione costituita da 100 uomini asintomatici. Nonostante tutti gli uomini avessero risultati di test rapidi e di PCR validi. Il test ha mostrato una bassa sensibilità in relazione alla PCR (20%) (IC 95% 3,7-6,2%); al contrario la specificità osservata è stata molto alta (100%) (IC a un lato: 97,5%: 96,0-100). Questi risultati sottolineano come il test rapido basato sul principio immunocromatografico non rappresenti un'alternativa diagnostica affidabile per la rilevazione di *Chlamydia trachomatis* [67].

Anche nel 2014, Hurly D. S et al. hanno eseguito uno studio con l'obiettivo di valutare le prestazioni cliniche di due test rapidi Chlamydia point-of-care (POC) confrontandoli con un test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT) considerato come il gold standard. I test rapidi valutati sono stati Chlamydia Rapid Test (CRT, Diagnostics for the Real World) e Chlamydia Rapid Test Device (ACON) entrambi eseguiti su campioni di urine maschili. Complessivamente sono stati 226 gli uomini considerati. Il primo test rapido Chlamydia Rapid Test (Diagnostics for the Real World) ha mostrato una sensibilità del 41,4% (I.C 95% 23,5%- 61%) e una specificità del 89,0% (I.C 95% 82,2%- 93,8%). Mentre il test Chlamydia Rapid Test Device (ACON) ha mostrato sensibilità e specificità, rispettivamente, del 43,8% (95% IC 19,8%- 70,1%) e del 98,3% (95% IC 93,9%- 99,8%). Entrambi i test erano assolutamente insensibili a carichi di organismi inferiori a 1000 (log = 3) per ml di urina [68].

E' interessante anche citare lo studio svolto, nel 2010, da van Dommelen et al. che mostra in modo convincente i problemi associati all'utilizzo di alcuni test rapidi per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*. In questo studio sono stati esaminati tre kit con il marchio CE (Conformité Européenne) disponibili in commercio confrontando i risultati con l'attuale gold standard, ovvero un test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT). Gli autori descrivono le prestazioni diagnostiche dei test rapidi come "prestazioni allarmanti", in particolare in termini di sensibilità e valore predittivo positivo. I risultati evidenziano anche il fatto che un marchio CE non rappresenti una garanzia di accuratezza diagnostica. Questo studio pone l'accento sulla discrepanza esistente tra i valori di specificità e sensibilità realmente ottenibili nella pratica clinica e quelli riportanti nel kit dalla ditta

produttrice. Questi risultati sottolineano la necessità di ottenere una buona garanzia della qualità dei test rapidi, soprattutto in considerazione della loro disponibilità anche su internet e quindi del fatto che alcuni individui potrebbero ricorrere all'auto diagnosi [69].

Una performance migliore, del test rapido per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*, è stata riportata in uno studio del 2009 svolto da Wisniewski CA. ed al. nel quale è stato utilizzato il FirstBurst, un dispositivo per la raccolta delle urine che consente di raccogliere i primi 4-5 ml di urina e produce un campione con un carico di organismo di *Chlamydia trachomatis* sei volte più alto rispetto al normale contenitore di urina mediante PCR quantitativa (32.533 vs 5.271 plasmidi/ml; $P < 0,0001$). Di conseguenza, l'uso di FirstBurst per la raccolta di un campione di urina ha migliorato la sensibilità del test rapido per la rilevazione di *Chlamydia trachomatis* rispetto ai test rapidi di campioni raccolti con un normale contenitore di urina, precisamente: l'82% di sensibilità contro il 47% di sensibilità utilizzando la PCR come riferimento [70].

Non sono invece presenti evidenze scientifiche riguardanti l'applicazione del test rapido su campioni di liquido seminale.

E' importante anche sottolineare che i valori di specificità e sensibilità cambiano in relazione al kit per il test rapido utilizzato, questo parametro deve essere tenuto in considerazione dai vari laboratori, confrontando la specificità e la sensibilità dei vari kit, prima scegliere quello da utilizzare a scopo diagnostico.

Al contrario la metodica molecolare di riferimento (Real-Time PCR) presenta un'indiscutibile sensibilità e specificità, ampiamente confermate in letteratura.

Per mezzo di tale metodica, infatti, è possibile individuare una specifica regione del genoma di *Chlamydia trachomatis* permettendo una diagnosi precisa anche in quei campioni in cui il parassita può avere scarsa o nulla vitalità oppure carica microbica molto bassa. Infatti, è proprio in questi casi che si determinano le condizioni cliniche sfavorevoli (latenza, asintomaticità e cronicizzazione), che sono alla base dell'elevata incidenza del contagio.

Attraverso la metodica molecolare, completamente automatizzata eseguita con il kit *artus CT/NG QS-RGQ* (QIAGEN), è stato possibile identificare contemporaneamente *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, direttamente da liquido seminale. *Neisseria gonorrhoeae* rappresenta un altro importante patogeno sessualmente trasmesso la cui incidenza è più che raddoppiata nel corso degli ultimi anni soprattutto nei giovani di età compresa tra i 15 e i 24 anni e i cui sintomi non sono clinicamente distinguibili da quelli causati da *Chlamydia trachomatis*. Una corretta diagnosi delle infezioni purulente sessualmente trasmesse dovrebbe, quindi, sempre tenere presenti entrambi i patogeni. Inoltre a partire dagli stessi campioni di liquido seminale di partenza, con la stessa metodica

ed utilizzando kit adeguati e specifici è stato possibile valutare la presenza anche di *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*.

L'approccio diagnostico, proposto dal *Laboratorio di Analisi Cliniche Biolab*, che prevede di eseguire su tutti i campioni analisi biomolecolare completa (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*) e spermicoltura è risultato particolarmente utile in quanto, come confermato dai risultati ottenuti, spesso l'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis* si associa ad altre infezioni che coinvolgono il tratto genitale maschile e che sono identificabili mediante spermicoltura. Allo stesso modo, l'esecuzione anche di una spermicoltura può favorire la diagnosi di infezioni a carico dei genitali maschili che hanno delle manifestazioni cliniche in comune con *Chlamydia trachomatis*. Quindi anche in questo caso una diagnosi accurata e un trattamento terapeutico mirato e precoce risultano fondamentali.

Altri vantaggi rilevanti della metodica molecolare, eseguita con gli strumenti QIASymphony SP/AS e RotoGene Q Mdx 5plex HRM, sono rappresentati dal fatto che essendo un processo completamente automatizzato, il rischio di contaminazioni ed di eventuali errori da parte dell'operatore sono notevolmente ridotti. Inoltre, potendo essere eseguita direttamente su campioni di liquido seminale o eventualmente di urina, evita il ricorso a prelievi invasivi (tamponi uretrali).

Le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici, però, non sono esenti da alcuni svantaggi come il fatto che poiché vengono solitamente eseguite nei laboratori centrali, implicano un trasporto dei campioni e un conseguente ritardo nella comunicazione dei risultati. Infatti i risultati vengono generalmente comunicati dopo circa 5 giorni. Pur essendo metodiche completamente automatizzate, per l'esecuzione richiedono comunque personale preparato, competente e specializzato nelle tecniche di biologia molecolare. Inoltre, l'analisi biomolecolare presenta un costo piuttosto elevato. I prezzi stabiliti dal *Laboratorio di Analisi Cliniche Biolab* sono i seguenti:

- 86 euro circa per indagine molecolare completa (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*) e spermicoltura.
- 30 euro circa per indagine molecolare volta all'identificazione solo di *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

In conclusione, il test rapido *Chlamydia Rapid Test Device*, ha mostrato delle prestazioni diagnostiche ben al di sotto dei livelli dichiarati dai produttori ma concordi con le evidenze scientifiche presenti in letteratura. In particolare, è possibile affermare che il liquido seminale non rappresenta un'alternativa valida ed affidabile, alle matrici previste dal kit utilizzato, per l'identificazione di *Chlamydia trachomatis*.

A prescindere dal fluido biologico considerato è comunque improbabile che questo test diagnostico sia utile in differenti contesti clinici a causa della bassa sensibilità quindi dell'elevata percentuale di falsi negativi.

Le metodiche di amplificazione di acidi nucleici (NAAT) continuano a rappresentare il metodo più accurato per diagnosticare l'infezione sostenuta da *Chlamydia trachomatis* ed il loro costo elevato è comunque giustificato dall'utilizzo di kit e strumenti di ottima qualità, in grado di fornire dei risultati affidabili. Infatti considerando le differenze in termini specificità e sensibilità delle due metodiche considerate possiamo osservare come il rapporto qualità- prezzo sia migliore nella metodica biomolecolare.

Una diagnosi accurata dell'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, richiede l'utilizzo di tecniche di laboratorio altamente specifiche e sensibili, ma è altrettanto importante una diagnosi precoce e accessibile soprattutto alle categorie più a rischio.

Pertanto, sarebbe utile lo sviluppo di test rapidi immunocromatografici dotati di una maggiore specificità e sensibilità, soprattutto per poter essere applicati nelle zone caratterizzate da un'alta prevalenza dell'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis*, come i Paesi in via di sviluppo, in cui l'accesso ai test di amplificazione degli acidi nucleici può essere limitato. Allo stesso modo lo sviluppo di test rapidi specifici e sensibili potrebbe favorire la loro promozione come test di screening gratuiti, rivolti alle categorie più a rischio all'interno della popolazione, come i giovani di età compresa tra i 15 e i 24 anni. Infatti la disponibilità dei risultati del test entro un'ora, consentirebbe un trattamento immediato e la tracciatura dei contatti riducendo potenzialmente i rischi relativi ad infezioni persistenti o alla trasmissione.

Attualmente, l'arma principale che abbiamo contro l'infezione provocata da *Chlamydia trachomatis* rimane comunque la prevenzione.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Randolph M, Foxman N, Foxman B. *Evolutionary approaches to sexually transmitted infections*. Ann N Y Acad Sci 2011; 1230: 1-3.
2. Diez M, Diaz A. *Sexually transmitted infections: epidemiology and control*. Rev Esp Sanid Penit 2011; 13(2): 58-66.
3. http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp
4. Elwell C, Mirrashidi K, Engel J. *Chlamydia cell biology and pathogenesis*. Nat Rev Microbiol. 2016 Jun; 14(6):385-400.
5. Bush RM, Everett KD. *Molecular evolution of the Chlamydiaceae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001 Jan; 51(Pt 1):203-20.
6. Caldwell HD, Judd RC. *Structural analysis of chlamydial major outer membrane proteins*. Infect Immun 1982; 38: 960-8.
7. Su H, Watkins NG, Zhang YX, et al. *Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin*. Infect Immun 1990; 58: 1017-25.
8. Sun G, Pal S, Sarcon AK, et al. *Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis*. J Bacteriol 2007; 189: 6222-35.
9. Dautry-Varsat A, Balana ME, Wyplosz B. *Chlamydia-host cell interactions: Recent advances on bacterial entry and intracellular development*. Traffic 2004; 5: 561-70.
10. Engel JN. *Azithromycin-induced block of elementary body formation in Chlamydia trachomatis*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36(10): 2304-9.
11. Mpiga P, Ravaoarinoro M. *Chlamydia trachomatis persistence: An update*. Microbiol Res 2006; 161: 9-19.

12. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, et al. *Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis*. Science 1998; 282(5389): 754-9.
13. Wyrick PB. *Intracellular survival by Chlamydia*. Cell Microbiol 2000; 2: 275- 82.
14. Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, et al. *The Chlamydia trachomatis Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor*. Infection and Immunity 2008; 2273–83.
15. Thomas NS, Lusher M, Storey CC, Clarke IN. *Plasmid diversity in Chlamydia* Microbiology. 1997 Jun;143 (Pt 6):1847-54.
16. Palmer L, Falkow S. *A common plasmid of Chlamydia trachomatis*. Plasmid 1986; 16(1): 52-62.
17. 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 Mar; 23(2):144-8.
18. Christian L. Althaus, Katherine M. E. Turner, Boris V. Schmid, Janneke C. M. Heijne, Mirjam Kretzschmar, and Nicola Low. *Transmission of Chlamydia trachomatis through sexual partnerships: a comparison between three individual-based models and empirical data*. J R Soc Interface. 2012 Jan 7; 9(66): 136–146.
19. Jonsson M, Karlsson R, Persson K, Juto P, Edlund K, Evander M, Gustavsson A, Bodén E, Rylander E, Wadell G. *The influence of sexual and social factors on the risk of Chlamydia trachomatis infections: a population-based serologic study*. Sex Transm Dis. 1995 Nov-Dec;22(6): 355-63.
20. Holmes KK, Levine R, Weaver M. *Effectiveness of condoms in preventing sexually transmitted infections*. Bull World Health Organ 2004; 82(6): 454-61.
21. Sarah Huffam, Eric P F Chow, Charussri Leeyaphan, Christopher K Fairley, Jane S Hocking, Samuel Phillips, Sepehr N Tabrizi, Clare Bellhouse, Catriona S Bradshaw, Glenda Fehler, Su-

- zanne M Garland and Marcus Y Chen. *Chlamydia Infection Between Men and Women: A Cross-Sectional Study of Heterosexual Partnerships*. Open Forum Infect Dis. 2017 Summer; 4(3): ofx160.
22. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chlamydia/symptoms-causes/syc-20355349>
23. van Duynhoven YT, Ossewaarde JM, Derksen-Nawrocki RP, et al. *Chlamydia trachomatis genotypes: correlation with clinical manifestations of infection and patients' characteristics*. Clin Infect Dis 1998; 26(2): 314-22.
24. Hu VH, Harding-Esch EM, Burton MJ, et al. *Epidemiology and control of trachoma: systematic review*. Trop Med Int Health 2010; 15(6): 673-91.
25. Mehrdad Mohammadpour, Mojtaba Abrishami, Ahmad Masoumi, and Hassan Hashemi. *Trachoma: Past, present and future*. J Curr Ophthalmol. 2016 Dec; 28(4): 165–169.
26. Taylor HR, Burton MJ, Haddad D, West S, Wright H. *Trachoma*. Lancet. 2014 Dec 13;384(9960):2142-52.
27. Viswalingam ND, Wishart MS, Woodland RM. *Adult chlamydial ophthalmia (paratrachoma)*. Br Med Bull. 1983 Apr; 39(2):123-7.
28. Stevens-Simon C, Sheeder J. *Chlamydia trachomatis: Common misperceptions and misunderstandings*. J Pediatr Adolesc Gynecol 2005; 18: 231-43.
29. Cunningham KA, Beagley KW. *Male genital tract chlamydial infection: Implications for pathology and infertility*. Biol Reprod 2008; 79: 180-9.
30. Gonzales GF, Munoz G, Sanchez R, et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. Andrologia 2004; 36: 1-23.
31. Moazenchi M, Totonchi M, Salman Yazdi R, Hratian K, Mohseni Meybodi MA, Ahmadi Panah M, Chehrazi M, Mohseni Meybodi A. *The impact of Chlamydia trachomatis infection on sperm parameters and male fertility: A comprehensive study*. Int J STD AIDS. 2018 Apr;29(5): 466-473.

32. Jennings LK, Krywko DM. *Pelvic Inflammatory Disease (PID)*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
33. Amor B. *Chlamydia and Reiter's syndrome*. Br J Rheumatol. 1983 Nov;22(4 Suppl 2):156-60.
34. Vilppula AH, Yli-Kerttula UI, Ahlroos AK, Terho PE. *Chlamydial isolations and serology in Reiter's syndrome*. Scand J Rheumatol. 1981;10(3):181-5.
35. Rizzo A, Domenico MD, Carratelli CR, Paolillo R. *The role of Chlamydia and Chlamydophila infections in reactive arthritis*. Intern Med. 2012;51(1):113-7. Epub 2012 Jan 1.
36. M Rihl, L Köhler, A Klos, and H Zeidler. *Persistent infection of Chlamydia in reactive arthritis*. Ann Rheum Dis. 2006 Mar; 65(3): 281–284.
37. Mabey D, Peeling RW. *Lymphogranuloma venereum*. Sex Transm Infect 2002; 78: 90-2.
38. Christerson L, de Vries HJ, de Barbeyrac B, et al. *Typing of lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis strains*. Emerg Infect Dis 2010; 16(11): 1777-9.
39. Riera-Monroig J, Fuertes de Vega I. *Lymphogranuloma venereum presenting as an ulcer on the tongue*. Sex Transm Infect. 2018 Dec 15.
40. Stoner BP, Cohen SE. *Lymphogranuloma Venereum 2015: Clinical Presentation, Diagnosis, and Treatment*. Clin Infect Dis. 2015 Dec 15.
41. Schattner A, Hanuka N, Sarov B, Bentwich Z. *Chlamydia trachomatis and HIV infection*. Immunol Lett. 1994 Apr;40(1):27-30.
42. Joel Fleury Djoba Siawaya. *Chlamydia trachomatis, Human Immunodeficiency Virus (HIV) Distribution and Sexual Behaviors across Gender and Age Group in an African Setting*. PLoS One. 2014; 9(12): e115365.
43. Rank RG, Ramsay KH, Pack EA. *Effect of gamma interferon on resolution of murine chlamydial genital infection*. Infect Immun. 1992;60:4427–9.

44. Malinverni R. *The role of cytokines in chlamydial infections*. Curr Opin Infect Dis. 1996;9:150–5.
45. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, Fierer J, Stephens RS, Kagnoff MF. *Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis*. J Clin Invest. 1997 Jan 1; 99(1):77-87.
46. Morrison SG, Morrison RP. *The protective effect of antibody in immunity to murine chlamydial genital tract reinfection is independent of immunoglobulin A*. Infect Immun. 2005 Sep; 73(9): 6183-6.
47. Zdrowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Puciło K. *The immunology of Chlamydia trachomatis*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2003; 51(5):289-94.
48. Ward ME, Ridgway G. Chlamydia. In: Collier L, Balows A, Sussman A. Topley and Wilsons microbiology and microbial infection. 9th ed. New York: Oxford University Press Inc; 1999. pp. 1331–6.
49. Max A Chernesky. *The laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections*. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 Jan-Feb; 16(1): 39–44.
50. Black CM. *Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections*. Clin Microbiol Rev 1997; 10(1): 160-84.
51. Stamm WE, Harrison HR, Alexander ER, Cles LD, Spence MR, Quinn TC. *Diagnosis of Chlamydia trachomatis infections by direct immunofluorescence staining of genital secretions. A multicenter trial*. Ann Intern Med. 1984 Nov;101(5):638-41.
52. Jalgaonkar SV, Pathak AA, Thakar YS, Kher MM. *Enzyme immunoassay for rapid detection of Chlamydia trachomatis in urogenital infections*. Indian J Sex Transm Dis. 1990; 11(1):23-6.
53. Khan ER, Hossain MA, Paul SK, et al. *Molecular diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection by polymerase chain reaction*. Mymensingh Med J 2011; 20(3): 362-5.

54. Thomas Meyer. *Diagnostic Procedures to Detect Chlamydia trachomatis Infections*. Microorganisms. 2016 Sep; 4(3): 25.
55. Santos CG, Sabidó M, Leturiondo AL, Ferreira CO, da Cruz TP, Benzaken AS. *Development, validation and testing costs of an in-house real-time PCR assay for the detection of Chlamydia trachomatis*. J Med Microbiol. 2017 Mar;66(3):312-317.
56. Lourdes Mahilum-Tapay, Vivian Laitila, James J Wawrzyniak, Helen H Lee, Sarah Alexander, Catherine Ison, Alison Swain, Penelope Barber, Ines Ushiro-Lumb, Beng T Goh. *New point of care Chlamydia Rapid Test—bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study*. BMJ. 2007 Dec 8; 335(7631): 1190–1194.
57. Treharne JD. Infection. *Chlamydia trachomatis: serological diagnosis*. 1982;10 Suppl 1:S25-31.
58. <http://www.agenziafarmaco.gov.it/content/nuove-linee-guida-oms-il-trattamento-di-clamidia-gonorrhea-e-sifilide>
59. C, Qureshi A. *Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: A meta-analysis of randomized clinical trials*. Sex Transm Dis 2002; 29(9): 497-502.
60. Nelson HD, Helfand M. *Screening for chlamydial infection*. Am J Prev Med. 2001 Apr; 20(3 Suppl):95-107.
61. de la Maza LM, Zhong G, Brunham RC. *Update on Chlamydia trachomatis Vaccinology*. Clin Vaccine Immunol. 2017 Apr 5;24(4).
62. Hafner LM, Timms P. *Development of a Chlamydia trachomatis vaccine for urogenital infections: novel tools and new strategies point to bright future prospects*. Expert Rev Vaccines. 2018 Jan;17(1):57-69.
63. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/>
64. <https://www.cdc.gov/std/stats16/chlamydia.htm>

65. <http://www.epicentro.iss.it/clamidia/studi>
66. Mishori R, McClaskey EL, WinklerPrins VJ. *Chlamydia trachomatis* infections: screening, diagnosis, and management. *Am Fam Physician*. 2012 Dec 15;86(12):1127-32.
67. Abbai-Shaik NS, Reddy T, Govender S, Ramjee G. *Poor Performance of the Chlamydia Rapid Test Device for the Detection of Asymptomatic Infections in South African Men: A Pilot Study*. *J Sex Transm Dis*. 2016;2016:8695146. doi: 10.1155/2016/8695146. Epub 2016 Apr 19.
68. Hurly D.S., Buhrer-Skinner M., Badman S.G., Bulu S., Tabrizi S.N., Tarivonda L., Muller R. *Field evaluation of the CRT and ACON chlamydia point-of-care tests in a tropical, low-resource setting*. *Sex. Transm. Infect.* 2014;90:179–184. doi: 10.1136/sextrans-2013-051246.
69. van Dommelen L1, van Tiel FH, Ouburg S, Brouwers EE, Terporten PH, Savelkoul PH, Morr  SA, Bruggeman CA, Hoebe CJ. *Alarmingly poor performance in Chlamydia trachomatis point-of-care testing*. *Sex Transm Infect.* 2010 Oct;86(5):355-9. doi: 10.1136/sti.2010.042598.
70. Craig A. Wisniewski, John A. White, Claude-Edouard C. Michel, Lourdes Mahilum-Tapay, Jose Paolo V. Magbanua, Elpidio Cesar B. Nadala, Jr., Penelope J. Barber, Beng T. Goh, and Helen H. Lee. *Optimal Method of Collection of First-Void Urine for Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infection in Men*. *J Clin Microbiol.* 2008 Apr; 46(4): 1466–1469.

