

Valutazione preliminare dei risultati di un nuovo test molecolare per la ricerca di microrganismi correlati a infezioni sessualmente trasmesse

Manuela Avolio, Maria Luisa Modolo, Shamanta Grosso, Graziano Bruschetta, Paola Zigante, Nilla Tosoni, Rita De Rosa, Paola Stano e Alessandro Camporese
SOC di Microbiologia Clinica e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Maria degli Angeli - Pordenone

Background. Le infezioni sessualmente trasmesse (IST) costituiscono un gruppo di malattie infettive molto diffuso in tutto il mondo. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), circa 499 milioni di nuovi casi di IST causate da protozoi o batteri si verificano ogni anno nel mondo in soggetti di età compresa tra i 15 e i 49 anni. Premesso che diversi casi di infezione sono spesso misconosciuti, in quanto asintomatici, rappresentando così un potenziale *reservoir* che favorisce l'inconsapevole estendersi del fenomeno, il controllo e la prevenzione di queste infezioni rappresentano obiettivi prioritari di sanità pubblica, soprattutto per le numerose complicanze che esse possono provocare. Per questo motivo l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ha raccomandato di migliorarne la sorveglianza e il controllo. Le più comuni IST che interessano l'apparato urogenitale maschile e femminile sono spesso correlate a una serie di microrganismi (*Chlamydia trachomatis*, CT; *Neisseria gonorrhoeae*, NG; *Trichomonas vaginalis*, TV; *Mycoplasma genitalium*, MG; *Herpes virus 1e 2*, HV; *adenovirus*, AD). Altri microrganismi, tra i quali micoplasmi/ureaplasmi (*Mycoplasma hominis*, MH; *Ureaplasma urealyticum*, UU; *Ureaplasma parvum*, UP) hanno dimostrato fino ad oggi un ruolo controverso nella patogenesi di malattie sessualmente trasmesse, principalmente per il loro esteso ruolo di colonizzanti. La diagnostica di molti tra questi agenti eziologici di malattia è spesso *labour intensive* e afflitta da concrete difficoltà in termini di efficacia analitica. Per questo motivo, da diversi anni sono state introdotte alcune tecniche molecolari in grado di evidenziare con la massima sensibilità possibile almeno i microrganismi più rilevanti, mentre gli organismi internazionali stanno da tempo sottolineando l'importanza di estendere questa tecnologia anche ad altri microrganismi, la cui diagnostica era fino ad oggi rappresentata essenzialmente dall'esame culturale. Con queste premesse, l'idea di implementare nel nostro laboratorio l'utilizzo di nuovi metodi analitici sempre più sensibili si correla non solo al ruolo di *hub* e di riferimento diagnostico in ambito provinciale, ma anche al ruolo che esso svolge, insieme ad altri 13 in Italia, nell'ambito del progetto di sorveglianza sulle IST, coordinato dal Centro Operativo AIDS (COA) dell'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con il Gruppo di lavoro "Infezioni Sessualmente Trasmesse" dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani. Il presente studio si basa sull'analisi dei dati dei primi due mesi di utilizzo in routine di un nuovo test molecolare, una real-time PCR multiplex one-step (AnyplexTM II STI-7, Seegene, Korea), in grado di rilevare 7 microrganismi potenzialmente responsabili di IST, compresa la differenziazione di MG, MH, UU, UP.

Figura 1: distribuzione dei campionamenti e delle positività nel periodo considerato

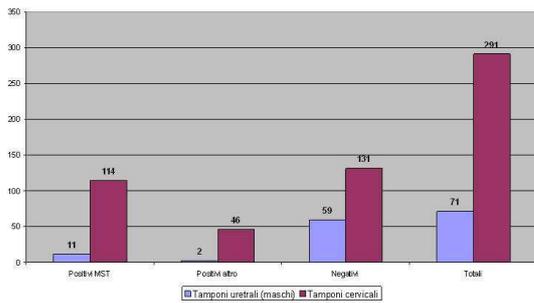


Figura 2: distribuzione microrganismi rilevati in 291 campioni cervicali

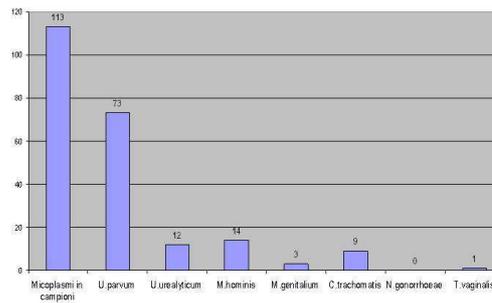
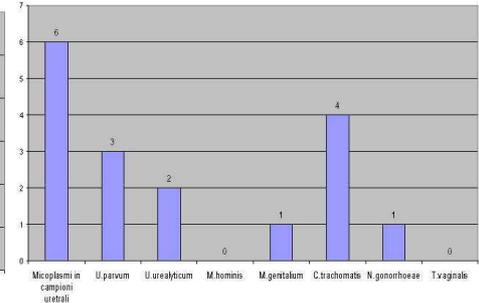


Figura 3: distribuzione microrganismi rilevati in 71 campioni uretrali



Materiali e metodi. Tutti i 362 campioni (endocervicali e uretrali) prelevati nei primi due mesi di utilizzo del metodo (17 Dicembre 2012 – 15 Febbraio 2013) sono stati analizzati con AnyplexTM II STI-7, indipendentemente dall'anamnesi e dalla sintomatologia rilevata, con lo scopo di valutare la distribuzione dei 7 agenti eziologici di infezione sia nei pazienti sintomatici che asintomatici. Nel presente studio, sono stati valutati i risultati preliminari ottenuti su 71 prelievi uretrali e su 291 prelievi endocervicali eseguiti rispettivamente in pazienti maschi e femmine, correlandoli con i dati anamnestici e i sintomi clinici rilevati dall'esame obiettivo eseguito nell'ambulatorio di microbiologia dai medici dell'Unità Operativa. Nelle donne risultate positive per micoplasmi e ureaplasmi, si è inoltre correlata la specie rilevata con la fisiologia dell'ambiente vaginale. La valutazione dell'eventuale dismicrobismo/vaginosi è stata possibile mediante l'associazione tra Nugent score e i criteri clinici di Amsel. Per l'esecuzione del nuovo test, i prelievi sono stati eseguiti utilizzando sonde flocate e terreno liquido UTM (Copan, Italia), che consente un'ottimale conservazione e recupero dei *target* genomici ricercati, oltre a migliorare la gestione e il *sorting* dei campioni, rendendo possibile anche l'utilizzo diretto della provetta primaria per le successive fasi analitiche e l'automazione della fase preanalitica. Tutti i risultati di CT ottenuti con STI 7 sono stati confrontati nella stessa seduta analitica con quelli di un test di riferimento (COBAS TaqMan CT test v.2.0, Roche Diagnostics, Italia), in uso presso il nostro laboratorio, in grado di rilevare anche la variante nVCT di CT. Tutti i dati analitici, insieme alle notizie anamnestiche e cliniche dei pazienti, sono stati archiviati su file excel per l'elaborazione e l'incrocio delle diverse componenti analitiche e cliniche emerse dallo studio.

Risultati e discussione. Su 71 campioni di secreto uretrale esaminati nel periodo considerato, 11 (15.4%) sono risultati positivi per almeno uno dei *target* esaminati, mentre su 291 campioni di secreto endocervicale, si sono ottenute 114 (39.1%) positività (Figura 1). Nelle Figure 2 e 3 è riportata graficamente la distribuzione dei microrganismi riscontrati nel periodo, rispettivamente in campioni cervicali e uretrali. Da un punto di vista strettamente analitico, vale la pena evidenziare *in primis* la netta prevalenza di UP (84.5%), rispetto a UU (15.5%), sul totale di 90 *Ureaplasma spp.* rilevati sia in campioni cervicali che uretrali. A conferma che l'esame culturale, attualmente ovunque utilizzato per la rilevazione *Ureaplasma urealyticum* (o più correttamente *Ureaplasma spp.*), non è in realtà in grado di distinguere correttamente le due specie sottese. Sempre da un punto di vista analitico, tutti i 13 casi di infezione da CT sono stati confermati con entrambi i metodi a confronto, anche se AnyplexTM II STI-7, come tutte le real-time PCR multiplex sembra dimostrare, come atteso, una minore sensibilità per il *target* genomico, quando espresso in bassa concentrazione. Da un punto di vista epidemiologico, si è constatato un consistente riscontro, peraltro attono, di micoplasmi urogenitali. Tale rilievo, insieme all'evidenza di una discreta frequenza di associazione tra specie diverse nei prelievi esecuti a livello cervicale, è in buona parte ascrivibile al ruolo ormai consolidato di commensali opportunisti di questi microrganismi. Tra essi, come si è detto, spicca la percentuale di UP sul totale dei 125 campioni positivi (60.8%), a cui seguono UU e MH (entrambi 11,2%) e MG (3.2%). Rispetto al totale dei positivi, tra gli altri 3 *target* ricercati, CT ha dimostrato una prevalenza del 10.4%, NG e TV del 0.8% (Figura 2 e 3). Un caso di infezione uretrale da CT è risultato associato a positività anche per MG, a dimostrazione della potenziale trasmissione per via sessuale di questo microrganismo, fino ad oggi scarsamente ricercato, in quanto rilevabile solo con metodi molecolari. Da un punto di vista clinico, oltre all'evidenza di due casi asintomatici di infezione da CT su 13 positività rilevate (15.3%), a conferma dell'importanza di eseguire lo *screening* su tutti i pazienti sessualmente attivi, si segnala anche un caso di infezione da NG rilevata solo con AnyplexTM II STI-7, nonostante la presenza di sintomatologia specifica, in quanto il ceppo non è stato in grado di crescere in coltura, perché il paziente aveva già iniziato la terapia antibiotica con ceftriaxone prima dell'esecuzione del prelievo.

Nella grafica della Figura 4 è stata rappresentata la distribuzione di micoplasmi e CT in tre classi cliniche individuate: asintomatici, sintomatici e pazienti infertili. A fronte della forte correlazione tra presenza di MG e sintomatologia, giova rilevare l'altrettanto frequente associazione tra sintomi clinici e infezione da CT e UP, con una distribuzione nei pazienti asintomatici praticamente identica. MH, come ampiamente riferito in letteratura, è stato riscontrato in associazione solo a quadri sintomatici riferibili a dismicrobismo/vaginosi e quasi sempre in associazione ad altri micoplasmi. Si noti, tra l'altro, che nessun caso di infezione da MH è stato evidenziato in campioni uretrali (Figura 3). UU, talora rilevato in concomitanza con altri micoplasmi, è apparso scarsamente associato a sintomi clinici, mentre si è riscontrato relativamente spesso, insieme a UP e CT, in pazienti infertili. Per cercare di comprendere meglio la potenziale correlazione tra l'evidenza di micoplasmi urogenitali e i più frequenti quadri clinici rilevati, nella Figura 5 si è proceduto a rappresentare graficamente la loro distribuzione, con l'esclusione di MH, apparso fortemente correlato solo a dismicrobismo e vaginosi. Per quanto riguarda MG, come si è già detto, tutti i casi rilevati hanno dimostrato una correlazione con la presenza di sintomatologia. La maggior parte, peraltro, di MG (66.6%) è stata riscontrata in pazienti con dismicrobismo/vaginosi, una circostanza finora scarsamente rilevata in letteratura. Giova ricordare, peraltro, che tale circostanza è considerata un importante fattore di rischio per l'acquisizione di malattie sessualmente trasmissibili, tra cui anche quelle da CT. Probabilmente tale situazione aumenta anche il rischio di acquisire MG. Quanto riguarda la distribuzione di UP e UU, indistinguibili con l'esame culturale, sono emerse alcune differenze sostanziali, che potrebbero aprire inedite prospettive e nuovi possibili scenari per quanto attiene il ruolo eziologico, fino ad oggi estremamente controverso, di questi due microrganismi. Se i casi riscontrati in tamponi uretrali sono ancora troppo limitati per offrire qualche considerazione in merito, quelli ottenuti in tamponi cervicali, per numerosità e distribuzione, offrono qualche spunto di analisi. Da questi risultati preliminari sembra, infatti, emergere un ruolo maggiormente significativo per UP, rispetto a UU, con una forte presenza di UU in pazienti totalmente asintomatici (50%) rispetto a UP (20.5%). Rispetto a UU, la presenza di UP è apparsa correlarsi molto intimamente con la vaginosi sintomatiche (30.1% versus 83%), mentre nelle pazienti sintomatiche senza vaginosi i due microrganismi sono apparsi distribuiti più o meno uniformemente (47.9 e 41.7%). In una notevole percentuale di casi (44.4%) si è riscontrata un'associazione di entrambi i microrganismi, che è apparsa frequente in pazienti infertili (11.1%). Ciò che spesso sembra distinguere, però, le infezioni da UP rispetto a quelle da UU, è la frequente associazione di UU con altri micoplasmi, a fronte invece un'elevata percentuale di casi nei quali si è rilevata una presenza isolata di UP, sempre rapportata a quadri sintomatici, con una contestuale dimostrazione di un *Cycle Threshold* (CT) tendenzialmente basso, espressione di elevata concentrazione del *target* nel campione. Con tutti i limiti riferibili al ridotto periodo di analisi, dalla presente sperimentazione sembrano peraltro emergere alcuni dati degni di rilievo, e alcuni spunti che aprono nuove prospettive di lavoro, soprattutto per quanto riguarda l'inquadramento delle infezioni da micoplasmi urogenitali, sul cui ruolo eziologico in diversi contesti clinici fino ad oggi non esistono, se non elementi assolutamente contraddittori. Nonostante il limitato numero di pazienti analizzati, l'ipotesi di utilizzare il metodo in tutti i pazienti sessualmente attivi, si è già confermata una scelta sicuramente da perseguire, sia per motivi di prevenzione e salute pubblica, sia per meglio inquadrare prospetticamente le infezioni da micoplasmi urogenitali. Per quanto riguarda l'aspetto di prevenzione è stato, infatti, possibile dimostrare due casi di infezione uretrale asintomatica da CT, su un totale di 13 infezioni (15.3%), mentre si è potuta confermare un'infezione da NG in corso di terapia, non rilevabile con l'esame culturale. Un aspetto molto rilevante dell'utilizzo del nuovo metodo è apparso, però, proprio quello correlato alla possibilità di offrire in prospettiva una migliore interpretazione delle infezioni genitali da micoplasmi. MG sembrerebbe confermarsi un agente eziologico importante, ed effettivamente trasmissibile per via sessuale. Un caso di positività per MG riscontrata contestualmente a CT sembra, infatti, rappresentare un ottimo presupposto per confermare il medesimo meccanismo di trasmissione. MH non sembra, come atteso, per nulla correlato a infezioni uretrali, mentre è apparso sempre strettamente associato, insieme ad altri micoplasmi rilevati contestualmente, a episodi di dismicrobismo/vaginosi, con un probabile ruolo di semplice *innocent bystander*. UP emerge, invece, a differenza di UU, come un possibile, inedito, responsabile di quadri anche rilevanti sotto il profilo clinico. E ciò in considerazione non solo di una sua forte correlazione con i quadri sintomatici, ma soprattutto per il suo riscontro spesso isolato e la presenza di un *Cycle Threshold* quasi sempre basso, che ne escluderebbe il ruolo di semplice colonizzante. In merito a questo aspetto, che riteniamo assolutamente rilevante per meglio inquadrare prospetticamente le infezioni da micoplasmi, soprattutto quando si riscontrino più specie insieme nello stesso campione, bisognerà lavorare per ottenere una quantificazione più precisa dei diversi *target* rilevabili. Solo una più puntuale quantificazione dei *target* consentirà, infatti, di chiarire meglio il ruolo eziologico di alcuni micoplasmi, primo fra tutti UP, il cui attuale nesso con i quadri clinici descritti appare ancora piuttosto controverso.

Figura 5: percentuali di associazione tra i 113 micoplasmi urogenitali rilevati in 291 campioni endocervicali e diversi contesti clinici individuati.

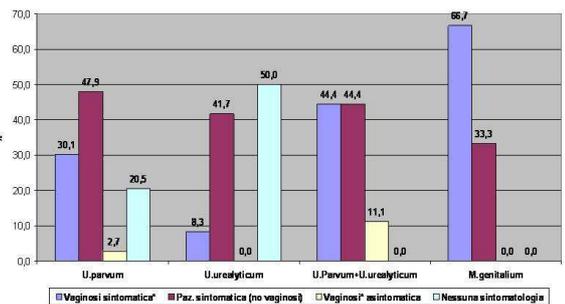
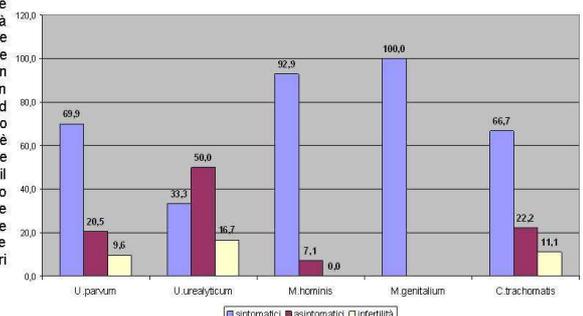


Figura 4: distribuzione percentuale di micoplasmi e Chlamydia in donne sintomatiche, asintomatiche, infertili



Bibliografia

- Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Read T.R., et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, vi-ruses, and the association with orogenital exposure. *J. Infect. Dis.* 193, 338-345, 2006.
- Falk L., Fredlund H., Jensen J.S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex. Transm. Infect.* 81, 73-78, 2005.
- Martin D.H. Nongonococcal urethritis: new views through the prism of modern molecular microbiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10, 128-132, 2008
- Patel MA & Nyirjesy P. Role of Mycoplasma and Ureaplasma species in female lower genital tract infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12, 417-422, 2010.
- Salfa M.C., Regine V., Ferri M., Suligo B. e Rete Sentinella dei Laboratori per le Infezioni Sessualmente Trasmesse. La sorveglianza delle infezioni sessualmente trasmesse basata su una rete di laboratori: 36 mesi di attività. *Notiziario ISS* 25, 10, 7-11, 2012.
- Workowski K.A., Berman S.M. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *MMWR* 17, 59, 1-110, 2010.
- Workowski K.A., Berman S.M. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin. Infect. Dis.* 44, Sup- pl 3, S73-S76, 2011.

