

PROGETTO IST: UNITÀ OPERATIVA DI PALERMO

Teresa Fasciana, Giuseppina Capra, Anna Giammanco
Dipartimento di Promozione della Salute, Materno-Infantile, di Medicina Interna e Specialistica di Eccellenza "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo

Trichomonas vaginalis

La tricomoniasi, una delle più diffuse Infezioni Sessualmente Trasmesse (IST), è causata da un protozoo, *Trichomonas vaginalis* (Tv). Nella donna, l'infezione è stata associata ad un aumento dei casi di endometrite e alla rottura delle membrane pretermine (*Preterm Premature Rupture of the Membranes*, PPRM); mentre negli uomini, Tv è stato a lungo riconosciuto come una rara causa di uretrite non gonococcica. Tuttavia, molte donne infette hanno sintomi lievi o nulli e la maggior parte delle infezioni negli uomini sono asintomatiche.

Le prestazioni dei test diagnostici e l'attendibilità dei risultati sono fortemente condizionati dalla qualità del campionamento, dalla modalità di conservazione e di trasporto del prelievo (1).

Esame microscopico a fresco

La diagnosi di tricomoniasi nelle donne tradizionalmente è eseguita mediante esame microscopico a fresco dei campioni vaginali. Il Tv può essere individuato mediante il rilevamento dei suoi peculiari movimenti a scatto che spesso causano lo spostamento delle cellule adiacenti e dei detriti cellulari.

La microscopia diretta su secrezioni uretrali maschili non è raccomandata in quanto spesso queste contengono pochi organismi, riducendo ulteriormente la sensibilità della metodica.

L'esame microscopico a fresco è un test diagnostico rapido e poco costoso, ma la sua sensibilità varia dal 28% al 82%, tale sensibilità può essere aumentata analizzando il sedimento.

L'accuratezza della diagnosi microscopica dipende da due fattori:

1. condizioni del campione: il campione deve essere raccolto in terreno liquido per preservare la vitalità microbica e quindi la motilità dei microrganismi;

2. l'esperienza dell'operatore: la dimensione di Tv è simile a quella di un linfocita (10-20 μm) o di un neutrofilo. Quando il microrganismo non è mobile, può essere difficilmente differenziato dal nucleo di una cellula epiteliale vaginale. Inoltre, la motilità dipende dalla temperatura di trasporto del campione. A temperatura ambiente in soluzione salina tamponata con fosfato, il protozoo rimarrà in vita per più di 6 ore; tuttavia, la motilità si attenua significativamente a temperature più basse.

Il vetrino deve essere visualizzato prima con ingrandimento 100x, che comunque non ci consente di visualizzare i dettagli morfologici del protozoo ed è quindi necessario procedere con l'ingrandimento 400x che consentirà la visualizzazione dei flagelli (2).

Esame microscopico dopo colorazione

La diagnosi di Tv mediante esame microscopico dopo colorazione di Gram, Giemsa e blu di metilene (ad esempio colorazione di Loeffler) di strisci di essudati genitali presenta una serie di svantaggi rispetto all'esame microscopico a fresco.

L'esame microscopico dopo colorazione manca di sensibilità, la lettura deve essere effettuata da un operatore esperto, inoltre richiede tempi di esecuzione più lunghi rispetto all'esame microscopico a fresco e non può essere eseguito al letto del paziente.

La presenza di Tv può essere messa in evidenza in strisci colorati con la tecnica di Papanicolaou, ma questo non deve essere considerato un test diagnostico primario a causa della sensibilità e della specificità subottimali. In alternativa, per aumentare la sensibilità, il preparato può essere colorato con l'arancio acridina ma la lettura richiede un microscopio a fluorescenza e un operatore esperto (3).

Esame colturale

Negli ultimi 40 anni, l'esame colturale in terreno liquido è stato considerato il gold standard per la diagnosi dell'infezione da Tv. Il terreno liquido utilizzato è il terreno di Diamond, eventualmente modificato secondo Fouts e Kraus (in cui la streptomina è sostituita dalla netilmicina). È richiesto un lungo periodo di incubazione da 2 a 7 giorni per isolare e identificare Tv in coltura (4).

Nonostante l'aggiunta degli antibiotici al terreno, la contaminazione dalla flora microbica vaginale riduce la sensibilità dell'esame colturale.

A causa dei costi elevati, l'indagine colturale non è effettuabile presso molti laboratori di diagnostica microbiologica. Per superare questo limite esistono in commercio sistemi di campionamento che consentono il prelievo per l'esecuzione sia dell'esame microscopico che di quello colturale. Tali sistemi permettono di mantenere il microrganismo nella forma vitale fino a 7 giorni dal prelievo.

Infine, l'indagine colturale consente la valutazione della farmacoresistenza utile sia per la somministrazione di una adeguata terapia sia ai fini epidemiologici. L'indagine colturale è fortemente raccomandata:

- nei soggetti di sesso maschile
- nei soggetti di sesso femminile con esame microscopico negativo ma con forte sospetto clinico d'infezione
- nei soggetti con sintomatologia o infezione cronica dopo il trattamento con antimicrobici
- per la valutazione della farmaco-resistenza (5).

NAAT

Sebbene l'indagine microscopica e quella colturale restino i test diagnostici più utilizzati per la diagnosi d'infezione da Tv, l'utilizzo dei NAAT (*Nucleic Acid Amplification Tests*) si è dimostrato essere l'approccio più sensibile. La sensibilità dell'esame colturale rispetto al NAAT varia dal 35% al 78%, mentre la specificità è solitamente pari al 100%. Analogamente, la specificità dell'indagine microscopia a fresco è generalmente elevata, mentre la sensibilità, è scarsa, con percentuali che variano dal 34% al 58%. La scelta dell'esame microscopio, colturale o dei NAAT dipende dalla capacità del laboratorio di eseguire i test, dal tipo e dalla qualità dei campioni ricevuti. Generalmente, l'uso dei NAAT è preferibile per lo screening nelle popolazioni a basso rischio d'infezione, poiché consente l'utilizzo di campioni non invasivi, come l'urina del primo mitto o tamponi vaginali raccolti autonomamente. Per l'esecuzione dei NAAT, non sono richiesti i microrganismi vitali; quindi la conservazione, l'elaborazione e il trasporto dei campioni possono essere effettuati senza dover rispettare adeguate temperature e il tempo di campionamento. Tale caratteristica potrebbe però rappresentare anche un limite: la positività si osserva fino a 2 settimane dopo il successo terapeutico ed è impossibile effettuare valutazioni

sulla farmaco resistenza se questa non è nota a livello molecolare. Sebbene i NAAT possano soppiantare i test meno sensibili per la diagnosi dell'infezione da Tv, la coltura continuerà ad essere considerata l'indagine gold standard nei casi di infezione persistente o nei casi di sospetto fallimento terapeutico in cui il test di sensibilità antimicrobica degli isolati clinici può essere fondamentale (6-7).

Metodi immunologici

Il Tv può essere ricercato nelle secrezioni genitali e nei campioni cervicali previa fissazione attraverso l'immunofluorescenza, purtroppo non utilizzabile nella routine. Sebbene la sensibilità e la specificità del test siano elevate rispetto all'esame microscopico a fresco e alla coltura, è essenzialmente un metodo di laboratorio che richiede un supporto tecnico qualificato.

Alcuni test *Point-Of-Care* (POC), hanno dimostrato di essere più sensibili rispetto all'esame microscopico a fresco e paragonabili alla coltura, ma sono meno sensibili dei NAAT per l'individuazione di Tv in campioni provenienti da pazienti di sesso femminile (8).

Indagini sierologiche

Per il rilevamento degli anticorpi contro Tv, in passato sono state descritte diverse tecniche che però risultano poco sensibili o specifiche per il rilevamento dell'infezione in corso. Inoltre, i test anticorpali positivi potrebbero riflettere la reattività crociata con *Trichomonas* spp non patogeni. Di conseguenza, i test di rilevamento anticorpale non possono essere raccomandati per la diagnosi di routine (9).

Campioni clinici

I metodi per la raccolta dei campioni per la ricerca di Tv sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Campioni e metodi per una corretta raccolta di campioni per la ricerca di Tv

Campione	Procedura di campionamento
Tampone vaginale	Procedere con la pulizia dei genitali esterni usando un tampone di garza sterile inumidito con soluzione salina fisiologica sterile Inserire uno speculum ginecologico Raccogliere, mediante l'ausilio di un tampone di cotone/dacron il materiale presente a livello della fornice posteriore e laterale della vagina Nelle donne sottoposte a isterectomia, i campioni devono essere prelevati dalla fornice laterale della vagina I tamponi vaginali raccolti autonomamente dalle pazienti possono essere considerati campioni idonei solo se vengono analizzati mediante test colturali e NAAT
Urina primo mitto (Donna e Uomo)	Raccogliere in un contenitore sterile 20 ml di urina primo mitto. Prima della raccolta, il soggetto deve avere tenuto l'urina in vescica per almeno 2 ore Al fine di aumentare la sensibilità dei test utilizzati si può procedere con la centrifugazione del campione
Tampone uretrale (Uomo)	In presenza di essudato uretrale, questo può essere raccolto mediante l'ausilio di un tampone sterile di cotone/dacron In assenza di essudato, si deve introdurre nell'uretra per 1-2 cm un tampone sterile di cotone/dacron e farlo ruotare delicatamente
Prepuzio	Procedere con la pulizia dei genitali esterni mediante l'ausilio di garze e/o tamponi sterili imbevuti con soluzione salina fisiologica sterile Prelevare con un tampone sterile il materiale presente a livello del sacco sub-prepuziale

Chlamydia trachomatis

Chlamydia trachomatis (Ct) è un batterio intracellulare obbligato che infetta le cellule epiteliali e i fibroblasti. A causa dell'interazione con vari fattori dell'ospite e i batteri commensali, la replicazione nelle cellule infette dell'ospite infette varia considerevolmente e può risultare molto bassa nelle infezioni asintomatiche e persistenti.

Pertanto, il rilevamento diretto di Ct richiede l'uso di test ad alta sensibilità.

La ricerca di Ct deve essere effettuata nei pazienti con sintomi urogenitali, anorettali e oculari, pazienti con IST non clamidiali, contatti sessuali di persone con IST (10).

Esame colturale

Le linee cellulari utilizzate per l'isolamento di Ct includono le cellule Mc Coy, HeLa 229 o Buffalo Green Monkey Kidney. I tamponi provenienti da diversi siti anatomici (endocervice, uretra, canale anale e congiuntiva) sono campioni idonei per coltura ma devono essere raccolti utilizzando dispositivi e mezzi di trasporto idonei. Le cellule vengono infettate e dopo 48-72 ore vengono valutati lo sviluppo di inclusioni intra-citoplasmatiche caratteristiche del microrganismo mediante colorazione con Giemsa, iodio o anticorpi marcati con fluorescenza rivolti contro antigeni clamidiali (Liposaccaridico, LPS, o proteina maggiore della membrana esterna, *Major Outer Membrane Protein*, MOMP). L'impiego di anticorpi specifici per la MOMP consente un rilevamento altamente specifico, per tale motivo l'indagine colturale è stata a lungo considerata il test di riferimento per il rilevamento di Ct.

La sensibilità della coltura può essere pregiudicata dalla raccolta, conservazione e trasporto inadeguato dei campioni, dalla presenza di sostanze tossiche nei campioni clinici e dall'eccessiva proliferazione nelle colture cellulari dei microrganismi commensali. Ulteriori svantaggi sono rappresentati dai lunghi tempi di esecuzione, dall'impegno lavorativo e dalle difficoltà di standardizzazione. L'indagine colturale rimane ancora necessaria, e deve essere eseguita in laboratori di riferimento, per monitorare la suscettibilità agli antibiotici e la valutazione della virulenza microbica (11).

NAAT

I NAAT sono generalmente considerati il gold standard per la ricerca di Ct e hanno sostituito l'esame colturale. Sono test paragonabili alla coltura, ma differentemente da questa, i risultati non sono influenzati dalla vitalità del microrganismo, consentendo quindi il trasporto dei campioni senza l'applicazione di procedure particolari.

In numerosi studi, i risultati di diversi NAAT sono risultati altamente concordanti, invece risultati discordanti sono stati correlati alla scoperta della variante svedese di Ct (Ct strain E/SW2), che contiene una delezione di 377 paia di basi nel plasmide criptico, che corrisponde alla regione target di molti NAAT.

La sensibilità dei NAAT può anche essere implementata intervenendo sulla fase d'estrazione dell'acido nucleico, ad esempio mediante l'uso di biglie magnetiche ottenendo una maggiore quantità di DNA microbico (12).

Test di diagnosi rapida

La maggior parte dei test di diagnosi rapida (*Rapid Diagnostic Test*, RDT) sono test immunocromatografici che si basano sul rilevamento dell'antigene di natura lipopolisaccaridica nei tamponi genitali o nelle urine. Rispetto alle indagini colturali e al NAAT sono test significativamente meno sensibili e specifici (13).

Sono test che possono essere eseguiti direttamente al letto del paziente e possono essere impegnati quando è necessario instaurare rapidamente una terapia antibiotica.

A causa della loro ridotta sensibilità, tali test, negli ultimi anni, sono stati soppiantati da RDT che si basano sull'amplificazione genica e quindi in termini di sensibilità e specificità sono paragonabili ai NAAT convenzionali (14).

Indagini sierologiche

La ricerca di anticorpi anti-Ct è poco utile per la diagnosi d'infezione uro-genitale poiché gli anticorpi sono rilevabili solo dopo due settimane dall'inizio dell'infezione; inoltre, i titoli anticorpali si possono mantenere bassi e si possono avere fenomeni di cross-reattività con altre specie di *Chlamydia* spp.

La ricerca anticorpale risulta invece molto utile nella diagnosi di infezioni croniche e invasive quali la Malattia Infiammatoria Pelvica (MIP), il linfogranuloma venereo (LGV), l'artrite reattiva acquisita sessualmente (SARA) e le polmoniti neonatali.

In queste patologie il microorganismo non è rilevabile nei campioni uro-genitali mentre la ricerca sierologica può risultare positiva (15).

Campioni clinici

I tamponi uretrali, cervicali, vulvo-vaginali, anorettali e oculari, l'urina primo mitto, il liquido spermatico e i tessuti, sono campioni che possono essere considerati idonei se utilizzati per l'esecuzione dei NAAT.

I campioni non invasivi sono da preferire per effettuare lo screening nei pazienti asintomatici.

Nei soggetti di sesso maschile, poiché la concentrazione del microorganismo si riduce durante la minzione, è importante raccogliere i primi 20 ml di urina prodotta. Al contrario, nelle donne con infezione uro-genitale da Ct, la concentrazione è relativamente più alta nei tamponi genitali rispetto alle urine, per tale motivo il tampone vaginale (anche quello raccolto autonomamente dalle pazienti) può essere considerato un campione adeguato e idoneo. In ogni caso, se il prelievo dell'urina del primo mitto è l'unico campione disponibile, si deve considerare che il tasso di rilevamento è inferiore del 10% rispetto ai tamponi vaginali e endocervicali.

Per rilevare l'infezione da Ct in campioni extra-genitali è necessario eseguirne la ricerca su tamponi o pezzi biotici rappresentativi del sito.

Ad esempio nei maschi che fanno sesso con maschi (MSM) l'infezione è frequentemente localizzata a livello ano-rettale o faringeo; la maggior parte di queste infezioni va persa se si esaminano i campioni di urina. Nonostante i NAAT ad oggi disponibili in commercio non sono validati per testare tali campioni, dati di letteratura hanno mostrato che le percentuali di rilevamento di tali test sono superiori ai test colturali o antigenici.

Infine possono essere analizzati mediante NAAT anche i campioni di endometrio o le biopsie linfonodali in pazienti con MIP o LGV. La conferma di LGV richiede l'identificazione dei genotipi L1, L2 o L3. La tipizzazione di Ct nel LGV è importante a causa dei lunghi periodi di trattamento farmacologico a cui il paziente deve essere sottoposto (16-17).

Treponema pallidum

La sifilide è un'infezione batterica a trasmissione sessuale (IST) causata da *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) (18).

I principali test di screening e di diagnosi per la sifilide sono riassunti nella Tabella 2.

Tabella 2. Test di screening e di diagnosi per la sifilide

Test	Descrizione
Basati sulla lesione	
- Microscopia in campo oscuro - Immunofluorescenza diretta - NAAT	- Eseguibili su materiale prelevato dal sifiloma, dalle lesioni secondarie, dai linfonodi o dalle lesioni mucocutanee
Test sierologici	
<i>Non treponemici</i> - VDRL - RPR	- Test quantitativi non specifici - Rilevano la presenza di Ab anti-lipidi treponemici (IgM e/o IgG), utilizzando come Ag la cardiolipina - Potrebbero risultare negativi nel 15-25% dei casi di sifilide primaria - Hanno una sensibilità del 100% nei casi di sifilide secondaria - Potrebbero dare dei falsi positivi in presenza d'infezione da HIV (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>), patologie vascolari, uso di stupefacenti, età avanzata, gravidanza, malattie epatiche croniche, infezioni da virus Epstein-Barr e altre condizioni infiammatorie croniche
<i>Treponemici</i> - TPHA - TPPA - FTA-ABS	- Utilizzano antigeni specifici di <i>T. pallidum</i> - Gli anticorpi che vengono rilevati non possono essere utilizzati per diagnosticare re-infezioni o per monitorare la risposta alla terapia - Più specifici rispetto ai test non treponemici - Risultano positivi dopo circa 7-10 giorni dall'infezione - Raramente producono risultati falsi positivi
VDRL	<i>Venereal disease research laboratory</i>
RPR	<i>Rapid plasma reagin</i>
TPHA	<i>Treponema pallidum haemagglutination assay</i>
TPPA	<i>Treponema pallidum particle agglutination assay</i>
FTA-ABS	<i>Fluorescent treponemal antibody absorbed</i>

Di seguito vengono illustrati nel dettaglio i principali test di screening e diagnosi per la sifilide.

Esame microscopico

L'esame microscopico in campo oscuro è il metodo con più elevata specificità per effettuare diagnosi di sifilide primaria. La dimostrazione di batteri spiraliformi e mobili, infatti è indicativa di un'infezione attiva. Tale indagine va eseguita immediatamente dopo la raccolta del campione, (materiale prelevato dal sifiloma, dalle lesioni secondarie, dai linfonodi o dalle lesioni mucocutanee nei neonati), richiede attrezzature specializzate, un operatore esperto ed è quindi solitamente limitato a laboratori specializzati.

Nonostante sia un'indagine altamente specifica, la sua sensibilità, tuttavia, è inferiore al 50%, quindi un risultato negativo non esclude la presenza d'infezione da *T. pallidum* (19).

Sulla stessa tipologia di campioni si può applicare l'esame microscopico con l'immunofluorescenza diretta, utilizzando anticorpi anti-*T. pallidum* marcati con fluoresceina. I batteri, resi fluorescenti, dopo legame con gli anticorpi fluorescenti saranno facilmente rilevati nel campo oscuro e sarà così assicurata una maggiore sensibilità e specificità.

Anche in questo caso è richiesta un'attrezzatura specializzata e gli anticorpi anti-*T. pallidum* sono disponibili in commercio solo in alcuni paesi (20).

NAAT

I NAAT rilevano direttamente il DNA di *T. pallidum* da qualsiasi essudato, tessuto o fluido corporeo; la sensibilità varia in base al test utilizzato (21).

Indagini sierologiche

Per la diagnosi di sifilide esistono due tipi di indagini sierologiche classificate come indagini non treponemiche e treponemiche. Entrambe si eseguono sul campione di siero.

I test non treponemici più utilizzati sono: il test *Venereal Diseases Research Laboratory* (VDRL) e il test *Rapid Plasma Reagin* (RPR). Entrambi rilevano la presenza di anticorpi anti-lipidi treponemici, IgM e/o IgG, utilizzando come antigene la cardiolipina e servono per valutare l'attività della malattia e la risposta terapeutica.

I test non treponemici non sono altamente specifici poiché possono dare risultati falsi positivi in presenza d'infezioni virali, malattie autoimmuni croniche e durante la gravidanza. La maggior parte dei risultati falsi positivi ha titoli anticorpali bassi, inferiori di 1:4. I test non treponemici possono essere negativi fino a quattro settimane dopo la comparsa della lesione sifilitica primaria e della sifilide latente tardiva; inoltre nella sifilide primaria e secondaria, questi test possono essere falsi negativi a causa di una reazione prozona. Nella sifilide primaria, in presenza di lesioni sospette, può essere necessario ripetere il test dopo due e quattro settimane per escludere l'infezione da *T. pallidum*. I titoli anticorpali valutati con i test non treponemici quantitativi possono essere utilizzati per il monitoraggio della risposta al trattamento farmacologico. I titoli, dopo un trattamento efficace, diminuiscono mentre un aumento si evidenzia durante un'infezione in corso e non trattata. Un aumento quadruplo o superiore in titolo, equivalente ad una variazione di almeno due diluizioni (es. da 1:16 a 1:4 per una risposta positiva efficace al trattamento, o da 1:8 a 1:32 per infezione attiva continuata) è considerata una differenza significativa tra due test sequenziali ottenuti usando lo stesso metodo (es. VDRL o RPR) e preferibilmente effettuati presso lo stesso laboratorio. I titoli che differiscono per una sola diluizione (ad esempio 1:8 contro 1:4 o 1:2 rispetto a 1:1) non devono essere considerati significativi.

I test treponemici includono: il *Treponema pallidum haemagglutination assay* (TPHA), il *Treponema pallidum particle agglutination assay* (TPPA) e il *Fluorescent Treponemal Antibody Absorbed* (FTA-ABS). Sono test altamente specifici che si basano sulla ricerca degli anticorpi diretti contro antigeni specifici del *T. pallidum* e vengono utilizzati ai fini diagnostici. I test treponemici, rimanendo positivi in circa l'85% dei soggetti infetti non consentono di differenziare un caso d'infezione in corso da una precedentemente trattata.

I neonati vivi o i nati da madri sieropositive devono essere sottoposti ad indagini per escludere una sifilide congenita. I loro sieri devono essere esaminati alla nascita e ad intervalli mensili di tre mesi. Fino a quando non viene confermato che i test sierologici sono, e rimangono, negativi.

Gli anticorpi eventualmente rilevati possono essere quelli materni, che generalmente scompaiono entro tre o quattro mesi dopo la nascita, raramente possono persistere fino a 18 mesi. In questi casi, è necessario ripetere e valutare il titolo anticorpale per rilevare un aumento di

quattro volte o più del titolo di un test non treponemico o treponemico; se ciò avviene il bambino deve essere trattato per la sifilide congenita (22-23).

Test di diagnosi rapida

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati numerosi RDT in grado di fornire dei risultati in 10-15 minuti. La sensibilità dei test rapidi varia dall'85% al 98% e la specificità dal 93% al 98%, rispetto al TPHA o al TPPA.

In generale, gli RDT con sensibilità più elevate tendono ad avere specificità più basse e viceversa. La maggior parte dei test presenti in commercio utilizzano antigeni di *T. pallidum* per rilevare anticorpi specifici: pertanto, un risultato positivo non distingue tra infezione in corso e infezione precedentemente trattata.

Recentemente, sono stati sviluppati test in grado di rilevare anticorpi contro materiali simili alla cardiolipina sfruttando lo stesso principio dei test non treponemici (24-25).

Neisseria gonorrhoeae

La gonorrea, causata da *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), è un'infezione batterica a trasmissione sessuale (26).

Esame microscopico

L'esame microscopico dopo colorazione di Gram può fornire una diagnosi certa di infezione da *N. gonorrhoeae* ma solo se eseguito su tampone uretrale prelevato da un paziente di sesso maschile con i sintomi di un'uretrite.

Nei soggetti sintomatici, la colorazione di Gram può fornire un'alternativa diagnostica meno costosa dei NAAT, diversamente da quanto avviene nei casi d'infezione asintomatica in cui solo il 50-70% risulta positivo all'esame microscopico. L'uso della colorazione di Gram per valutare un quadro infettivo a livello della cervice uterina e rettale è poco affidabile mentre non può essere applicato su campioni faringei (27), non può quindi essere utilizzato ai fini diagnostici.

Esame colturale

L'indagine colturale è economica, specifica e soprattutto sensibile (85-95%) in particolare, in caso di sospetta infezione uretrale ed endocervicale. L'isolamento di *N. gonorrhoeae* richiede però la raccolta di un campione idoneo, un trasporto tempestivo, la semina in terreni di coltura appropriati e adeguate condizioni d'incubazione.

L'esame colturale è stato considerato per molti anni il "gold standard", poiché rappresenta l'unico metodo che consente di valutare la sensibilità agli antimicrobici, data la dimostrata capacità del batterio di sviluppare resistenza a molte classi di farmaci (28). Pertanto, l'esame colturale con successivo antibiogramma dovrebbe essere eseguito anche nei casi di test molecolare positivo, prima dell'inizio della terapia antibiotica, nel sospetto di fallimento terapeutico e in caso di infezioni persistenti (29, 30).

NAAT

I NAAT, altamente sensibili e specifici, possono essere eseguite su un'ampia gamma di campioni, inclusi l'urina, il secreto vaginale, cervicale, uretrale, rettale, oro-faringeo, raccolti anche mediante tampone.

Si raccomanda che i campioni rettali e faringei risultati positivi vengano confermati con un test supplementare, ad esempio NAAT con una diversa sequenza bersaglio (livello IIb, B).

Un inconveniente dei NAAT attualmente disponibili è la loro incapacità di fornire informazioni sulla suscettibilità antimicrobica. Per tale motivo l'indagine colturale dovrebbe essere eseguita in parallelo per consentire l'esecuzione dei test di sensibilità microbica.

Negli ultimi anni sono stati introdotti in commercio dei point of care che si basano sull'amplificazione genica e rilevano contemporaneamente la presenza di *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*. La co-infezione è stata rilevata nel 10-20% dei pazienti con gonorrea (31, 32).

Mycoplasmas genitalium

L'infezione da *M. genitalium* è associata all'uretrite non gonococcica (NGU) e all'uretrite non gonococcica non clamidiale (NG_{NC}) nell'uomo, mentre nella donna è associata a uretrite, cervicite, endometrite e malattia infiammatoria pelvica (MIP) (33).

NAAT

I NAAT rappresentano il metodo più sensibile e specifico per la rilevazione di questo microrganismo. Sono disponibili in commercio vari test, che abbinano alla ricerca di *M. genitalium* la ricerca di altri micoplasmi genitali o di altri microrganismi causa di IST. È stata dimostrata in Europa la comparsa di ceppi resistenti ai macrolidi (azitromicina) e più recentemente ai fluorochinoloni (moxifloxacina).

In caso di diagnosi molecolare, è necessario utilizzare i tamponi di trasporto e/o lisi previsti dai test disponibili in commercio (34).

Bibliografia

1. Fichorova RN. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *J Reprod Immunol* 2009;83:185–9.
2. Patil MJ, Nagamoti JM, Metgud SC. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet mount microscopy, In Pouch TV culture system, and PCR. *J Glob Infect Dis* 2012;4:22–5.
3. Menezes CB, Mello Mdos S, Tasca T. Comparison of permanent staining methods for the laboratory diagnosis of Trichomoniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016;58:5.
4. Madhumati J Patil, Jyoti M Nagamoti, Sharada C Metgud. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* from vaginal specimens by wet mount microscopy, in pouch TV culture system, and PCR. *J Glob Infect Dis* 2012;4(1):22-5.
5. Garber GE, Sibau L, Ma R, Proctor EM, Shaw CE, Bowie WR. Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1987;25:1275–9.
6. Lee JJ, Moon HS, Lee TY, Hwang HS, Ahn MH, Ryu JS. PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. *Korean J Parasitol* 2012;50:157–9.

7. Caliendo AM, Jordan JA, Green AM, Ingersoll J, Diclemente RJ, Wingood GM. Real-time PCR improves detection of *Trichomonas vaginalis* infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005;13:145–50.
8. Gaydos CA, Klausner JD, Pai NP, Kelly H, Coltart C, Peeling RW. Rapid and point-of-care tests for the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in women and men. *Sex Transm Infect* 2017;93(S4):S31-S35.
9. Kaur S, Khurana S, Bagga R, Wanchu A, Malla N. Antitrichomonas IgG, IgM, IgA, and IgG subclass responses in human intravaginal trichomoniasis. *Parasitol Res* 2008;103(2):305-12.
10. Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, Hay S, *et al.* Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ* 2010;8:c1642.
11. Scidmore MA. Cultivation and Laboratory Maintenance of *Chlamydia trachomatis*. *Curr Protoc Microbiol* 2005;Chapter 11:Unit 11A.1
12. Rondeau P, Valin N, Decré D, Girard PM, Lacombe K, Surgers L. *Chlamydia trachomatis* screening in urine among asymptomatic men attending an STI clinic in Paris: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2019;19(1):31.
13. Zarakolu P, Çetik S, İnkaya AÇ, Ünal S. Comparison of immunochromatographic (IC) and real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) tests for screening *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma* spp. in HIV-infected men. *Mikrobiyol Bul* 2019;53(1):37-42.
14. Widdice LE, Hsieh YH, Silver B, Barnes M, Barnes P, Gaydos CA. Performance of the Atlas Genetics Rapid Test for *Chlamydia trachomatis* and women’s attitudes toward Point-Of-Care testing. *Sex Transm Dis* 2018;45(11):723-7.
15. Hoenderboom BM, van Benthem BHB, van Bergen JEAM, Dukers-Muijters NHTM, Götz HM, Hoebe CJPA, Hogewoning AA, Land JA, van der Sande MAB, Morré SA, van den Broek IVF. Relation between *Chlamydia trachomatis* infection and pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and tubal factor infertility in a Dutch cohort of women previously tested for chlamydia in a chlamydia screening trial. *Sex Transm Infect* 2019;95(4):300-6.
16. Wisniewski CA, White JA, Michel CE, Mahilum-Tapay L, Magbanua JPV, Nadala ECB Jr, Barber PJ, Goh BT, Lee HH. Optimal method of collection of first-void urine for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection in men. *J Clin Microbiol* 2008;46:1466–9
17. Dudareva Vizule S, Haar K, Sailer A, Flores JA, Silva-Santisteban A, Galea JT, Coates TJ, Klausner JD, Caceres CF. Prevalence of pharyngeal and rectal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections among men who have sex with men in Germany. *Sex. Transm. Infect* 2014;90:46–51.
18. Centers for Disease Control and Prevention. *Syphilis (Treponema pallidum) 2018 Case Definition*. Disponibile all’indirizzo: <https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/syphilis/case-definition/2018/>; ultima consultazione 11/05/2020.
19. Pierce EF, Katz KA. Darkfield microscopy for point-of-care syphilis diagnosis. *MLO Med Lab Obs* 2011;43(1):30-1
20. Phelps RG, Knispel J, Tu ES, Cernainu G, Saruk M. Immunoperoxidase technique for detecting spirochetes in tissue sections: comparison with other methods. *Int J Dermatol* 2000;39(8):609-13.
21. Grange PA, Gressier L, Dion PL, *et al.* Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* 2012; 50(3):546-52
22. Chi KH, Danavall D, Taleo F, *et al.* Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies in skin ulceration clinically suspected as yaws in Vanuatu using real-time multiplex PCR and serological methods. *Am J Trop Med Hyg* 2015;92(1):134-8.

23. Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *Clin Infect Dis* 2010;51(6):700-8.
24. Zarakolu P, Buchanan I, Tam M, Smith K, Hook EW, 3rd. Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):3064-5.
25. Castro AR, Esfandiari J, Kumar S, et al. Novel point-of-care test for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *J Clin Microbiol* 2010; 48(12):4615-9.
26. Buder S, Schöfer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, Brockmeyer N. Bacterial sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges* 2019;17(3):287-315.
27. Su WH, Tsou TS, Chen CS, Ho TY, Lee WL, Yu YY, Chen TJ, Tan CH, Wang PH. Are we satisfied with the tools for the diagnosis of gonococcal infection in females? *J Chin Med Assoc* 2011 Oct;74(10):430-4.
28. European Centre for Disease Prevention and Control. *Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2016*. Stockholm: ECDC; 2018.
29. Visser M, van Westreenen M, van Bergen J, van Benthem BHB. Low gonorrhoea antimicrobial resistance and culture positivity rates in general practice: a pilot study. *Sex Transm Infect* 2020;96(3):220-2.
30. Unemo M, Del Rio C, Shafer WM. Antimicrobial resistance expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: a major global public health problem in the 21st century. *Microbiol Spectr* 2016;4 (3):10.1128/microbiolspec.EI10-0009-2015.
31. den Heijer CDJ, Hoebe CJPA, van Liere GAFS, et al. A comprehensive overview of urogenital, anorectal and oropharyngeal *Neisseria gonorrhoeae* testing and diagnoses among different STI care providers: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2017;17(1):290.
32. Causer L.M, Guy R.J, Tabrizi S.N, Whiley D. M, Speers D. J, Ward J., Tangey A., Badman S. G, Hengel B., Natoli L.J., Anderson D. A, Wand H., Wilson D., Regan D.G, Shephard M., Donovan B., Fairley C.K, Kaldor J. M. Molecular test for chlamydia and gonorrhoea used at point of care in remote primary healthcare settings: a diagnostic test evaluation. *Sex Transm Infect* 2018;0:1-7.
33. Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:1650-6.
34. Lima LM, Hoelzle CR, Simões RT, Lima MIM, Fradico JRB, Mateo ECC, Zauli DAG, Melo VH. Sexually transmitted infections detected by multiplex Real Time PCR in asymptomatic women and association with cervical intraepithelial neoplasia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018;40(9):540-6.