



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE

XXII
CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Titolo della tesi

STUDIO DI UNA PCR MULTITARGET IN REAL TIME PCR PER
LA DIAGNOSI RAPIDA DI MENINGITE

Ipotesi di studio per l'applicazione di un nuovo tipo di sonda molecolare

Nome e Cognome del dottorando
Marco Favaro

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Prof. Dott.ssa Carla Fontana

Coordinatore: Prof. Prof. Giorgio Federici

Indice

1.0 Introduzione	pag. 2
1.1 Considerazioni anatomiche nelle meningiti batteriche	pag. 4
1.2 Eziopatogenesi delle meningiti batteriche	pag. 6
1.3 Epidemiologia della meningite	pag.7
1.4 Tipologia	pag. 9
1.4.1 Meningiti a liquor limpido (generalmente virali)	pag. 9
1.4.2 Meningiti a liquor torbido (generalmente da batteri)	pag. 10
1.4.3 Meningite nel neonato	pag.11
1.4.4 Meningite virale acuta	pag.12
1.4.5 Meningite ad eziologia fungina	pag.12
1.4.5 Meningite acuta da elminti e protozoi	pag.12
1.4.6 Sintomatologia	pag.13
1.4.7 Prognosi	pag.14
2 Meningite batterica	pag.15
2.1 <i>Neisseria meningitidis</i> (meningococco)	pag.16
2.2 <i>Streptococcus pneumonite</i>	pag.19
2.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	pag.20
2.3.1 Sintomi	pag.22

2.3.2	Complicazioni	pag.23
2.3.3	Fattori di rischio	pag.24
2.4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	pag.24
2.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	pag.25
2.5.1	Trasmissione e alimenti a rischio	pag 26
2.5.2	Listeriosi cause ed epidemiologia	pag.26
2.6	<i>Criptococcus neoformans</i>	pag.29
2.6.1	Eziologia e incidenza	pag.29
2.6.2	Sintomi e segni	pag.30
2.6.3	Diagnosi	pag 32
3.0	Accertamento e Diagnosi di Meningite	pag.34
3.1	Diagnosi –inquadramento generale-	pag.34
3.2	Inquadramento generale problematiche	pag.36
3.3	Obiettivi del laboratorio di Microbiologia Clinica	pag.37
3.4	Tecniche non colturali per la diagnosi di laboratorio di infezione	pag.38
3.5	Scopo del nostro studio	pag.39
4.0	Ipotesi di Studio	pag.39
4.1	Analisi dei punti	pag.43
4.2	Studio delle regioni target e scelta del sistema di rivelazione	pag.47

5.0 Razionale	pag 52
6.0 Materiali e Metodi	pag.55
6.1 Preparazione del DNA dei ceppi di riferimento	pag.55
6.2 Reazione di amplificazione	pag.55
7.0 Discussione	pag.63
8.0 Conclusioni	pag.67
9.0 Bibliografia	pag.69

Introduzione

La sindrome meningitica può essere causata da un'ampia varietà di agenti infettivi, ma essere anche una manifestazione ad eziologia non infettiva, è noto che una risposta flogistica meningeo avvenga in risposta a neoplasie o a causa di malattie autoimmuni.

La meningite batterica è l'infezione più comune del Sistema Nervoso Centrale. La sua importanza deriva oltre che dalla sua gravità, l'infezione progredisce rapidamente e può portare a morte, anche dalle conseguenze che può cagionare: danni permanenti e disabilità di vario ordine e grado. E' questo il motivo per cui il solo sospetto di meningite in un paziente causa allarme e forti implicazioni emotive in tutto il personale sanitario coinvolto, dal medico di pronto soccorso al laboratorio chiamato alla diagnosi microbiologica. Proprio per quest'ultimo si pone la necessità di un approccio metodologico basato sulla rapidità, sulla accuratezza e soprattutto sulla scelta di sistemi che siano fortemente sensibili.

1.1 Considerazioni anatomiche nelle meningiti batteriche

La meningite è una infiammazione delle meningi (Pia Madre, Aracnoide e Dura Madre), tre sottili membrane che rivestono intimamente l'Encefalo e il Midollo spinale. In particolare, la meningite nasce all'interno dello spazio subaracnoideo, che si trova tra la media e la più interna delle lamine: l'Aracnoide e la Pia Madre. Le meningi delimitano con il rachide tre spazi distinti: lo spazio epidurale tra la vertebra e la Dura Madre, lo spazio subdurale tra la Dura Madre e l'Aracnoide, e lo spazio subaracnoideale tra l'Aracnoide e la Pia Madre, quest'ultimo è la sede specifica dell'esordio della meningite. I villi (strutture altamente vascolarizzate), della Pia Madre si proiettano in quattro quattro ventricoli all'interno dell'Encefalo e sono rivestiti da cellule epiteliali ependimali. Queste proiezioni sono conosciute come Plessi coronoidei (in pratica un fitto gomito di capillari rivestiti da cellule ependimali fenestrate unite da giunzioni serrate) e sono i siti nei quali la componente fluida del sangue è modificata attraverso secrezione e assorbimento di certi soluti e convogliata all'interno dei ventricoli sotto forma

di liquido cefalorachidiano o liquor. Il liquor circola nei ventricoli e nello spazio subaracnoideale, attorno all'Encefalo e alla Corda spinale e ritorna al sistema circolatorio sanguigno attraverso i villi subaracnoideali, che si proiettano nel Seno Sagittale Superiore nella volta interna del cranio. Negli adulti viene prodotto da 400 a 600 ml di liquor ogni giorno. Il normale volume di liquor è tra i 40 e i 60 ml nei neonati e i 100 e i 160 ml negli adulti.

La meningite viene classicamente classificata in varie forme:

1. FULMINANTE: caratterizzata da una evoluzione rapida in coma e stato di shock non eccezionalmente irreversibile.
2. ACUTA: con esordio e sviluppo della durata di ore o di pochi giorni.
3. SUBACUTA: con decorso lento ed insidioso, più prolungato. Con segni meningei sfumati che, talora, non richiamano l'attenzione del medico (solitamente causata dal bacillo tubercolare oppure da miceti).
4. DECAPITATA: forma il cui decorso e' attenuato per il precoce intervento con terapia antibiotica. Si stima che già dopo solo 30 minuti dalla somministrazione di un antimicrobico la possibilità di recuperare vitali microrganismi causali quali: *Neisseriae meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilis influenzae* sia praticamente ridotta a zero.

5. RICORRENTE: dovuta a ripetuti episodi, anche a distanza di tempo gli uni dagli altri, che sono l'espressione generalmente di un difetto dell'ospite (forme di immunodepressione: meningite di Mollaret, sindrome di Behcet) o dell'anatomia locale ovvero può essere imputabile a precedenti traumi cranici o a procedure neurochirurgiche.

Il tasso di mortalità di questa infezione varia in relazione all'agente infettante, in generale la forma virale è più benigna, mentre quella batterica ha mortalità significativamente maggiore circa il 14 %. Oltre a mettere a rischio la vita, la meningite può causare gravi sequele neurologiche: la forma sostenuta da *Haemophilus influenzae* tipo B ha mortalità molto bassa, ma causa deficit intellettivi in oltre il 30% dei bambini colpiti, mentre la meningite pneumococcica, gravata da alto tasso di letalità, può provocare nei sopravvissuti danni quali: sordità e cecità.

1.2 Eziopatogenesi delle meningiti batteriche

Frequente è la condizione in cui non è facilmente dimostrabile un processo infettivo localizzato o a distanza dalle meningi al quale attribuire la responsabilità primaria della infezione (ad esempio non c'è concomitante batteriemia o viremia sistemica). Oppure è evidenziabile solo una manifestazione secondaria di una infezione contigua parameningea come

otite, mastoidite, ecc. o, infine, la localizzazione “a distanza” tramite il torrente circolatorio, di una qualsiasi altra infezione (endocardite, pleuropolmonite, nefrite, ecc.).

I batteri quindi possono raggiungere le meningi (spazio subaracnoideo) attraverso varie vie:

1. batteriemia sistemica (la più frequente), ingresso diretto dal tratto respiratorio superiore o dalla cute attraverso un difetto anatomico, a causa di traumi post-chirurgici, oppure in seguito ad eventi traumatici (frattura cranica, meningocele, ecc),
2. passaggio intracranico attraverso una venula dal nasofaringe, endocitosi (attraversamento della cellula epiteliale e raggiungimento del microcircolo dermico) come nel caso dei meningococchi, attraverso la via intercellulare con separazione delle giunzioni serrate apicali tra le cellule epiteliali colonnari,
3. per diffusione da focus contiguo di infezione (infezione dei seni paranasali, trasudazione da un ascesso cerebrale, dall'orecchio medio e/o interno),
4. direttamente dalle cavità nasali (solo le meningite da amebe),

5. via linfatica perivenosa, le forme virali sono in gran parte provocate da puntura di insetti (zanzare o flebotomi, detti anche pappataci); più raramente tramite alimenti,

1.3 Epidemiologia della meningite

Ogni anno in Italia si verificano circa 900 casi di meningite batterica. Di questi, circa un terzo sono causati dal meningococco, a questo proposito si sta osservando una inversione di tendenza riguardo il gruppo prevalente: il meningococco di gruppo C sta superando quello di gruppo B come responsabile di meningite, il fatto è dovuto probabilmente alla diffusione della vaccinazione. un altro terzo da pneumococco, mentre il resto dei casi, per oltre la metà, sono sostenuti da *Haemophilus influenzae*. Per quest'ultimo in particolare recentemente sono stati segnalati svariati casi sostenuti da ceppi non capsulati, ciò, probabilmente, anche come conseguenza della vaccinazione massiva della popolazione verso *H.influenzae* tipo b, (precedentemente assai diffuso). L'altra metà (circa un sesto dei casi) è invece causata da altri batteri, quali: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. In Italia l'incidenza di meningite meningococcica, che è quella più contagiosa, è tra i più bassi in Europa. Vengono segnalati

circa 200 casi anno pari a 3 casi ogni 1.000.000 di abitanti, mentre nel resto dell'Europa i casi sono circa 14 ogni 1.000.000 di abitanti. (1)

Si tratta di una malattia infettiva grave, ma curabile se tempestivamente diagnosticata, presenta, tuttavia, una mortalità significativa (14% dei casi), in particolare nella sua forma fulminante, come è accaduto nel caso del focolaio epidemico del Veneto provocato da meningococco di gruppo C.

Negli ultimi 7 anni si sono registrati in Italia 447 casi di meningiti da meningococco di gruppo C con 63 decessi (14%). Dal Gennaio al Settembre di quest'anno sono stati notificati 20 casi di meningite C e 2 decessi (non includendo quelli attuali): dopo un rapido aumento dei casi in Italia tra il 2000 ed il 2005 c'è stata una significativa riduzione dei casi nel 2006-2007 (2), presumibilmente attribuibile all'incremento dell'offerta vaccinale specifica. Si ricorda che il meningococco è un germe abitualmente presente in una significativa proporzione di soggetti che ne sono portatori, in oltre il 10% degli individui è, infatti, presente nelle prime vie respiratorie senza dare alcun problema. Meno dell'1% degli infetti ha, invece, un rischio concreto di sviluppare la malattia. Almeno 2/3 dei casi in Italia sono segnalati come sporadici, mentre non sono rari piccoli focolai epidemici (cosiddetti cluster). Negli ultimi 7 anni abbiamo avuto in Italia 48 piccoli cluster definiti come almeno due casi consecutivi nell'arco di 30 giorni gli uni dagli altri e

manifestatesi in un raggio di 50 Km. La maggioranza di questi cluster si è verificata nelle Regioni del centro-nord. Va anche detto che il focolaio epidemico veneto fu anche il prodotto di una concomitanza accidentale di diversi fattori predisponenti: locali affollati, contatti stretti e presenza di molti individui non vaccinati e provenienti da zone del mondo ad alta incidenza della malattia.

La maggioranza delle persone, quindi, non sviluppa la malattia e solo in casi rari il meningococco supera le difese dell'organismo provocando la meningite. Il contagio avviene da persona a persona con contatti stretti, in ambienti affollati, mentre il batterio non riesce a sopravvivere nell'ambiente, né in alimenti, bevande o su oggetti: per questo non sono efficaci le disinfezioni ambientali e non v'è un rischio epidemico che oltrepassi il circuito dei contatti stretti e dei casi. Anche in questi ultimi eventi lo sviluppo della malattia è prevenibile con l'apposita profilassi antibiotica. Gli episodi epidemici rimangono una minoranza, mentre la maggioranza degli episodi, nel nostro Paese, si presenta come caso sporadico.. Grandi epidemie di meningite sono ancora presenti in Africa, America latina ed Asia, ove, in particolare, è emergente un nuovo patogeno: *Streptococcus suis*, per via soprattutto delle convivenza di questi popoli con la popolazione suina.

1.4 Tipologia

1.4.1 Meningiti a liquor limpido (generalmente virali)

La forma virale è la più lieve, facilmente curabile in 7-10 giorni circa, interessa generalmente giovani adulti. Generalmente non lascia danni. Nella meningite virale l'esame del liquor mostra i linfociti al di sopra della media, le proteine leggermente elevate e il glucosio è prossimo ai livelli normali o poco ridotto. Un esame utile per determinare il tipo di meningite è l'esame dei lattati, nei casi di meningite virale i valori sono normali o moderatamente aumentati.

I sintomi più comuni sono: febbre, rigidità del collo e vomito improvviso indipendentemente dal cibo assunto. E' necessario un breve ricovero ospedaliero, il paziente viene curato soprattutto con riposo a letto, analgesici e antipiretici e solo in casi particolari con l'introduzioni di specifici antivirali. Vi sono anche altre meningiti a liquor limpido che però sono causate da batteri, dette anche subacute perché mostrano sintomi che sono intermedi tra le virali e le batteriche classiche:

Meningite brucellare

Meningite leptospirica

Meningite luetica

Meningite tubercolare

Meningite da *L.monocytogenes*.

1.4.2 Meningiti a liquor torbido (generalmente da batteri)

La meningite batterica si presenta con un ridotto livello del glucosio (al di sotto di 40mg/dl), mentre le proteine aumentano oltre 80-100mg/dl. Come per le meningite virale l'esame dei lattati trova ampia applicazione, un valore significativamente aumentato della concentrazione dei lattati nel liquor (30-35 mg%) depone per una meningite batterica piuttosto che per una meningite di origine virale. Per accertare la presenza di patogeni di natura batterica si analizzano i campioni di liquor con la colorazione di Gram, la probabilità di trovare i microrganismi dipende dalla concentrazione batterica nel liquor: la sensibilità dell'esame microscopico nel campione di

liquor e' pari circa 3000 CFU/ml, nel 70-85%, dei casi di pazienti, l'esito è positivo. L'approccio terapeutico è diverso nelle diverse forme meningee e ovviamente è influenzata dell'agente eziologico Il trattamento antibiotico dura da 7 giorni a 3 settimane, ma alcuni casi possono richiedere tempi più lunghi.

1.4.3 Meningite nel neonato

I principali agenti eziologici sono: *Escherichia coli* K1, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*. *E. coli* K1 si ritrova comunemente nelle vie genitali delle gestanti; il passaggio del feto nel canale del parto infetto può esporre il neonato alla malattia, caratterizzata da batteriemia e meningite. Nei neonati alcuni dei sintomi classici della meningite possono non essere presenti o essere molto sfumati. Caratteristico è, invece, il pianto continuo, l'irritabilità e la sonnolenza al di sopra della norma, nonché lo scarso appetito. A volte si nota l'ingrossamento della testa, soprattutto nei punti non ancora saldati completamente (le fontanelle) ci può essere un evidente rigonfiamento, che può essere palpato e più semplicemente osservato.

1.4.4 Meningite virale acuta

Per quanto riguarda la meningite virale, gli agenti più frequenti sono gli Herpes virus e gli Enterovirus.

1.4.5 Meningite ad eziologia fungina

La meningite di origine fungina si manifesta soprattutto in persone con deficit della risposta immunitaria, come per esempio i malati di Aids, o pazienti in terapia immunosoppressiva e può rappresentare comunque un pericolo per la vita.

1.4.5 Meningite acuta da elminti e protozoi

Le meningiti acute da protozoi sono sostenute principalmente da *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma brucei*. Tuttavia, questi agenti eziologici sono responsabili di quadri altamente pleomorfi a carico del sistema nervoso; le meningiti, infatti, risultano essere provocate dalla diffusione di un quadro più grave di encefalite. Come per queste patologie, i

protozoi sono agenti insoliti di meningite; l'importanza è tuttavia giustificata dalla presenza di malattie gravi nei soggetti immunocompromessi o nel caso di Naegleria dall'esposizioni ad acqua contaminate, è noto il caso italiano di un bambino deceduto per meningite da Naegleria contratta durante un bagno nelle acque del Po

1.4.6 Sintomatologia

Come detto, si distingue la meningite acuta, con insorgenza dei sintomi in meno di 24 ore, rapidamente ingravescenti, da quella cronica, con sintomi presenti da molto più tempo e meno evidenti, generalmente sfumati. Il quadro clinico varia molto in base all'età ed in particolare può essere molto atipico alle età estreme della vita. La sintomatologia tipica nell'adulto è costituita da:

- sintomi soggettivi (cefalea, mialgia, fotofobia, vomito anche senza assunzione di cibo)
- segni obiettivi (febbre elevata, alterazioni della coscienza, rigidità nucale, segno di Brudzinski e di Laseque').

Possono poi essere presenti crisi convulsive generalizzate, deficit di nervi cranici e raramente segni di lesione piramidale. Un paziente con meningite è estremamente sofferente, iperestesico ed a volte assume a letto la posizione a "cane di fucile", in decubito laterale con ginocchia flesse e capo iperesteso.

Chiaramente poi ci sono i segni della malattia di base, batterica o virale, di cui la meningite può essere una complicanza: nella forma meningococcica si associa un quadro di setticemia con alterazioni della coagulazione, petecchie ed emorragie; le forme da pneumococco e *H.influenzae* fanno spesso seguito a otite purulenta, nelle forme croniche spesso sono più rilevanti i segni di ipertensione endocranica. Nell'anziano e nel bambino piccolo il quadro è spesso molto sfumato: febbre scarsa, così come i segni meningei, mentre può essere importante l'alterazione di coscienza.

1.4.7 Prognosi

La letalità della malattia è molto elevata nelle due fasce di età estreme (in soggetti molto giovani e molto anziani). Nei neonati mediamente il tasso di mortalità aggira attorno al 20-30% dei casi di meningite batterica. Già durante l'adolescenza la mortalità scende drasticamente al 2% per poi

creocere nuovamente al 14-37% negli adulti. Il rischio di morte, però, non è unicamente influenzato dall'età del soggetto, ma anche dalla natura eziologia infettiva e dalla durata in cui questo è stato presente nel liquor. Ad esempio l'*H. influenzae* e il meningococco hanno una prognosi migliore rispetto agli Streptococchi di tipo B, batteri gram-negativi e allo *S. pneumoniae*. Negli adulti, la meningite da meningococco ha una minor mortalità (3–7%) della meningite da pneumococco, sempre se diagnostica e trattata tempestivamente. Nei bambini numerose possono essere le disabilità a carico del sistema nervoso dovute all'infezione. Epilessia, sordità e disturbi dell'apprendimento irreversibili, sono riportati in circa il 15% dei soggetti colpiti. Negli adulti la prognosi è positiva nel 66% dei casi in cui si registra assenza o disturbi di lieve entità; la sordità viene riportata nel 14% dei casi, i disturbi cognitivi nel 10%.

2 Meningite batterica

Nonostante numerosi siano i batteri che possono causare meningite, quelli isolati con maggiore frequenza sono: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Criptococcus neoformans*

2.1 *Neisseria meningitidis* (meningococco)

È stato identificato per la prima volta nel 1887, anche se la malattia era già stata descritta nel 1805 nel corso di un'epidemia a Ginevra. I meningococchi sono isolati frequentemente nel nasofaringe o nell'orofaringe di portatori sani. La colonizzazione può persistere per giorni, settimane o mesi e può interessare il 5-15% degli individui. Questa presenza, tuttavia, non è correlata con un aumentato rischio di contrarre la meningite. Un alto tasso di trasmissione può realizzarsi in popolazioni che vivono a stretto contatto così come in tutti gli ambienti comunitari: ambienti militari o comunità studentesche. I meningococchi non sopravvivono al di fuori dell'ospite e non hanno un ospite alternativo all'uomo, di conseguenza la trasmissione dei meningococchi avviene per diretto contatto con le secrezioni respiratorie o con i droplet. È possibile una trasmissione sessuale dei meningococchi che possono in via eccezionale causare infezioni del tratto genitale sia in donne che in omosessuali. I meningococchi possono disseminare dal nasofaringe e causare meningococcemia e successivamente meningite. L'incidenza della meningococcemia è alta in età scolare, (con una frequenza massima al 6° anno di età), tra gli adolescenti e i giovani adulti. In alcuni individui la malattia ha un esordio e una progressione rapida che porta a morte il

soggetto colpito in poche ore dalla comparsa dei sintomi. Circa 3% dei pazienti con meningite meningococcica e' colpito dalla forma fulminante.

La meningococcemia e' generalmente caratterizzata da profondi effetti vascolari con comparsa di petecchie o rash purpureo cutaneo. Circa il 75% degli infetti mostra questi sintomi. Nella forma fulminante (sindrome di Waterhouse-Friderichsen) e' presente una coagulazione intravasale disseminata (CID) che porta alla morte. La meningococcemia puo' anche causare artrite reattiva e più raramente congiuntivite, sinusite endocardite e polmonite primaria. I malati di meningite o altre forme gravi sono considerati contagiosi per circa 24 ore dall'inizio della terapia antibiotica specifica.

Il meningococco può dare origine a focolai epidemici. Per limitare il rischio di casi secondari, è importante che i contatti stretti dei malati effettuino una profilassi con antibiotici. Sono definiti come contatti stretti di un malato:

- i conviventi
- chi ha dormito o mangiato spesso nella stessa casa del paziente
- le persone che nei sette giorni precedenti l'esordio hanno avuto contatti con le secrezioni respiratorie come la saliva (attraverso baci, stoviglie, spazzolini da denti)

- i sanitari che sono stati direttamente esposti alle secrezioni respiratorie del paziente (per esempio durante manovre di intubazione o respirazione bocca a bocca).

La sorveglianza dei contatti è, inoltre, importante per identificare chi dovesse sviluppare febbre e altri sintomi sospetti, in modo da diagnosticare e trattare rapidamente eventuali ulteriori casi. Questa sorveglianza è prevista per 10 giorni dall'esordio dei sintomi del paziente iniziale.

Esistono 13 diversi sierogruppi di meningococco, ma solo 6 (denominati A, B, C, W135, X e Y) causano meningite e altre malattie gravi. In Italia e in Europa i sierogruppi B e C sono i più frequenti.

Non sono ancora disponibili vaccini contro il meningococco del sierogruppo B, sono disponibili dei vaccini polisaccaridici contro i sierogruppi A, C, Y e W 135, che però forniscono una protezione di breve durata ai soli soggetti di età maggiore di 2 anni. E' invece disponibile un vaccino "coniugato" contro il gruppo C, efficace già nel primo anno di vita, che induce una protezione persistente. In alcuni paesi a elevata incidenza è stata introdotta la vaccinazione per tutti i nuovi nati (3,4,5).

2.2 Streptococcus pneumoniae

Lo *Streptococcus pneumoniae*, un tempo chiamato *Diplococcus pneumoniae* e conosciuto comunemente come pneumococco, è un batterio Gram positivo, capsulato, a forma di punta di lancia, con un'estremità più appuntita dell'altra, disposto a coppie. È un germe extracellulare, che deve la sua patogenicità soprattutto all'effetto antifagocitario della capsula, costituita da un complesso polisaccaridico. Il microrganismo possiede tre antigeni: l'antigene capsulare polisaccaridico, l'antigene proteico (proteina M) e l'antigene polisaccaridico della parete batterica. In base agli antigeni polisaccaridici capsulari sono stati identificati circa 103 sierotipi diversi. Lo pneumococco è un batterio commensale delle vie respiratorie superiori dell'uomo, nel quale può causare principalmente polmonite e molti altri processi infettivi come sinusiti, bronchiti, otiti, meningiti, ecc. In particolare lo pneumococco causa circa un terzo di tutte le otiti medie acute e molte delle sinusiti del bambino. Dopo l'otite, la polmonite è l'infezione più frequente. La polmonite pneumococcica si sviluppa più spesso nell'adulto che nel bambino: la sua incidenza viene calcolata fra i 15 e i 25 casi per 100.000 abitanti di tutte le età, mentre sale a oltre 50 casi su 100.000 fra i soggetti in età superiore ai 65 anni. La batteriemia si verifica nel 25-30% dei soggetti con polmonite: la vera e propria sepsi è invece un'evenienza rara. Lo pneumococco è anche una delle

cause principali di meningite purulenta del bambino: la meningite può essere secondaria alla batteriemia o alla flogosi acuta dell'orecchio medio, della mastoide o dei seni paranasali. Lo pneumococco è sensibile alle penicilline: l'antibiotico di prima scelta è ancora la penicillina G. Tuttavia, di recente sono stati isolati in molte parti del mondo pneumococchi resistenti a tale antibiotico: per questo motivo la vaccinazione ad oggi rappresenta un'importante arma di prevenzione (3,4,5)

2.3 Haemophilus influenzae

L'*Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib) è un batterio che causa una serie di malattie cosiddette invasive che possono essere riassunte in:

- meningiti (soprattutto in età pediatrica)
- sepsi o setticemie
- epiglottiti (temibili infezioni che, se non trattate tempestivamente, possono dare soffocamento) altre infezioni gravi.

Le meningiti da Hib, dopo la guarigione, possono lasciare danni permanenti, quali: sordità residua o altre alterazioni del sistema nervoso, in genere lievi,

mentre nei casi gravi le infezioni da Hib (fino al 5 per cento) possono provocare la morte. Questo tipo di malattia è più frequente nei bambini che hanno meno di 5 anni. In alcuni paesi del mondo, in particolare negli Stati Uniti e nei paesi dell'Europa settentrionale, prima dell'introduzione della vaccinazione l'infezione da Hib era causa di un notevole numero di casi di malattia e di decessi. In questi stessi paesi, dopo l'introduzione della vaccinazione, la malattia è praticamente scomparsa. In Italia le infezioni da Hib non sono particolarmente frequenti a confronto con altri paesi. Attualmente, si può stimare che in Italia si verificano circa 100 casi ogni anno nei bambini di età inferiore ai 5 anni. Il numero di infezioni da Hib è drasticamente diminuito dopo l'introduzione dell'uso esteso del vaccino nel nostro paese. La storia di questo germe risale agli ultimi anni del secolo scorso quando si scatenò una caccia al germe che provocava l'influenza. Dopo una grande epidemia mondiale che si verificò nel 1890, uno scienziato tedesco annunciò che aveva scoperto il germe responsabile dell'influenza. Era il 1892. Pfeiffer, questo il nome dello scienziato, lo chiamò *Haemophilus influenzae* e tutti gli scienziati allora impegnati nella ricerca sulle malattie infettive gli dettero credito nonostante l'inoculazione del germe nell'animale non provocasse alcuna malattia. Nel 1918 scoppiò un'altra terribile epidemia di influenza in tutto il mondo. Tutti i medici

cominciarono a cercare *l'Haemophilus influenzae* nelle prime vie respiratorie dei malati, ma, con loro grande sorpresa, il germe si trovava solo in rarissimi casi. Ci vollero diversi anni per capire che l'influenza non era provocata da un batterio, ma da un virus. *Haemophilus influenzae* non cambiò nome, ma ancora oggi molti fanno confusione tra questo germe e il virus dell'influenza.

2.3.1 Sintomi

I sintomi si differenziano secondo la sede colpita dall'infezione. L'Hib può causare un'infezione purulenta in varie sedi; in particolare, si può verificare un'infezione localizzata della pelle con presenza di pus (cellulite). Se c'è un'epiglottite (infiammazione della cartilagine che copre la trachea), il soggetto può accusare:

- febbre alta;
- forte mal di gola con difficoltà a deglutire;
- stato d'ansia, respiro stridente, salivazione aumentata, causate dal gonfiore dell'epiglottide;
- il paziente, inoltre, si pone in genere in posizione verticale con busto proteso in avanti per poter respirare, con ostruzione progressiva che nel giro di poche ore può rendere difficile o impossibile il passaggio dell'aria;

In caso di meningite i sintomi principali sono di tipo neurologico:

- mal di testa violento, nausea e vomito
- febbre;
- stato confusionale, sonnolenza;
- rigidità della nuca, convulsioni.

Questo germe vive nelle vie respiratorie superiori dell'uomo (naso, gola) e si trasmette da persona a persona attraverso le goccioline di saliva e le secrezioni delle vie respiratorie.

2.3.3 Complicazioni

La meningite da Hib nella maggior parte dei casi guarisce senza conseguenze permanenti, tuttavia in alcuni casi può lasciare dei danni cerebrali, e di conseguenza: epilessia, problemi motori e di coordinamento, disturbi dell'udito, disturbi della vista, disturbi comportamentali e del linguaggio. L'epiglottite può essere così grave da rendere necessaria la tracheotomia d'urgenza per ripristinare il passaggio dell'aria.

2.3.3 Fattori di rischio

I soggetti (non vaccinati) più esposti alla meningite da *Haemophilus* sono: i bambini, le persone che vivono in comunità o le frequentano, le persone con un sistema immunitario poco efficiente (immunodepressi) (3,4,5)

2.4 *Streptococcus agalactiae*

Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B, secondo la classificazione di Lancefield, costituiscono una importante causa di seria infezione neonatale caratterizzata da sepsi e meningite. La colonizzazione del tratto genitale materno è associato con la colonizzazione dell'infante ed è rischio di malattia neonatale. L'infezione ad esordio precoce si manifesta nei primissimi giorni di vita ed è spesso associata a polmonite, mentre l'infezione ad esordio tardivo appare in genere dopo una settimana di vita. Gli streptococchi di gruppo B sono anche associati alle infezioni post-parto. Esistono delle condizioni favorevoli la colonizzazione dell'adulto da parte degli streptococchi di gruppo B quali : diabete mellito, cancro e stati di immunodepressione. Negli adulti gli streptococchi di gruppo B possono causare batteriemia, endocarditi, osteomieliti ed infezione della pelle e dei tessuti molli. È il responsabile della malattia ad esordio precoce ed ad esordio tardivo del neonato; la prima è un quadro caratteristico di malattia

sistemica subito dopo il parto (massimo 5 giorni). La seconda può manifestarsi da 1 a 8 settimane dalla nascita. Entrambe le malattie si manifestano con sepsi polmonite e meningite gravi. Il 20% delle donne è portatrice di *S.agalactiae* al termine del parto, con una possibilità di trasmettere il batterio al feto nel 60% dei casi; tuttavia, la malattia è clinicamente evidenziabile nello 0.5-1% dei casi. La diagnosi precoce è molto importante: in caso di isolamento pre parto, occorre sottoporre la donna ad una terapia preventiva a base di penicillina o eritromicina (3,4,5).

2.5 *Listeria monocytogenes*

La *Listeria* è un batterio ubiquitario che può essere presente nel terreno e nelle acque e contaminare e nei vegetali ed in generale negli alimenti lavati con acqua contaminata, e nei prodotti derivati dalla lavorazione del latte. È di forma bastoncellare gram positivo, mobile per la presenza di flagelli, anaerobio facoltativo ed emolitico. Fa parte dei batteri psicotrofi (che sopravvivono a temperature inferiori a 5°C), infatti, ha la caratteristica di mantenere la sua vitalità anche ad una temperatura di 0° ed ha un optimum di crescita di 37-38°C. Il range di PH per la crescita del batterio va da 5 a 10, con un optimum di PH di 7-8. Non sopravvive a PH molto acidi, comunque

da recenti ricerche si è visto che può sopravvivere in terreni con PH di 4,4, può sopravvivere a concentrazioni saline superiori al 20%.(3,4,5)

La *Listeria* non resiste molto bene alle alte temperature, infatti bastano temperature di 70°C per eliminare questo batterio. La *Listeria* si divide in sette specie, delle quali la *L.monocytogenes* causa listeriosi nell'uomo. Si conoscono 10 sierotipi diversi di *L.monocytogenes* tra i quali i più frequentemente isolati nell'uomo, circa il 95 % dei casi sono attribuibili ai sierotipi : 1/2a; 1/2b; 4b e' proprio quest'ultimo il principale responsabile delle meningoencefaliti umane (6). Negli animali, la *Listeria* è stata isolata in molti animali: mammiferi, uccelli, pesci, ecc.

2.5.1 Trasmissione e alimenti a rischio

La via di trasmissione è soprattutto alimentare. Il latte e i latticini sono gli alimenti più a rischio. La pastorizzazione è un processo di sanificazione del latte, che scongiura il rischio di listeriosi. I formaggi più a rischio di presenza del microrganismo sono quelli a pasta molle e prodotti derivati da latte non pastorizzato. Si registra anche la presenza del batterio in frutta, verdura, carne, pesce e dato che il batterio resiste alla refrigerazione, anche nei gelati.

2.5.2 Listeriosi cause ed epidemiologia

La Listeriosi è una malattia alimentare atipica, in quanto presenta un'elevata mortalità. In Europa nel 2004 sono stati documentati 1267 casi, con 107 morti

(pari all'8,4%). Il triste primato mortadella mortalità va alla Svezia ove che su un totale di 44 casi, si sono verificate 18 morti. In Italia ci sono stati soltanto 25 casi notificati senza decessi imputabili noti. La *Listeria* penetra all'interno dell'epitelio intestinale e si moltiplica all'interno del citosol delle cellule. Successivamente viene trasportata nel circolo sanguigno e raggiunge i linfonodi, fegato, polmoni, cervello e placenta. Quest'ultimo particolare è molto importante, infatti anche se la gestante non mostra segni di listeriosi, la listeria può essere trasmessa al bambino attraverso la placenta. La listeriosi in gravidanza può provocare parti prematuri di neonati infetti, meningite neonatale, aborti e morte del neonato. Anche la listeriosi neonatale si può presentare sotto due forme:

-una ad esordio precoce, nel caso in cui la malattia sia stata acquisita nell'utero per via transplacentale (è detta Granulomatosi infantisettica) e presenta un'elevata mortalità;

-una ad esordio più tardivo, quando la malattia viene acquisita all'atto della nascita o subito dopo, quest'ultima forma si manifesta con meningite o meningo-encefalite accompagnata da setticemia. In caso di listeriosi in gravidanza è necessaria un'immediata terapia antibiotica (di solito ampicillina da sola o in combinazione con gentamicina), per scongiurare la trasmissione al feto. La listeriosi nell'adulto si presenta sotto due forme:

- Gastroenterica
- Invasiva

La forma gastroenterica si manifesta a fronte di una dose infettante che può essere pari a 10^3 CFU/gr o ml nell'individuo immunodepresso, e pari a 10^9 ucf/gr o ml per un essere umano normocompetente (7). Ha un tempo di incubazione di 12-24 ore. Colpisce l'apparato gastrointestinale.

La forma più grave è quella invasiva (meningiti, encefaliti e setticemie), è caratterizzata da una bassa dose infettante.

I soggetti più a rischio di listeriosi sono quelle che hanno un sistema immunitario compromesso e la probabilità di essere contagiati dal batterio dipendono proprio dallo stato di salute generale dell'individuo. La popolazione a rischio è rappresentata dai bambini, gli anziani e le donne in gravidanza. Negli adulti la *L.monocytogenes* causa principalmente meningiti encefaliti o setticemia. Le persone più facilmente infettate sono i soggetti immunodeficienti sia per cause naturali che iatrogene (es trattamenti chemioterapici nei pazienti leucemici e nei trapiantati) ovvero come conseguenza di precedenti infezioni virali. Le infezioni da *L.monocytogenes* hanno un alto tasso di mortalità e possono portare come conseguenza sequele neurologiche nei sopravvissuti. Nelle donne in gravidanza l'infezione si accompagna a sintomi simil-influenzali. Se non prontamente individuata e

trattata può causare infezione del liquido amniotico e trasmissione della malattia al feto con morte o parto prematuro

2.6 *Criptococcus neoformans*

2.6.1 **Eziologia e incidenza**

La distribuzione del microrganismo è ubiquitaria. La criptococcosi è un'infezione opportunistica tradizionalmente associata in passato ai pazienti con AIDS. Tuttavia, anche se i pazienti con linfoma di Hodgkin o in generale con linfoma, così come quelli con sarcoidosi o quelli sottoposti a terapia cortisonica a lungo termine sono anch'essi a elevato rischio di contrarre l'infezione. Più di recente, a fronte di numerose segnalazioni d'infezioni anche nel soggetto normocompetente sono state riviste e sfatate queste schematizzazioni. La criptococcosi disseminata progressiva in alcune condizioni colpisce anche i pazienti che non sono dichiaratamente immunocompromessi, più frequentemente uomini di età >40 anni. In tali casi è più frequente la meningite cronica, in genere senza lesioni polmonari clinicamente evidenti. Tipicamente l'infiammazione meningea non è diffusa

e sono presenti microscopiche lesioni intracerebrali multifocali. Possono essere evidenti granulomi meningei e lesioni focali cerebrali più grandi.

2.6.2 Sintomi e segni

Anche se la maggior parte delle infezioni criptococciche ha un decorso autolimitante, subacuto o cronico, infezioni criptococciche AIDS-correlate si possono presentare come una grave polmonite progressiva con dispnea acuta e un quadro radiologico suggestivo per infezione da *Pneumocystis*. Un interessamento cutaneo disseminato può manifestarsi in qualsiasi persona infetta, causando lesioni pustolose, papulari, nodulari o ulcerate, che a volte assomigliano all'acne, o alle lesioni da Virus del mollusco contagioso o al carcinoma basocellulare. Siti focali di disseminazione possono comparire in forma di noduli sottocutanei a livello delle epifisi delle ossa lunghe, delle articolazioni, del fegato, della milza, dei reni, della prostata e di altri tessuti. Nel quadro tipico, i tessuti coinvolti contengono masse cistiche di funghi che appaiono gelatinose a causa del polisaccaride capsulare criptococcico accumulato, ma con reazione infiammatoria acuta minima o del tutto assente, specialmente nel cervello.

Nei polmoni le lesioni primarie sono di solito asintomatiche e autolimitanti. In soggetti immunocompetenti, le lesioni polmonari clinicamente evidenti guariscono a volte spontaneamente senza disseminazione, anche senza terapia antimicotica. La polmonite è caratterizzata di solito da tosse e altri sintomi respiratori non specifici. Forme più gravi come la pielonefrite decorrono raramente e si manifestano con sviluppo di necrosi papillare. Oltre alle lesioni cutanee, le lesioni focali localizzate alle ossa, agli organi addominali o ad altri tessuti di solito non causano sintomi evidenti.

La maggior parte dei sintomi della meningite criptococcica è attribuibile all'edema cerebrale ed è di solito aspecifica, comprendendo cefalea, visione offuscata, confusione mentale, depressione, agitazione o altre alterazioni comportamentali e/o della deambulazione. Ad eccezione delle paralisi oculari o facciali, i segni focali sono rari fino a uno stadio relativamente avanzato dell'infezione. Si può sviluppare cecità per l'edema cerebrale o per diretto coinvolgimento dei nervi ottici. La febbre è di solito bassa e spesso assente. I pazienti con AIDS possono avere sintomi minimi o del tutto assenti e parametri del LCR del tutto normali se non per la presenza di numerose cellule lieviformi caratteristamente tondeggianti e capsulati al batterioscopico. È frequente tuttavia il riscontro di proteinorachia e

pleiocitosi mononucleare, sebbene a volte predomini una neutrofilia. La glicorrachia è per lo più bassa e in molti casi, con l'esame diretto con inchiostro di china, si possono visualizzare blastocellule capsulate formanti gemme a base stretta. L'antigene polisaccaridico capsulare criptococcico è evidenziabile nel LCR e/o nel siero in più del 90% dei casi di meningite.

2.6.3 Diagnosi

La coltura permette una diagnosi definitiva. Molto spesso il LCR, l'escreato e le urine contengono criptococchi e le emocolture possono essere positive nelle infezioni più gravi, particolarmente in associazione alla AIDS. La diagnosi è fortemente sospetta se operatori esperti identificano miceti a forma di gemme incapsulate su strisci di liquidi organici, secrezioni, essudati o altri campioni. In campioni di tessuto fissato i miceti capsulati possono anche essere identificati e confermati come *C. neoformans* tramite colorazione positiva alla mucicarmina o alla colorazione di Masson-Fontana. Il test al latex per antigene capsulare è positivo in campioni di LCR e/o sangue in oltre il 90% dei pazienti con meningite ed è generalmente specifico, nonostante si possano avere dei falsi positivi, di solito con titoli 1:8, specialmente in presenza di fattore reumatoide. Nella criptococcosi

disseminata il *C. neoformans* è frequentemente isolato dalle urine e a volte persistono focolai prostatici dell'infezione nonostante la bonifica del fungo dal SNC (3,4,5)

3 ACCERTAMENTO E DIAGNOSI DI MENINGITE

3.1 Diagnosi–inquadramento generale-

Come per tutte le malattie il primo passo per la diagnosi è sospettarla, ed in questo il quadro clinico e l'anamnesi hanno ruolo centrale. L'esame cardine della diagnostica per l'accertamento di meningite è l'analisi del liquor, con analisi citochimica e colturale. Fondamentale in presenza di edema della papilla o segni di lato eseguire una TAC o RM del cranio per escludere una lesione spazio-occupante, nel qual caso eseguire la rachicentesi è controindicato. Il malato presenta anche una febbre elevata. Sono tre le tipologie di liquor di fronte a cui ci si trova in genere (ma se il paziente è anziano o ha assunto antibiotici il quadro laboratoristico può essere confondente):

1. meningite virale: liquor limpido, incolore, a pressione moderatamente aumentata, con cellularità aumentata sino a circa $500/\text{mm}^3$ e prevalentemente mononucleati, proteinoracchia sino a 1 grammo/l e glicoracchia normale;
2. meningite batterica: liquor torbido, a pressione molto aumentata così come la cellularità (anche 5-10 mila cellule/ mm^3), prevalentemente polimorfonucleati, spesso si evidenziano batteri, la proteinoracchia è molto alta e la glicorachia molto bassa;

3. meningite subacuta di varia eziologia: liquor incolore, pressione aumentata, cellularità mediamente aumentata, composta da mononucleati, a volte si evidenziano batteri (con la colorazione di Zheil Nielsen), la proteinoracchia è aumentata e la glicorrachia ridotta.

Come già detto, i pazienti anziani, con recente terapia antibiotica, immunodepressi o altrimenti defedati, possono avere quadri liquorali anche molto diversi. L'esame del liquor consente di impostare una terapia iniziale e l'esito della coltura batterica fornisce poi l'indicazione per una terapia più mirata. Da tenere sempre presente sia da parte del laboratorio che da parte del clinico la lettura dei risultati di laboratorio perché esistono delle criticità nell'analisi che possono essere evidenziate caso per caso se c'è comunicazione e collaborazione tra il clinico ed il laboratorista. Una coltura negativa può venire interpretata in modo diverso se al laboratorio giunge la notizia che il malato al momento del prelievo era già sotto copertura antibiotica, inoltre come già detto l'esame batterioscopico può essere negativo se la quantità di germi è al di sotto di un certo valore; oppure, come è capitato nel nostro policlinico se l'agente patogeno resta per qualche motivo confinato nel cervello e non rilasciato nel liquor

3.2 Inquadramento generale problematiche

Conoscere l'epidemiologia di un'infezione puo' aiutare a definire le corrette strategie sia per la cura del paziente infetto sia per il controllo della diffusione della stessa a livello della popolazione. La corretta strategia ed il conseguente controllo dipendono in larga misura dalla capacità di riconoscere l'esordio della malattia e dalla rapidità nell'identificare l'organismo responsabile.

L'accertamento e la diagnosi sono quindi due punti importanti per il trattamento dell'infezione. Altro punto importante e' stabilire dove e come e' stata contratta la malattia, chi sono i soggetti a rischio e quale trattamento e' necessario per contenere il livello di diffusione. E' chiaro quindi che la rapida e corretta identificazione dell'agente patogeno permette non solo di attuare la corretta terapia sul soggetto infetto ma anche di stabilire il grado di intervento da effettuare sul territorio e sugli esposti.

3.3 Obiettivi del laboratorio di Microbiologia Clinica

Nel contesto dell'accertamento diagnostico fondamentale è il ruolo del laboratorio ed in particolare quello del laboratorio di microbiologia clinica i cui obiettivi principali sono:

- fornire informazioni esatte sulla presenza o assenza in un campione biologico idoneo di microrganismi che potrebbero essere responsabili della malattia del paziente.
- fornire informazioni sulla sensibilità agli antibiotici dei microrganismi isolati,
- mettere in campo tutte le conoscenze e le possibilità metodologiche per arrivare ad una diagnosi microbiologica là dove gli strumenti tradizionali sono insufficienti..

Il laboratorio di microbiologia per raggiungere questi obiettivi può adottare tre tipi di strategie

1. Identificazione dei microrganismi attraverso coltura ed isolamento
2. Rilevazione di specifici anticorpi verso l'agente patogeno
3. Ricerca di un prodotto microbico specifico.

Ovviamente non tutte le strategie possono essere usate qualora l'urgenza della diagnosi sia imperativa, e soprattutto nei casi dove si sospetti la possibilità della diffusione dell'infezione. Fermo restando che la coltura, l'isolamento ed i successivi test di sensibilità agli antibiotici siano una condizione imprescindibile per attuare la terapia migliore e' di vitale importanza poter avere dei sistemi rapidi che consentano di giungere ad una identificazione sufficiente per improntare una terapia empirica mirata che possa inizialmente stabilizzare il paziente.

3.4 Tecniche non culturali per la diagnosi di laboratorio di infezione

Sono così denominate tutte quelle tecniche che non richiedono la moltiplicazione dei microrganismi. Nonostante la microbiologia medica si riconosca nella classica foto di Pasteur che osserva la crescita in coltura di un microrganismo, queste tecniche pur indispensabili sono ancor oggi laboriose e lente nel produrre risultati. Nel caso quindi di diagnosi di meningite si fa uso di tecniche microscopiche, quali la classica colorazione di Gram, di facile e rapida esecuzione che però necessita di personale ben addestrato nella lettura dei vetrini; dei Test al lattice, di esecuzione ancora più rapida ma che soffrono per una scarsa sensibilità e specificità; e dei test molecolari, solo da pochi anni introdotti nella pratica microbiologica,

che possono fornire risultati rapidi in pochissimo tempo, ma che soprattutto sono apprezzati per la loro elevata sensibilità.

3.5 Scopo del nostro studio

Scopo del nostro studio_e' stato: lo studio, lo sviluppo e la valutazione di un sistema in real time PCR con l'uso di nuove sonde molecolari per la messa a punto di un sistema di identificazione multitarget finalizzato alla identificazione dei sei patogeni piu' frequentemente isolati come agenti eziologici della meningite.

4 Ipotesi di Studio

Nel corso degli ultimi anni, l'estensione delle tecniche di biologia molecolare, dal laboratorio di ricerca al laboratorio di diagnostica, ed in special modo l'utilizzo della PCR in real time per la ricerca di agenti responsabili di malattie infettive, e' diventata una pratica comune nel laboratorio di microbiologia (8,9,10). La forza della PCR diagnostica, in opposizione alla PCR investigativa, sta nella sua rapidita' e riproducibilita' dei risultati. Al contrario della PCR investigativa, che viene usata nei laboratori di ricerca in condizioni ben definite, per periodi di tempo limitati, su un determinato tipo di campione e generalmente sempre dalle stesse

persone, la PCR diagnostica, proprio per il settore particolare in cui viene applicata deve soddisfare alcuni requisiti fondamentali. Deve essere studiata ed ottimizzata per un uso intensivo, deve essere di semplice esecuzione perché eseguita da personale che si alterna nei vari turni di guardia spesso diverso, e soprattutto non deve soffrire per l'utilizzo di campioni diversi.

La Real-Time PCR-chiamata anche la reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR), perché consente mediante l'uso di una curva standard la valutazione della concentrazione delle molecole bersaglio, è una delle più potenti e sensibili tecniche di analisi genica oggi disponibile. Grazie a queste caratteristiche trova oggi un largo impiego nella diagnostica di laboratorio. Per capire perché una PCR tradizionale può essere limitante, è importante capire cosa succede durante una reazione di PCR.

Una reazione di PCR di base può essere suddivisa in tre fasi:

1) fase esponenziale Raddoppio esatto del prodotto ad ogni ciclo (ipotizzando il 100% di efficienza di reazione). In questa fase la reazione è molto specifica e precisa. L'amplificazione esponenziale si verifica perché nei primi cicli di reazione tutti i reagenti sono freschi e disponibili, di conseguenza la cinetica della reazione spinge la reazione a favore del raddoppio degli amplificati.

2) fase lineare (alta variabilità) mano a mano che la reazione procede, i reagenti si consumano. La reazione inizia a rallentare ed il prodotto di PCR non è più raddoppiato ad ogni ciclo.

3) fase di Plateau (End-Point: Gel di rilevamento per i metodi tradizionali). La reazione si è fermata, non si hanno più prodotti o si producono in bassissima quantità, se si lascia procedere troppo a lungo la reazione di amplificazione i prodotti di PCR inizieranno a degradare, inoltre l'accumulo dei prodotti può dar luogo a formazione di amplificati non specifici. Ogni tubo di reazione raggiungerà la fase di plateau in un punto diverso, a causa della diversa cinetica di reazione per ogni campione. La fase di plateau nota anche come end-point di rilevamento, è il punto che nella PCR tradizionale viene preso in considerazione per la valutazione dell'avvenuta amplificazione che viene effettuata mediante rivelazione su gel, non è possibile in genere effettuare valutazioni quantitative e si deve necessariamente attendere la fine del ciclo di PCR per verificare i risultati, necessita inoltre di un sistema di visualizzazione esterna (colorazione con Bromuro di Etidio o equivalenti e corsa su gel) per visualizzare gli ampliconi ottenuti e verificare i risultati.

Nella Real time PCR, al di là del fatto di poter quantificare la concentrazione della molecola bersaglio, la possibilità di utilizzare sonde fluorescenti colorate diversamente per i diversi target ci consente di sapere prima della fine del ciclo di PCR se il nostro campione sarà positivo, in alcuni casi è possibile programmare il termociclatore in modo che non appena un campione raggiunga il valore soglia (per valore soglia si intende il valore di fluorescenza in cui un campione supera il valore di base) o Ct, il programma automaticamente effettui l'analisi dei risultati abbreviando ancor di più il tempo di risposta. Nonostante la sua ormai diffusa applicazione nella diagnostica clinica, e la disponibilità di diverse tipologie di sonde, la PCR in real time trova la sua più grande limitazione nella scarsa disponibilità di "sostanze" naturalmente fluorescenti. Proprio questa limitazione fa sì che l'applicazione della real time PCR consenta di rivelare al momento non più di due-tre target per volta. Questo, se nella pratica normale di laboratorio può non essere restrittivo, diventa limitante quando si pensa di applicare la PCR real time alla diagnostica di emergenza dove i tempi sono stretti e lavorare con tanti campioni per volta (uno per ogni target in esame) può diventare sia fonte di errore che di prolungamento dei tempi di allestimento del saggio e allungare i tempi in modo tale da vanificare il fattore rapidità del saggio.

Nel disegnare il nostro test abbiamo preso in considerazione alcuni punti fondamentali:

- numero di target rivelabili contemporaneamente
- minimo numero possibile di provette per campione
- massima rapidità di risposta possibile
- avere nel nostro test un sistema di controllo

4.1 Analisi dei punti

Partendo dal presupposto che non e' possibile rivelare piu' di 4 fluorescenze per test ed essendo sei i microrganismi piu' frequentemente isolati da LCR era chiaro che non si poteva prendere in considerazione un sistema basato su sonde taqman o sonde per dissociazione. Si procedette, quindi, scegliendo un sistema di amplificazione e analisi basato sulla valutazione della curva di melting. Contrariamente a quanto si pensi, un sistema di identificazione basato sulla curva di melting e' molto accurato e preciso (11).

Alcune aziende fornitrici di prodotti diagnostici usano sistemi di identificazione di batteri, virus o mutazioni genetiche basati sulla curva di melting (Artus Mycobac. Diff. LC PCR kit; Artus HSV-1/2 PCR kit; Artus

MTHFR LC PCR kit). Il valore della temperatura della curva di melting dipende sia dal numero delle basi presenti in una porzione di DNA che dalla loro sequenza, nel senso che frammenti di DNA di uguale lunghezza e composizione in basi avranno temperature di melting diverse a seconda di come le basi sono disposte lungo il frammento stesso. Di conseguenza il valore della curva di melting per un frammento di DNA ottenuto da una amplificazione avrà un valore determinato solo se l'amplificato riguarda il target in esame, qualunque altro amplificato non specifico originatosi per cross reazioni presenterà un diverso valore di melting. Il sistema è così accurato e preciso che è possibile valutare anche la presenza di eventuali mutazioni rispetto al wild type che si esprimono attraverso anche piccole variazioni della temperatura di fusione dell'amplicone. Un sistema basato sulla curva di melting può, inoltre, ed almeno in linea teorica, avere un numero illimitato di target rilevabili a condizione che si riesca a selezione degli ampliconi in modo che le loro melting non si sovrappongano. In considerazione di questo, anche il secondo aspetto era soddisfatto, perché sarebbe stato possibile usare un solo tubo per campione utilizzando una sola mix di primers.

La rapidità di esecuzione e quindi di risposta è un punto fondamentale per tutti quei test che trovano impiego nella diagnostica d'urgenza, e potrebbe

essere un valido supporto per indirizzare il clinico laddove il test diretto e/o i saggi al lattice falliscono, offrendo, inoltre, come valore aggiunto, l'identificazione dell'agente eziologico. Un test di RT-PCR richiede in genere in due ore, ma e' possibile ridurre ed ottimizzare questo tempo. Sono disponibili sul mercato termociclatori, derivati dalla tecnologia militare, applicati inizialmente per l'identificazione rapida di agenti utilizzati per guerra biologica, che trovano oggi larga applicazione anche nella "normale" diagnostica clinica. La nostra idea era di applicare il nostro modello sullo SmartCycler della Cepheid, un termociclatore che unisce alla grande rapidità anche la peculiarità di essere costituito da 16 celle indipendenti che permettono l'avvio dello stesso test o altri test in tempi diversi. Lo strumento è, inoltre, programmabile in modo che il test si blocchi (STOP) alla prima risposta alla soglia di fluorescenza (ct) senza essendo così possibile ottenere risultati, in termini di positività anche in soli circa 35-40 minuti .

Nello studio di un test molecolare bisogna tenere presente che l'affidabilità del test e' dovuta sia alla scelta dei primer e/o delle sonde, sia a quella dei sistemi di controllo del campione che sono stati inseriti. Il problema principale e' verificare che un campione negativo sia un vero negativo, escludendo così che ci possano essere dei falsi negativi dovuti sia al fenomeno di inibizione dell'attività polimerasica causata dalla presenza di

inibitori nel campione estratto. Nei test moderni si usa aggiungere un Internal Amplification Control (IAC) (12,13,14), per verificare l'amplificabilità del campione, ma lo IAC non fornisce indicazione sulla effettiva presenza di cellule nel campione, ciò può portare a considerare un campione negativo valido solo perché lo IAC si amplifica, trascurando il fatto che il campione potrebbe non essere idoneo perché privo della componente cellulare. Per cercare di ovviare a questo problema sono stati inseriti nella mix di reazione una coppia di primer che amplificano una porzione di un gene umano: la beta-globina presente nel liquor per la presenza di globuli bianchi. Solo nel caso di liquor particolarmente limpido e/o privo di cellule si è fatto uso di una soluzione di DNA di placenta come controllo interno di amplificazione. Per una maggior sicurezza diagnostica e', inoltre, stato inserito anche un controllo per DNA batterico generico (16s rRNA) ciò al fine di ottenere un amplicone e quindi segnale positivo anche in caso di infezione con un target diverso da quelli presi in esame (15,16). Nel calcolare la mix dei primers si è tenuto conto che la concentrazione dei primers di controllo doveva essere più bassa rispetto a quella dei target veri e propri, per evitare il fenomeno della competizione dei controlli rispetto ai bersagli. In sostanza si sono aggiustate le concentrazioni in modo che i controlli fornissero un segnale positivo solo in assenza di target specifico.

4.2 Studio delle regioni target e scelta del sistema di rivelazione

La bibliografia scientifica sui lavori per la diagnosi di meningite e' fiorente, le metodologie spaziano dalla semplice PCR con rivelazione su gel, all'esame della sequenza nucleotidica degli ampliconi ottenuti, passando per i sistemi di ibridazione (17,18,19). Nonostante nessuno di questi sistemi si presti ad un'applicazione diagnostica rapida, lo studio della letteratura scientifica e' servito come punto di partenza per decidere la regione target da cui partire per la messa a punto del test (20). Molti autori utilizzano il gene del 16S rRNA batterico o il gene del 18S rRNA fungino (21,22). Tuttavia, un'analisi accurata della regione, applicata ai nostri target, non metteva in evidenza alcuna regione che fosse cosi' diversa e specifica per poter essere presa in considerazione. Conseguentemente, piuttosto che scegliere un gene housekeeping generico e con poche differenze, si e' optato per la scelta di geni housekeeping specifici ognuno per il proprio target con notevoli differenze di sequenza, in modo da avere uno spettro piu' ampio in cui scegliere il nostro amplificato e la nostra melting di osservazione. Non trattandosi di una PCR multiplex, ma di una PCR multitarget non era di grande importanza la grandezza degli amplificati, ma si e' ugualmente scelto di non far variare molto la grandezza degli stessi per non mettere in

condizioni sfavorevoli i vari target nei confronti della sensibilità. Le regioni scelte sono cadute su :

1. il gene (PLY) codificante per la pneumolisina per *Streptococcus pneumoniae*,
 2. il gene (CAP) codificante per il polisaccaride capsulare per *Streptococcus agalactiae*,
 3. il gene codificante per la capsula (ctrA) per *Neisseriae meningitidis* ,
 4. una porzione della regione MOMP per *Haemophilus influenzae*,
 5. il gene (IAP) codificante per la proteina p60 coinvolta nei processi di adesione alle cellule eucariotiche per *Listeria monocytogenes*
-
3. il gene codificante per la capsula per *Cryptococco neoformans*.

I sistemi attualmente disponibili per lo studio della curva di melting non sono numerosi. Esistono i coloranti intercalanti e le sonde. Tra i coloranti intercalanti il più diffuso è il sybrgreen. Si tratta di un colorante fluorescente che presenta una emissione pressoché nulla se libero, ma che aumenta molto quando legato alla doppia elica del DNA. Il suo legame con

il DNA permette non solo di effettuare valutazioni della curva di melting, ma anche se usato in associazione con una curva di riferimento anche di fare una quantificazione dell'amplificato. Unico problema e' che il legame tra sybergreen e DNA non e' specifico, pertanto vengono rivelati anche tutti quei prodotti aspecifici che si possono formare nel corso di una PCR compresi i primer-dimer. E', quindi, necessario un adeguato studio sia dei primer, in sede di disegno, che del protocollo di amplificazione per minimizzare gli effetti di questi fattori interferenti. In ogni caso una volta accertata la presenza di eventuali primer-dimer e' sufficiente programmare l'inizio della valutazione della curva di melting a monte del valore dei primer-dimer per ottenere un grafico di piu' facile lettura.

Un altro metodo per valutare la curva di melting e' l'uso delle sonde, ma non tutte le sonde possono essere utilizzate per determinare la curva di melting. Soltanto le sonde che non si degradano durante il processo di amplificazione possono darci un segnale utile, per questo la sonda al momento piu' diffusa, la sonda Taqman e le sue successive modificazioni, essendo sonde a dissociazione non potevano essere prese in considerazione nel nostro modello. Le sonde di piu' largo utilizzo per la valutazione delle curve di melting sono le cosiddette sonde a forcina o molecular beacons. (23)

Queste sonde sono degli oligonucleotidi con sequenza complementare al target in esame, ma con una coda al 5' e una coda al 3' complementari fra loro in modo che il la sonda normalmente sia chiusa su se stessa. Questa coda viene chiamata "Stem". In posizione 5' e' presente un fluoroforo e in posizione 3' e' presente un quencer in modo che quando la sonda e' chiusa la fluorescenza è inibita e l'emissione del fluoroforo è pari a zero. In presenza del target la sonda si apre, legandosi alla sequenza bersaglio, cio' fa si che il fluoroforo ed il quencer si troveranno distanziati, non avendosi piu' l'effetto quencer, si avra' emissione di fluorescenza. Nel nostro caso, tuttavia, questo tipo di sonda dopo una attenta valutazione fu' scartata perche' non c'era sufficiente margine nella lunghezza della sonda per avere temperature di melting sufficientemente distinte per i sei target. Stesso discorso fu trasponibile sulle sonde scorpion o le sonde sunrise, peraltro, anche di difficile reperimento. La scelta cadde, quindi, su un nuovo tipo di sonda, concettualmente e strutturalmente vicina alle molecular beacons, con ipotetiche buone performance, ma con scarso background applicativo nel senso che non esistono evidenze scientifiche a sostegno del suo utilizzo. Le uniche informazioni erano reperibili sul sito della casa produttrice. Queste sonde si chiamano: "primer lux" il loro nome deriva dall'acronimo di **L**ux **U**pon **eX**tension, e sono un brevetto della" Invitrogen Life Science"(24).

Consistono in un oligonucleotide con sequenza complementare al target, in posizione prossima al 3' (entro le ultime 5 basi) si trova legato ad un base un fluoroforo. Al 5' si trova una sequenza complementare-reverse per 4-5 basi non al target, ma al 3' dell'oligo stesso, cio' fa si che in condizioni normali l'oligonucleotide si trovi chiuso su se stesso (stem) e subisca l'effetto quencher delle basi nucleotidiche. L'emissione di fluorescenza del LUX si avra' soltanto dopo l'appaiamento con il target.

5 Razionale

Nell'intento di studiare un nuovo protocollo di Real Time PCR si deve procedere passando attraverso alcune tappe obbligate:

- 1) si effettua una verifica dei primers scelti verificandone le performance nell'ottenimento dell'amplicone desiderato mediante corsa su gel
- 2) si effettuano controlli di sensibilità e specificità
- 3) selezionate le opportune coppie di primers (quelle con performance migliori) si testano utilizzando il sistema di rivelazione con il SybrGreenER.
- 4) Solo successivamente il protocollo si completa aggiungendo con l'uso della sonda.

Nel nostro studio, questo aspetto ha assunto un ruolo fondamentale, ci siamo dovuti cimentare nel trovare un protocollo che ci consentisse di testare ben otto coppie di primer, ottenere degli amplificati "puri" ed "organizzarli" in modo che non ci fossero sovrapposizioni di picchi.

Completata questa fase iniziale di studio e validazione sperimentale il test si doveva applicare introducendo l'utilizzodelle sonde.

In riferimento al punto 1 sono state valutate le sequenze di tutti i geni housekeeping relativi alla specie batteriche che si volevano identificare, da usarsi come target. Se in banca dati (NCBI) erano presenti piu' versioni della sequenza nucleotidica di un particolare gene housekeeping target si è proceduto confrontando le diverse sequenze mediante un sistema di allineamento multiplo (clustal). In questo modo si individuavano gli eventuali punti di mutazione, che venivano esclusi dalla scelta del primer, mentre si preferiva scegliere come sequenza target per i primer quella/e che cadeva/no nelle porzioni conservate. Per la scelta dei primers si e' ricorsi all'utilizzo del programma: D-LUX designer (25). In questo modo sono stati sintetizzati sia i primer marcati sia quelli non marcati, che sarebbero stati usati nei saggi di controllo. Ottenute le sequenze e utilizzando il programma primer-BLAST (NCBI), che consente di verificare che i primers selezionati fossero sufficientemente specifici per il target di interesse, si sono quindi scelti tra tutti i possibili primers quelli che erano in grado di fornire amplificati con T melting scalari.

La previsione delle curve di melting per gli ampliconi è stata ottenuta utilizzando il programma: mfold di M.Zucker.(26) e prendendo, per ogni target solo primers non marcati ed usando l'accortezza di escludere, nel computo la porzione complementare al primer con funzioni di sonda. Selezionati i primers si è proceduto con la preparazione del DNA da usare come target per il controllo della reazione della sua sensibilità e specificità. Il DNA è stato ottenuto da colture di ceppi di riferimento noti provenienti dall'American Type Culture Collection: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* e *Criptococcus neoformans*,

6 Materiali e Metodi

6.1 Preparazione del DNA dei ceppi di riferimento

Dalle tre alle 5 colonie provenienti da una coltura pura del ceppo di riferimento, ottenuta dopo 24 h d'incubazione a 37°C in aerofilia e/o microaerofilia (per *N.meningitidis*, *H.influenzae*, *S.pneumoniae*) sono state stemperate in 500 µl di PBS ed il DNA e' stato estratto con un estrattore semiautomatico l'EASYMAG (Biomerieux).

6.2 Reazione di amplificazione

Un microlitro di estratto veniva usato per la messa a punto della reazione di amplificazione seguendo il protocollo di base, che si sarebbe utilizzato poi anche nella PCR in tempo reale, I reagenti utilizzati erano quelli propri delle reazioni di PCR classica di cui sono stati valutati gli ampliconi ottenuti mediante corsa su gel di agarosio al 3%. Al fine di scongiurare eventuali reazioni aspecifiche, si sono anche eseguite delle reazioni di PCR effettuate incrociando fra loro target e primer, ossia valutando che ad esempio il primer per *S.agalactiae* non amplificasse il DNA di *Neisseria* e viceversa e così via per tutte le possibili combinazioni. le prove sono state eseguite incrociando tutti i primer e tutti i target.

Protocollo amplificazione e sequenziamento :

PRIMA fase amplificazione del target con il solo primer specifico

Tampone 5X	2.5	µl
DNTPs	1	µl
PrimerMix*	1	µl
Dna estratto	1	µl
Taq dna polimerasi	1	U (0,25 ml di [5U/ml])
H ₂ O q.b.a	25	µl

*Primer Mix : primer Fwd + primer Rew 1:1v/v di 25 picomoli/µl per ogni target

Ciclo di amplificazione: 50 °C 120'';95 °C 120'' una volta 95 °C 30'' 50 °C20'' 60 °C 30'' 35 volt. La reazione veniva condotta utilizzando un termociclatore GeneAmp system 9700 Applied Biosystem

Terminata la reazione l'amplificato veniva verificato mediante corsa su gel di agarosio al 3% colorato con SYBR SAFE (Invitrogen Life Technologies)
Fig (1) Successivamente l'amplificato veniva purificato con Montage PCR Centrifugal Filter Device (MILLIPORE Corporation) e sequenziato con i primer forward e reverse utilizzati per l'amplificazione. Secondo il seguente protocollo:

Big Dye TerminatorV 1.1 2µl (Applied Biosystem 85 Lincol Centre Drive Foster City,CA 94404 USA)

Tampone	2 µl
Primer fwd	3 µl
DNA ampl	3 µl

La sequenza veniva corsa con l'analizzatore genetico a capillare ABI 310 (Applied). Il dato grezzo analizzato con il programma AB DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 e successivamente allineata in banca dati (NCBI) per verificare che il prodotto amplificato fosse specifico per il target desiderato. I primers che avevano fornito i migliori risultati in termini di resa furono utilizzati per la seconda fase della sperimentazione. (Fig 2)

Protocollo amplificazione: 2' fase amplificazione del target con la mix completa di primer

Tampone 5X	2.5	µl
DNTPs	1	µl
PrimerMix*	1	µl
Dna estratto	1	µl
Taq dna polimerasi	1	U (0,25 ml di [5U/ml])
H2O q.b. a	25	µl

* la Primer mix e' cosi' costituita: 5 μ l di ogni primer a [100picomoli/ μ l] vf
100 μ l

Ciclo di amplificazione: 50 °C 120'';95 °C 120'' una volta 95 °C 30'' 50 °C
20'' 60 °C 30'' 35 volte

Terminato la reazione gli ampliconi venivano valutati mediante corse su gel
di agarosio al 3% colorato con SYBR SAFE (Invitrogen Life Technologies).

Anche in questo caso, la specificita' della mix e' stata testata sia
amplificando dna diversi, sia amplificando estratti ottenuti da campioni
contenenti un singolo target (una sola specie batterica) o un pool di queste .

Terminata la fase di verifica della funzionalita' dei primers si e' passati alla
fase di studio vera e propria utilizzando la mix dei primer gia' calibrata con
il sistema di rivelazione fluorescente.

EXPRESS SYBRGreenER qPCR cod.11780-200 (Invitrogen life
technologies 1600 faraday Avenue Carlsbad, California 92008)

SuperMix Universal	12.5	μl
PrimerMix	1	μl
DNA estratto	1	μl
H ₂ O	10.5	μl

Ciclo di amplificazione e rivelazione

50 °C 120'' (UDG incubazione) 95 °C 120'' (inattivazione UDG) 35 cicli di 95 °C 15'' 60 °C 60'' valutazione curva di melting : dopo il 35 ciclo da 60 a 95 °C veniva corso su gel per verificare sia la qualita' dell'eventuale amplificato sia la quantita' di primer-dimer.

Ottimizzato il piu' possibile il protocollo d'amplificazione (prove con differenti coppie di primer, per ottenere sia la migliore resa possibile sia la migliore scala di valori di melting) si e' avviata la fase successiva ossia l'applicazione del protocollo ai primers, che pur non essendo ancora le sonde definitive avevano però la conformazione a forcina classica dei primer LUX, per verificare se i risultati ottenuti con i primer non a forcina fossero confermati

Express SYBRGreenER qPCR

SuperMix Universal 12.5 μ l

PrimerMix 1 μ l

DNA estratto 1 μ l

H₂O 10.5 μ l

Ottenuti i primi veri risultati sulle curve di melting fig. 3 (foto grafico completo) il protocollo sperimentato con il sistema del SybreGreener veniva applicato ai primer LUX (Tab 1) si entrava così nella fase finale dello studio (27).

Il protocollo utilizzato con il SybrGreener veniva ora applicato alla mix dei primer LUX. Per valutarne le performance le prove venivano eseguite, anche con il SybrGreener nelle seguenti condizioni.

Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen life technologies 1600
Faraday Avenue Carlsbad, California 92008)

SuperMix-UDG 12.5 μ l

PrimerMix LUX 1 μ l

DNA estratto 1 μ l

H₂O 10.5 μ l

Ciclo di amplificazione e rivelazione

50 °C 120'' (UDG incubazione) 95 °C 120'' (inattivazione UDG) 35 cicli di
95 °C 15'' 60 °C 60''

valutazione curva di melting : dopo il 35 ciclo da 60 a 95 °C

Terminato la reazione gli ampliconi venivano valutati mediante corse su gel
di agarosio al 3% colorato con SYBR SAFE (Invitrogen Life Technologies).

7 Discussione

I risultati dei saggi effettuati utilizzando i primers LUX furono deludenti, infatti, a parità di condizioni i risultati forniti dal test eseguito con il SybrGreenER erano nettamente migliori. Il parametro maggiormente colpito sembrava essere la sensibilità, gli ampliconi ottenuti con i Primers LUX erano 10 volte meno visibili rispetto a quanto evidenziato dal saggio condotto con SybrGreenER. La cosa che non convinceva era che alla corsa su gel entrambi i test fornivano gli stessi risultati, le bande ottenute dai due differenti sistemi erano del tutto sovrapponibili. (Fig 4). Questo ci portava a fare due ipotesi:

- 1) La sintesi dei Primer LUX probabilmente non aveva una buona efficienza in termini di marcatura di conseguenza la quantità di primer marcato fosse molto bassa rispetto al primer non marcato.
- 2) C'era probabilmente una fluorescenza di fondo (background) che interferiva con la rivelazione della sonda.

Per escludere e/o avvalorare una delle due ipotesi o entrambe si è quindi proceduto da un lato, chiedendo alla ditta produttrice dei LUX i certificati di

analisi delle sonde, dall'altro analizzando le sonde per vedere quale fosse il valore reale della loro temperatura di fusione.

Dall'analisi dei certificati di sintesi si è compreso che il problema non era nella sintesi dei probe. Un risultato interessante è invece emerso dall'analisi delle sonde con il programma "DNA quick fold" che mise in evidenza che alla temperatura di annealing le sonde erano già completamente aperte, mentre, in realtà, secondo il principio di funzionamento dei LUX avrebbero dovuto essere chiuse e quindi spente. In sostanza il programma di disegno dei LUX non aveva funzionato correttamente. Si procedette, quindi, con l'utilizzo di primer già sperimentati, ma con nuove code (stem), che avessero una temperatura di melting più alta, facendo bene attenzione che la nuova temperatura non fosse più alta della temperatura di fusione sonda-probe per evitare che le sonde restassero chiuse su loro stesse invece che legarsi al target. Si è così passati da uno stem a 4 basi, come proposto dal programma D-lux Designer, ad uno stem con 6 o 7 basi. (Fig. 5,6). Le nuove code furono state costruite base su base e valutate, questa volta, in tempo reale con il programma "DNA quick fold". Inoltre, nella nuova sintesi si fece attenzione a posizionare il fluoroforo nella posizione in cui l'effetto

quencer fosse piu' forte, in genere vicino ad una "G" (28,29,30,31). Qualora non ci fossero guanine disponibili si è proceduto ridisegnando un nuovo primer. Ottenuti i nuovi primer-sonda si ripeterono gli esperimenti che pur fornendo risultati migliori rispetto ai precedenti non davano ancora risultati confrontabili con il sistema di rivelazione mediante SybrGreenER.

Passo decisivo fu l'acquisizione del nuovo termociclatore per real time lo Smart Cycler , questa strumentazione, infatti, nata per la sperimentazione di test per le applicazioni piu' varie (diagnostica, ricerca, bioterrorismo) permette, pertanto, un controllo completo sulla gestione della macchina. Essendo sempre presente l'ipotesi che la risposta del fluoroforo potesse essere inficiata dal rumore di fondo della sonda stessa, durante un test effettuato mettendo a confronto il sistema diagnostico basato su SybrGreenERer con il sistema diagnostico basato su primer LUX; si e' provveduto a bloccare la funzione che automaticamente normalizza la fluorescenza di fondo ad un valore di 500 unita che e' il valore al quale la macchina fa riferimento per calcolare il ct di una reazione di tempo reale. Valore a cui corrisponde il massimo della sensibilita'.

L'osservazione dell'andamento della reazione mise in evidenza che i primer LUX anche con i nuovi stem, alla temperatura di annealing di 50 gradi emettevano un valore di fluorescenza compreso tra le 1550 e le 2000 unita, e che la differenza tra il fondo e' l'amplificato non era superiore alle 200 unita'. Questa osservazione rendeva ragione del fatto che la reazione mostrasse una scarsa sensibilita'. Il sistema di rivelazione era "accecato" dalla eccessiva luminosità e quindi non era' in grado di valutare le piccole differenze di emissione tra il fondo ed un segnale realmente positivo, (Fig.7,8). cosa che invece avveniva correttamente con il SybrGreenER.

Quest'ultimo, infatti, aveva un fondo di 300 unita' circa. Un campione di liquor positivo per *Neisseriae meningitidis*, risultava con il SybrGreenER ancora positivo con 1 µl ad una diluizione di 1:100, mentre il test effettuato con il LUX si fermava ad 1 µl del campione non diluito (Fig 9). In sostanza il fenomeno di spegnimento o quencher del flouoroforo effettuato dalla base purinica non e' sufficiente a bloccarne le emissioni, di conseguenza una sonda basata su questo sistema non puo' essere usata in un sistema diagnostico pena la riduzione di sensibilita' con il reale rischio di considerare negativo un campione a bassa carica batterica evenienza non infrequente nelle meningiti.

8 conclusioni

Dalle prove sperimentali eseguite si evince che i LUX primer non possono essere adoperati, almeno nelle condizioni sperimentali da noi utilizzate, per l'uso in diagnostica. Tuttavia, come considerazione positiva possiamo affermare che la risposta dello stesso test effettuato con SybrGreenER, ha dato risultati positivi fino ad una diluizione 1: 1.000.000 di una estrazione ottenuta partendo da una coltura con torpidità pari allo 0,5 McF. Con una sensibilità pari a circa 150 CFU /ml, superiore cioè a qualunque sistema diagnostico attualmente disponibile sul mercato.

L'uso di questo test può soddisfare le esigenze di una diagnostica rapida, tanto che il “meningo test” come è stato chiamato in laboratorio è usato oggi correntemente in laboratorio nella diagnosi di meningite in sinergia con gli altri test attualmente disponibili ed in più di un'occasione è riuscito a risolvere gaps diagnostici laddove i lattici non fornivano informazioni, e/o l'osservazione microscopica era al limite della sensibilità ovvero ove la coltura negativa a fronte di un fondato sospetto clinico di meningite batterica. Nel corso di quest'ultimo anno di studio e valutazione abbiamo analizzato 211 campioni di liquor di cui 19 risultati positivi alla coltura, 26 campioni sono stati positivi al test molecolare. I 7 positivi al molecolare ma

negativi ai lattici ed alla coltura derivavano da pazienti sottoposti a terapia antimicrobica, di questi 5 erano risultati positivi al microscopio. Tutti i campioni positivi alla Real Time PCR provenivano da pazienti che presentavano evidenze cliniche di meningite.

In un caso si e' avuto una risposta positiva con la presenza di un picco di melting sconosciuto. Ulteriori indagini misero in evidenza che in alcuni casi i primer per il *Cryptococco neoformans* potevano dare dei picchi di melting non corrispondenti a nessuno dei target. Pur non interferendo con il test i primer sono stati cambiati con altri che non davano nelle stesse condizioni picchi di melting.

Bibliografia

1. Medical Microbiology
Samuel Baron third edition
2. Microbiologia Clinica
Cedric Mims, Hazel M. Dockrell, Richard V. Goering, Ivan Roitt,
Derek Wakelin, Mark Zukermann
3. Microbiologia Medica
Patrick R. Murray, Ken G. Rosenthal, Michael A. Pfaller
4. [http://www.epicentro.iss.it/problemi/meningiti/meningiti da meningococco](http://www.epicentro.iss.it/problemi/meningiti/meningiti%20da%20meningococco)
5. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/meningiti>
6. <http://www.simi.iss.it/dati.htm>
7. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (D.L.vo 30.06.1993 n. 270) Roma - Biblioteca centrale (carica lysteria)
8. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus* sp. by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis. Failace L, Wagner M, Chesky M, Scalco R, Jobim LF. *Aq Neuropsychiatr* 2005 Dec;63(4):920-Epub 2005 Dec 15.
9. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid.
Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D.
J Clin Microbiol 1994 Feb;32(2):335-51.
10. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. Jordan JA, Durso MB *J Mol Diagn* 2005 Nov;7(5):575-81.
11. Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis. Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Gebel J, Hoeft A, Stuber F. *J Clin Microbiol* 2004 Feb;42(2):512-7.
12. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR
J. Hoorfar, N. Cook, B. Malorny, et al., *Letter, J. Clin. Microbiol.* 41:5835, 2003

13. Diagnostic PCR:validation and sample preparation are two sides of the same coin
Dario De Medici,Amir Abdulmawjood,Patrick Fach Jeffrey Hoorfar,Petra Wolfs,
Peter Radstrom Journal of Clin. Microbiol. Dec 2003
14. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid
answersVersalovic J, Lupski JR. Trends Microbiol. 2002;10(10 Suppl):S15-21.
15. PCR Primer and Probes for the 16SrRNA Gene of Most Species of Pathogenic
Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid .K.Greisen,
M.Loeffelholz, A.Purohit, and D. Leong J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):335-351.
16. RIDOM:Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database
Dag Harmsen, Jorg Rothganger, Matthias Frosch, and Jurgen Albert
Nucleic Acid Research, 2002 Vol.30 N.1
17. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ
hybridization.
Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S,
Reischl U, Wellinghausen N. J Clin Microbiol. 2005 Jul;43(7):3390-7.
18. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR.
Uzuka R, Kawashima H, Hasegawa D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y,
Takekuma K, Hoshika A, Chiba K. Pediatr Int. 2004 Oct;46(5):551-4.
19. Evaluation of an extended diagnostic pcr assay for detection and verification of the
common causes of bacterial meningitis in csf and other biological samples.
Bäckman A, Lantz P, Rådström P, Olcén P. Mol Cell Probes. 1999 Feb;13(1):49-
60.
20. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in
diagnostic microbiology
M.Vaneechoutte, J.Van Eldere J.Med. Microbiol Vol 46(1997), 188-194
21. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and
Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using
real-time PCR.
Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB.
J Clin Microbiol. 2001 Apr;39(4):1553-8.PMID: 11283086
22. Polymerase Chain Reaction in Rapid dignosisi of Neonatal Sepsis

Ashok. K Yadav, C.G. Wilson, P.L. Prasad and P.K. Menon Indian Pediatrics
V. 42 July 17 2005

23. Combined assay for two-hour identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* and concomitant detection of 16S ribosomal DNA in cerebrospinal fluid by real-time PCR.
Deutch S, Møller JK, Ostergaard L. Scand J Infect Dis. 2008;40(8):607-14.
24. MOLECULAR BEACONS PCR DESIGN
<http://www.molecular-beacons.org/Introduction.html>
25. <http://clones.invitrogen.com/lux/>.
26. D-LUX Designer
:<http://escience.invitrogen.com/lux/index.jsp>
27. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction Michael Zuker Nucleic Acid Research, 2003 vol 31 No.13 p 3406-3415
28. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore Irina Nazarenko, Brian Lowe, Marlene Darfler, Pranvera Ikonimi, David Schuster and Ayoub Rashtchian Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No. 9 e37
29. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes
Irina Nazarenko, Rick Pires Brian Lowe, Mohamad Obaid, and Ayoub Rashtchian Nucleic Acid Research, 2002 vol 30 No.9 p 2089-2195
30. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes Grégoire Bonnet, Sanjay Tyagi†, Albert Libchaber, and Fred Russell Kramer‡,§ PNAS Vol 96 pp6171-6176, May 1999
31. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes Irina Nazarenko*, Rick Pires, Brian Lowe, Mohamad Obaidy and Ayoub Rashtchian Nucleic Acids Research, 2002, Vol. 30, No. 9 2089-2195

Fig 1

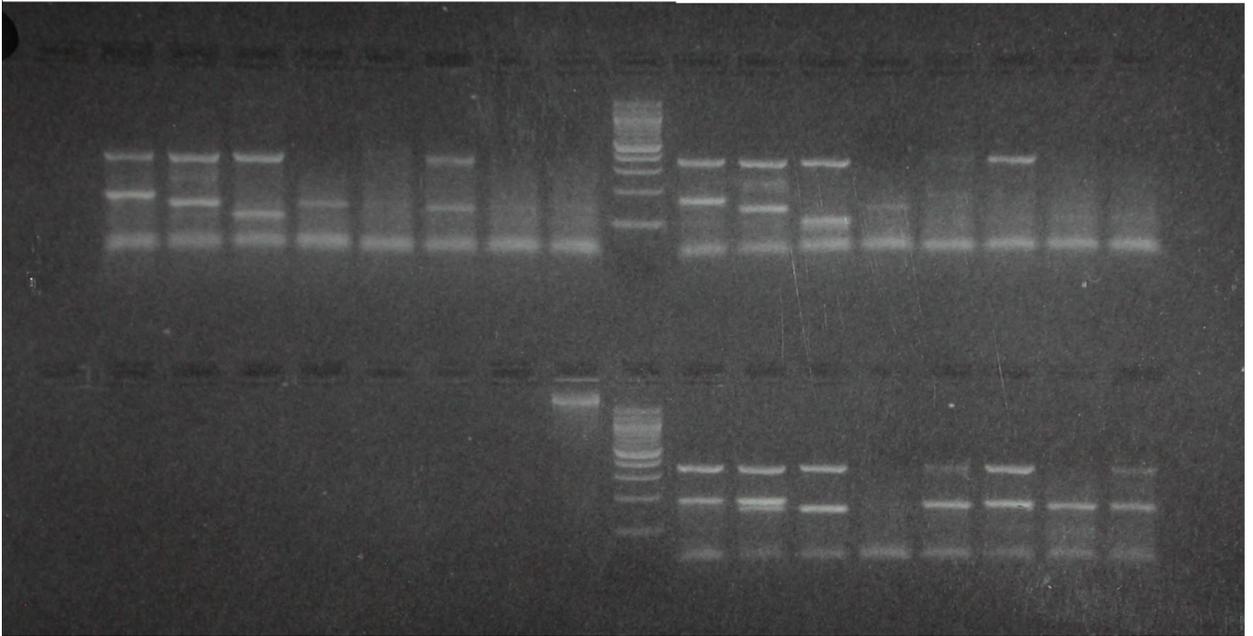




Fig. 2

Fig 3

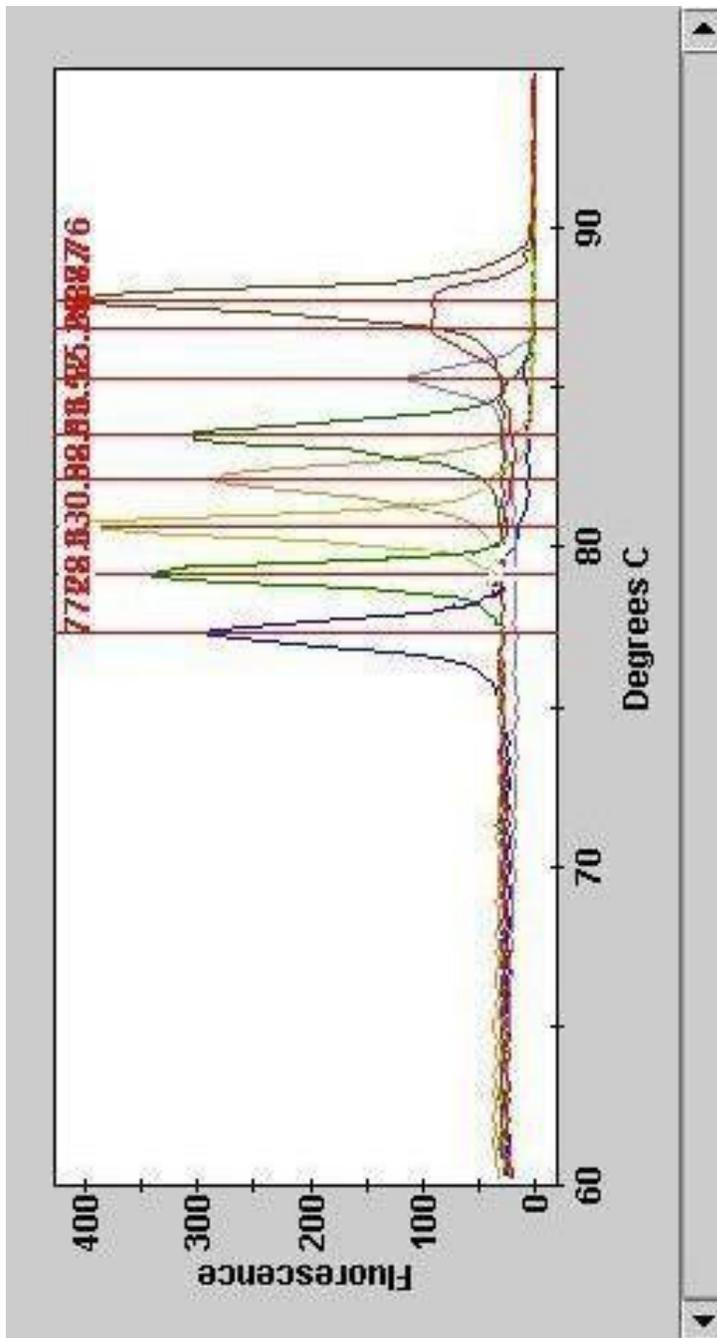
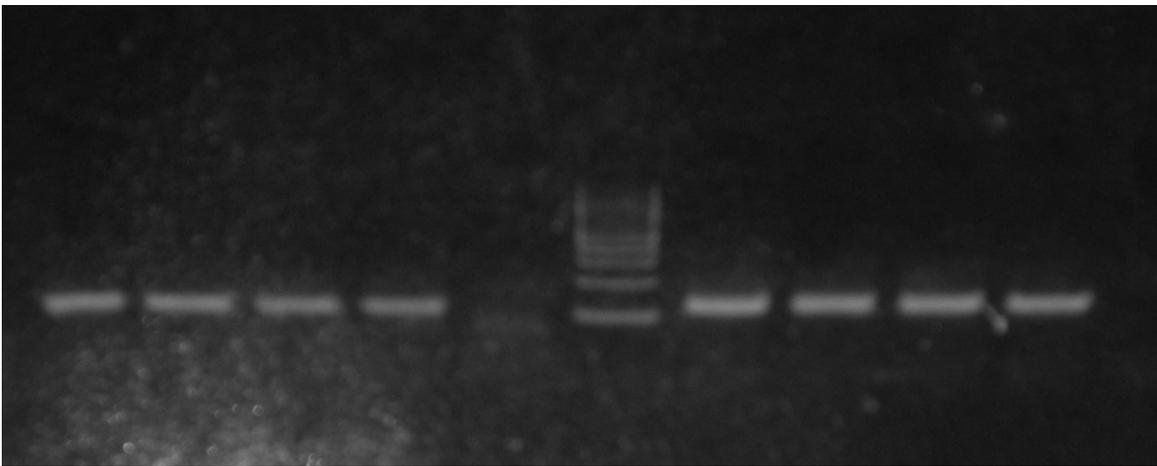


Fig. 4



10

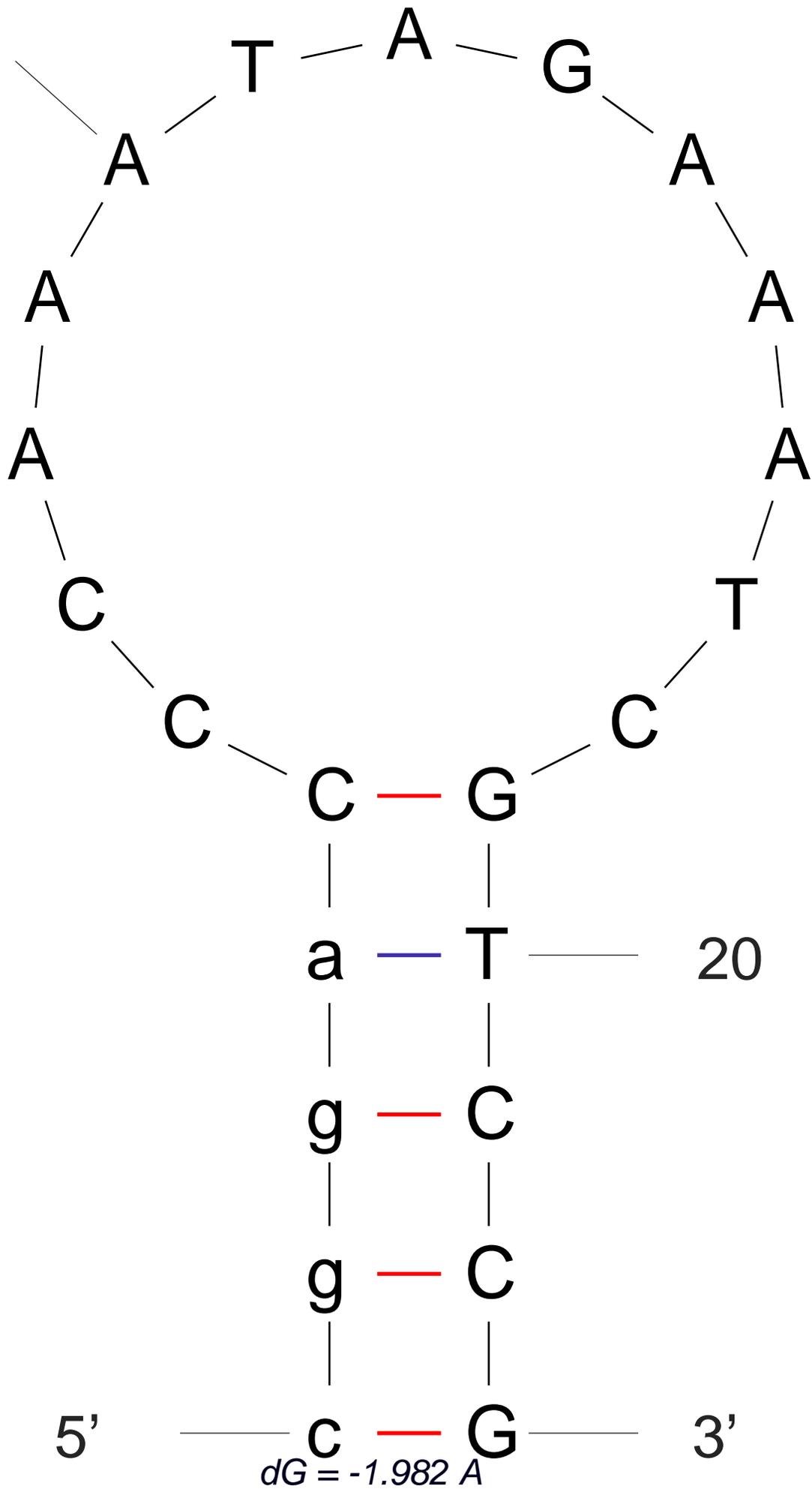


Fig.7

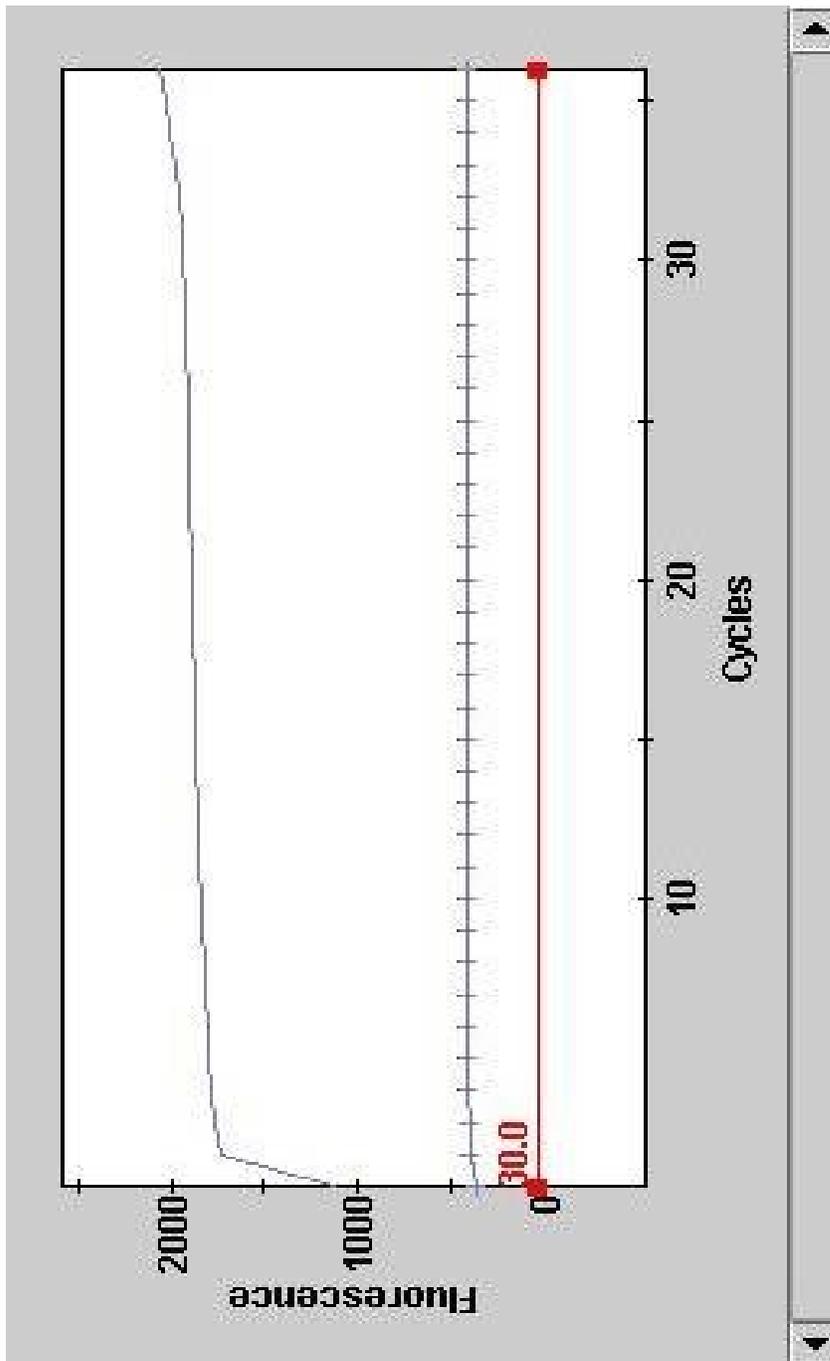
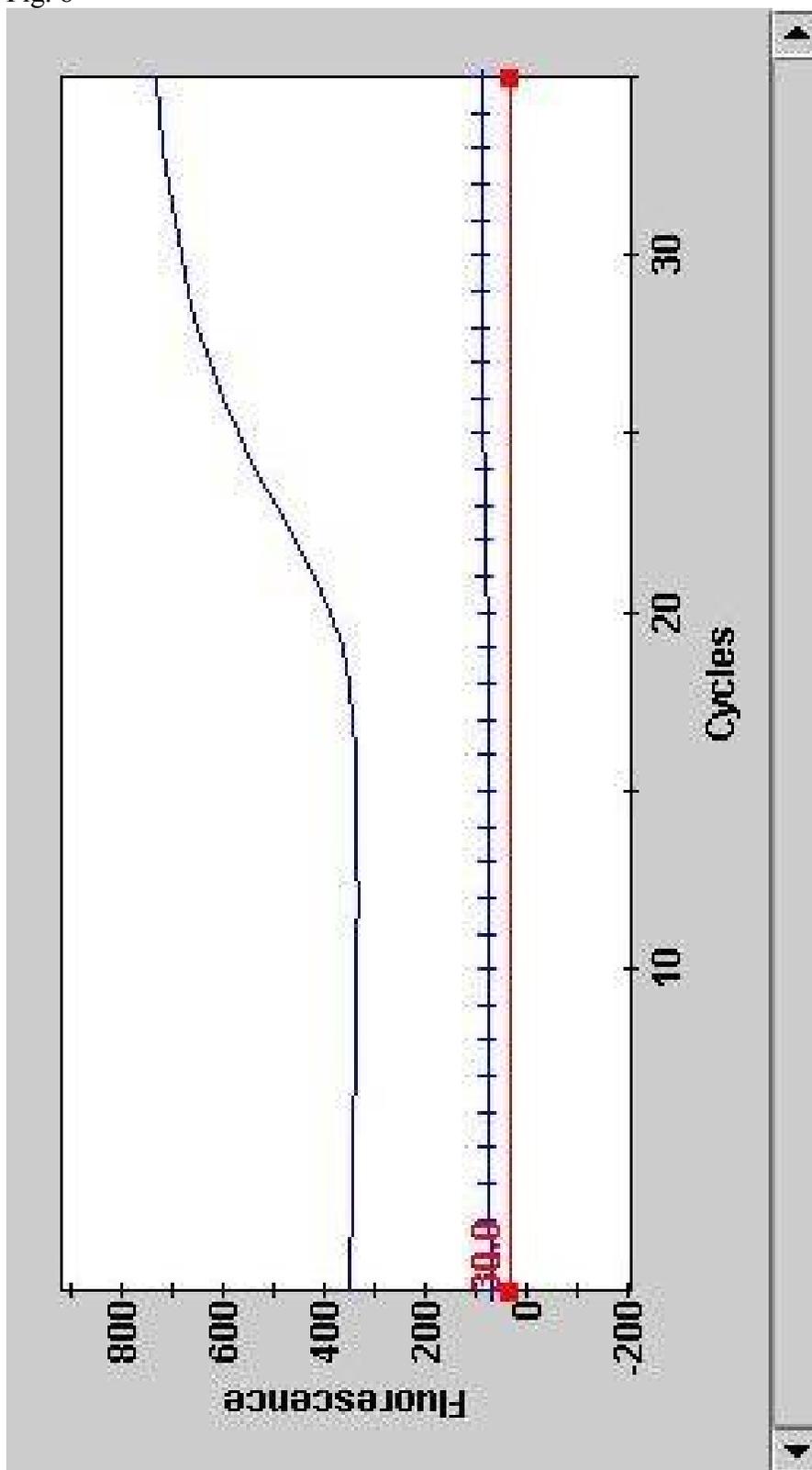


Fig. 8



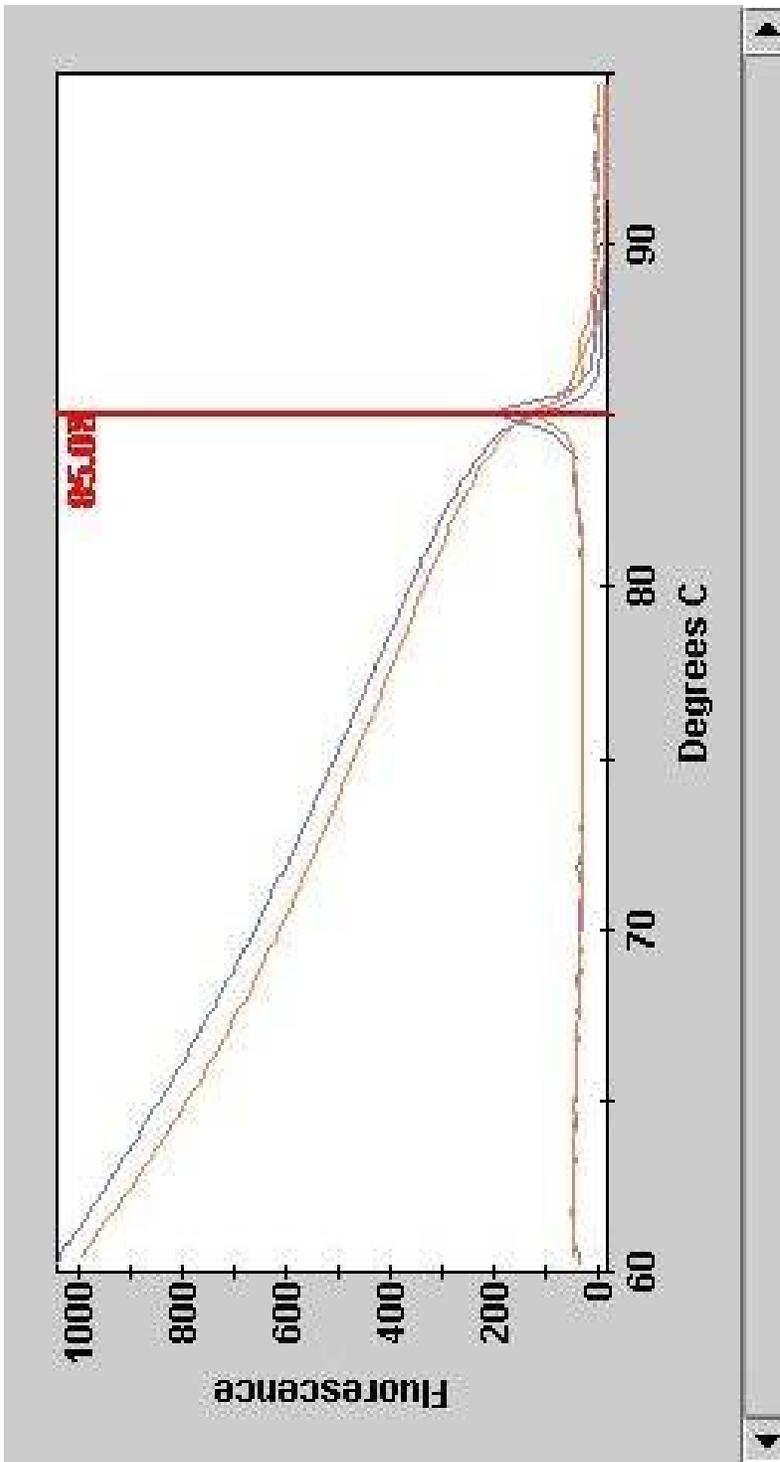


Fig 9

Specie	gene	Posizione	Primer
S. aga.	CAMP	1275	GCATTAGAAACATTGATTGCC
S. aga.	CAMP	1459	ATAGATCTTCCCCCTCGTTG
H. infl.	MOMP	888	AAAACGCTMTTTCGTATCTCC
H. infl.	MOMP	1078	GAAGGTGTTCTCGCCGTAAGCAC CTTC
S. pne.	autolisina	1558	CGGACGACCCCAAATAGAAATCGT C CG
S. pne.	autolisina	1502	TAGAGAGTGACCGGGCTTGC
N mening	CtrA	837	GGCTTCAGCTTATCGCTTCTGAAG CC
N mening	CtrA	993	TCTGCCTCACTGCCATAAC
C. neof.	Capsula	1140	GTGCCAGGAATTGACGGAAGGG CAC
C. neof.	Capsula	1310	CCAGACAAATCACTCCACCAAC
L. monocy	YAP	64	GAGTACCAAAGTCTAACACAGGT ACTC
L. monocy	YAP	244	AGCTGGTTTGCAGCTTC
Homo sapiens univ	β Actina	1860	CGGCACTTAATACACACTCCAAGG CCG
Homo sapiens univ	β Actina	2165	CCACACTGTGCCCATCTACGA
Batteri univ	16S rRNA	8	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Batteri univ	16S rRNA	360	CCCCTGCTGCCTCCCGTAG

Tab.1