



Rilevamento di specie ascrivibili al genere *Chlamydia* in campioni animali, attraverso Fast Real Time PCR - Detection of *Chlamydia* species from animal samples through a fast real-time PCR assay

Ludovica Curcio, Carla Sebastiani, Marcella Ciullo, Massimo Biagetti

Riassunto. I più importanti parassiti intracellulari ed endosimbionti degli organismi eucarioti sono le *Chlamydiaceae*. Essi sono i responsabili di un ampio spettro di malattie sia negli esseri umani che negli animali. Saggi diagnostici in ambito veterinario, sono mirati alle *Chlamydiaceae* e consentono di identificare le malattie da esse sostenute, riducendo le perdite economiche per gli allevatori ed i rischi per la salute umana. In questo articolo vengono riportati e discussi set up e validazione di un protocollo Fast Real-time PCR, che fornisce un potente strumento analitico per un rapido e preciso rilevamento delle *Chlamydiaceae*.

Abstract. The most clinically important intracellular parasites and endosymbionts of eukaryotic hosts are the *Chlamydiaceae*; they cause a wide spectrum of diseases in humans and animals. Veterinary diagnostic assays targeting *Chlamydiaceae* allow identifying animal diseases, reducing economic losses for breeders and risks for human health. In this paper we report the set up and validation of a Fast Real-time PCR protocol that provides a powerful analytical tool for rapid, safer and more specific *Chlamydiaceae* detection.

Introduzione

Sulla base dell'analisi di sequenza dei geni codificanti gli rRNA 16S e 23S, la famiglia delle *Chlamydiaceae* è stata divisa in due generi, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, con nove specie di rilevante importanza clinica, veterinaria ed umana: *C. trachomatis* (uomo, topo), *C. suis* (suino), *C. muridarum* (topo, criceto), *C. psittaci* (uccelli), *C. felis* (gatti), *C. abortus* (bovini, ovini, caprini), *C. caviae* (cavia), *C. pecorum* (bovini, ovini), *C. pneumoniae* (uomo) (Everett et al., 1999; Zocevic et al., 2013).

Recentemente è stata proposta una revisione della classificazione che prevede di riunire i due generi *Chlamydia* e *Chlamydophila* nell'unico genere *Chlamydia* (OIE, 2014).

I microrganismi appartenenti a questo genere sono Gram negativi, intracellulari obbligati con un ciclo riproduttivo bifasico caratterizzato da una fase replicativa intracellulare (corpi reticolari non infettanti) ed una fase extracellulare (corpi elementari infettanti) (Rodolakis e Mohamad, 2010). Tra le specie patogene *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia abortus* e *Chlamydia psittaci* sono responsabili di un'ampia gamma di malattie sia dell'uomo sia degli animali. In questi ultimi, l'infezione da *Chlamydia* può portare ad evidenti forme cliniche come infezioni della placenta e dei feti con conseguenti aborti, sterilità e a volte mastiti. Frequentemente, questa infezione persiste in animali asintomatici che eliminano il patogeno per lunghi periodi (Storz, 1988)

Diversi sono i tipi di approccio alla diagnosi della clamidiosi, tra cui la rilevazione diretta dell'agente mediante PCR, isolamento e identificazione, metodi di colorazione in tessuti, tamponi, organi. I metodi molecolari, in particolare la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettono di identificare direttamente il patogeno con tempi di diagnosi brevi. La PCR, comparata ad altre tecniche diagnostiche, è il metodo di elezione per la sua rapidità, sensibilità, specificità, rapporto costo-beneficio. Per rilevare tutte le specie di *Chlamydia*, si utilizzano protocolli in PCR aventi come target le regioni geniche codificanti l'rRNA ribosomiale 16S o 23S, oppure il gene *ompA* (Everett et al., 1999; Zocevic et al., 2013; Rodolakis e Mohamad, 2010). Tra le analisi basate sulla PCR la più vantaggiosa è la PCR Real-time in quanto è una tecnica rapida e specifica, che permette la rilevazione e la quantificazione del patogeno d'interesse (Ehricht et al., 2006; Geens et al., 2005 a-b; Pantchev et al., 2009; Pantchev et al., 2010). Inoltre con la PCR Real-time non c'è necessità di alcuna manipolazione post-PCR dell'amplificato consentendo pertanto di ridurre i tempi di analisi ed il rischio di contaminazioni ambientali. Tale metodica rappresenta quindi un valido strumento per la rapida identificazione (circa 1,30–2 ore) di microorganismi patogeni. Ultimamente sono stati ottimizzati dei protocolli in PCR Real Time con modalità "Fast" che riducono i tempi di analisi a 30 - 40 minuti.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di sostituire il protocollo di PCR end-point per la diagnosi di *Chlamydia* con una Fast PCR Real-Time riducendo in modo significativo i tempi di analisi e allo stesso tempo il rischio di possibili contaminazioni da amplificato e quindi i falsi positivi.

Materiali e metodi

Per la messa a punto del metodo in Fast Real-time PCR, sono stati utilizzati campioni risultati positivi all'analisi con il protocollo di PCR end-point per *Chlamydia* spp. utilizzato per l'attività di routine diagnostica (Vicari et al., 2004).

Il DNA è stato estratto da omogenati d'organo (feti, annessi fetali) e da tamponi vaginali di ruminanti e volatili con il kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) secondo le istruzioni del produttore.

In questo lavoro il target scelto per l'identificazione di *Chlamydia* spp. è il gene codificante l'rRNA 23S (Ehricht et al., 2006). I primers e la sonda utilizzati, tratti dallo studio di Ehricht et al (2006) sono stati saggiati in PCR Real-time in modalità Fast.

La reazione è stata allestita in un volume finale di 20 µl utilizzando primer 0,5 µM, sonda 0,2 µM, TaqMan Fast Universal PCR Master Mix e 2 µl di DNA adottando il seguente profilo di amplificazione: 95°C per 20 secondi, 40 cicli a 95°C per 1 secondo e 60°C per 20 secondi.

Per la validazione del metodo è stato calcolato il LOD (Limit of Detection) e sono stati valutati i parametri di sensibilità, specificità e robustezza.

Per il calcolo del LOD (Limit of Detection), la sequenza target è stata amplificata con i primers utilizzati per la PCR Real-time tramite un protocollo PCR touch-down (Vicari et al., 2004) La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl utilizzando 1X Buffer, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 0,4 µM di ciascun primer, 1U di AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Life Technologies) e 5 µl di template con il seguente profilo di amplificazione: 95°C per 15 min, 5 cicli a 94°C per 30 sec, 60°C per 30 sec e 72°C per 30 sec e successivamente 35 cicli a 94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec, e 72°C per 30 sec; infine 72°C per 5 min.

L'amplificato ottenuto è stato purificato con il kit commerciale QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®) e successivamente quantizzato con lettura al biofotometro. E' stato poi stimato il numero di copie genomiche (c.g.) (Thermo Scientific®). Sono state allestite 8 diluizioni seriali 1:2 da 6,7 a 0,05 copie genomiche (c.g.). Per ciascuna diluizione sono stati saggiati 10 replicati in Fast PCR Real-time sulla piattaforma StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies)

Per valutare la sensibilità e la specificità sono stati analizzati 10 campioni positivi per *Chlamydia* spp e 10 campioni appartenenti ad altre specie (Tabella 1).

CAMPIONI NEGATIVI
<i>C. perfringens</i> Tossinotipo A
<i>C. perfringens</i> Tossinotipo A + β_2
<i>S. aureus</i> Mec A+
<i>M. agalactiae</i>
<i>M. gallisepticum</i>
<i>M. synoviae</i>
<i>E. coli</i> (coniglio)
<i>E. coli</i> (coniglio)
<i>E. coli</i> (bovino)
<i>Neospora caninum</i>

Tabella 1. Ceppi di campo negativi per *Chlamydia*

Per la stima della robustezza, la prova è stata eseguita sugli stessi campioni utilizzati per le prove di sensibilità e specificità utilizzando una differente piattaforma di PCR Real-time, lo strumento ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies).

Risultati e conclusioni

I protocolli di PCR end-point e di Fast PCR Real-Time sono stati messi a confronto (figura 1).

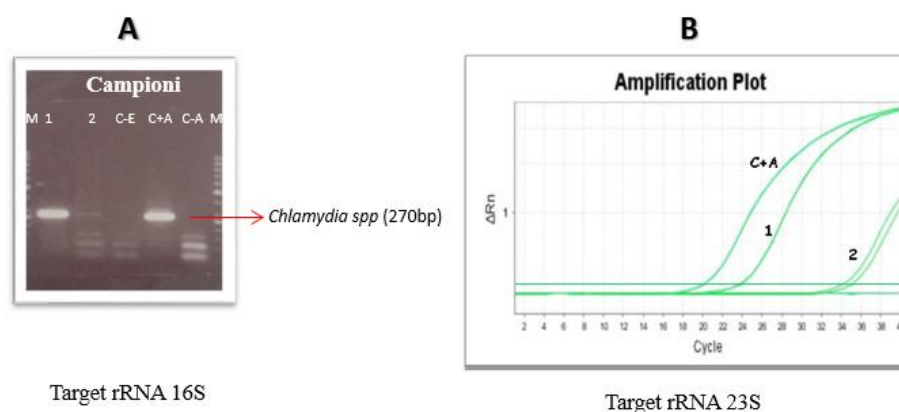


Figura 1. Metodiche a confronto: 1) CAMPIONE positivo; 2) CAMPIONE debolmente positivo; C-E) controllo negativo di estrazione; C+A) controllo positivo di amplificazione; C-A) controllo negativo di amplificazione. I campioni sono stati analizzati con le metodiche:

A) PCR end-point

B) Fast PCR Real-time (campioni e controlli analizzati in doppio): 1) CAMPIONE positivo (Ct= 24); 2) CAMPIONE debolmente positivo (Ct=35); C+A) controllo positivo di amplificazione (Ct=20)

L'esito ottenuto dalle due metodiche è risultato concordante. Mentre il risultato della PCR end-point su gel d'agarosio è a volte di difficile interpretazione per la presenza di aspecifici e variazioni di background, la Fast PCR Real-Time permette un'analisi del dato più oggettiva, riuscendo nello stesso tempo a ridurre i tempi di risposta e le contaminazioni.

Il LOD è stato considerato corrispondente alla maggiore diluizione alla quale si aveva amplificazione nel 100% dei replicati. Il LOD è risultato pari a 3,6 c.g. con un ciclo soglia (Ct) medio di 36.

I risultati ottenuti dai 10 campioni positivi per *Chlamydia* spp e dai 10 campioni negativi hanno permesso di stimare i parametri di sensibilità e di specificità che sono risultati pari al 100%.

La robustezza del saggio, parametro utile per verificare la capacità di un metodo di non essere influenzato da piccole ma deliberate variazioni, è stata valutata allestendo la stessa prova di sensibilità e specificità su una diversa piattaforma strumentale ed ha riportato il 100% di concordanza dei risultati.

L'adozione della PCR Real-time in modalità Fast, risulta un valido strumento di miglioramento, in quanto consente di ridurre i tempi di analisi di circa 1/3 rispetto alla modalità standard. Inoltre apporta dei miglioramenti rispetto alla PCR end-point in quanto, consentendo di eliminare la fase di lettura degli amplificati su gel d'agarosio, permette di ridurre i tempi di risposta e allo stesso tempo, escludendo l'utilizzo del bromuro d'etidio, garantisce una maggiore sicurezza per l'operatore.

Pertanto il metodo Fast PCR Real-Time sembra essere un buon strumento per la diagnosi rapida delle infezioni causate da *Chlamydia* negli animali.

Bibliografia

Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Molecular and cellular Probes*. 20:60-63.

Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. (1999). Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*; 49 (Pt 2): 415-440

Geens T., Desplanques A., Van Loock M., Bönner B.M., Kaleta E.F., Magnino S., Andersen A.A., Everett K.D., Vanrompay D. (2005a). Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *Journal of Clinical Microbiology*; 43(5): 2456-2461.

Geens T., Dewitte A., Boon N., Vanrompay D. (2005b). Development of a *Chlamydophila psittaci* species specific and genotype-specific Real-Time PCR. *Veterinary Research*; 36(5-6): 787-797

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014, Chapter 2.3.1

Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Veterinary Journal*; 181(2): 145-150.

Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2010). Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*; 33(6): 473-484.

Rodolakis, A., Mohamad, K.Y.(2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*, *Veterinary Microbiology* 140 (3-4) 382-391

Storz J. 1988. overview of animal disease induced by chlamydial infection In : *Microbiology of chlamydia* ed. Barron AL pp167-192 CRC press Boca Raton FL.

Thermo Scientific bio <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/>

Vicari, N., Santoni, R., Vigo, P.G., Magnino, S. (2004). A PCR-RFLP assay targeting the 16S ribosomal gene for the diagnosis of animal chlamydioses. *Proceedings, 5th Meeting of the European Society for Chlamydia Research* (Ed.: Judith Deak), Budapest, Hungary, 1-4 September 2004, p. 297

Zocevic A, Vorimore F, Vicari N, Gasparini J, Jacquin L, Sachse K, Magnino S, Laroucau K. (2013). A Real-time PCR Assay for the Detection of Atypical Strains of Chlamydiaceae from Pigeons. Plos ONE 8(3): 1-5.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	