

ANALISI MOLECOLARE DI CLAMIDIE ISOLATE DA INTESTINO E TAMPONI CLOACALI DI PICCIONI CATTURATI NELLE CITTA' DI MILANO E FERRARA

Vicari N.¹, Laroucau K.², Vorimore F.², Barbieri I.³, Sachse K.⁴, Hotzel H.⁴, Fabbi M.¹, Labalestra I.¹, Magnino S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Sezione di Pavia, Centro di Referenza Nazionale per le Clamidosi animali, ²Unité Zoonoses Bactériennes, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Lerpaz), 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort cedex, France; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di Analisi Genomiche, Brescia, ⁴Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany.

Key words: piccioni, tipizzazione molecolare, Chlamydiaceae

ABSTRACT

In order to identify and characterize six chlamydial isolates from cloacal swabs and intestines of feral pigeons, several molecular analyses were performed. DNA from the isolates was analyzed using *Chlamydiaceae*-specific real-time PCR, ArrayTube DNA microarray and species-specific molecular detection tools, i.e. real-time PCR, MLVA and complete sequences of *ompA* and 16S rDNA genes. The results obtained and the phylogenetic tree show that our six isolates do not cluster with any known chlamydial species.

INTRODUZIONE

Chlamydomphila (C.) psittaci è l'agente eziologico della clamidosi aviaria negli uccelli e della psittacosi-ornitosi nell'uomo. Si tratta di un microorganismo intracellulare obbligato diffuso in tutto il mondo in quanto veicolato da molte specie di volatili da compagnia (psittacidi e non), e di volatili domestici e selvatici. Ricerche condotte negli ultimi anni hanno evidenziato un'alta percentuale di sieropositività per *C. psittaci* tra i piccioni urbani che vivono liberamente in molte città italiane ed europee. La presenza di *C. psittaci* nei piccioni è stata confermata anche con l'isolamento del microorganismo in coltura cellulare e con metodi molecolari (1). Di seguito sono riportati i dati preliminari ottenuti mediante tipizzazione molecolare di sei ceppi di clamidia isolati da piccioni urbani campionati nelle città di Milano e di Ferrara.

MATERIALI E METODI

I ceppi di clamidia sono stati isolati in colture cellulari da tamponi cloacali (n=4) e da intestino (n=2) di piccioni urbani campionati rispettivamente a Milano e Ferrara. Il DNA è stato estratto con il kit commerciale "DNeasy blood and tissue kit" (Qiagen, Milano, Italia) e quindi analizzato con diverse metodiche molecolari:

- real-time PCR 23S che amplifica una regione del DNA codificante per l'rRNA 23S riconosciuta da una sonda specifica per le specie appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae* (2);
- ArrayTube DNA microarray in grado di riconoscere il DNA di clamidia e contemporaneamente identificare le specie di *Chlamydia* e *Chlamydomphila* coinvolte (3);
- real-time PCR specie-specifica per *C. psittaci* e *C. abortus* (4);
- MLVA (5), un sistema d'analisi VNTR multilocus con un alto potere discriminatorio (20 diversi patterns) in grado di riconoscere 8 diversi loci nel genoma di *C. psittaci*;
- sequenziamento completo del gene *ompA* codificante per la proteina di membrana MOMP (6) e del gene 16S rDNA codificante per l'rRNA ribosomiale (7);
- analisi filogenetica delle sequenze per mezzo del software BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio). Il software ha permesso il confronto tra le sequenze ottenute dal DNA dei sei isolati con un database che include le sequenze più rappresentative di tutte le specie di *Chlamydia* e *Chlamydomphila* conosciute.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il DNA estratto dai sei isolati è risultato positivo soltanto in real-time PCR 23S specifica per *Chlamydiaceae*, mentre non ha dato alcuna positività né con real-time PCR specie-specifica (*C. psittaci*) né con analisi MLVA.

L'analisi ArrayTube DNA microarray (Fig.1) ha messo in evidenza la presenza di una specie non ancora classificata ma appartenente al genere *Chlamydomphila*. Il DNA è stato analizzato senza esito positivo anche con una real-time PCR specifica per nuovi microorganismi appartenenti al genere *Chlamydomphila* isolati di recente in allevamenti francesi di pollame (8).

Questi risultati suggeriscono l'ipotesi della presenza di una nuova specie di clamidia. Le analisi di sequenza, dei geni *ompA* (Fig.2) e 16rDNA (Fig.3) in cui è evidente che i sei isolati formano un cluster distinto dalle altre specie di clamidia, farebbero propendere proprio per questa ipotesi.

CONCLUSIONI

Le analisi molecolari effettuate mostrano che i sei isolati da piccione non sono ricompresi nei cluster delle clamidie finora note. Ulteriori studi molecolari sono in corso al fine di completare la caratterizzazione di queste clamidie, che potrebbero essere ricondotte a una nuova specie.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Magnino S., Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., DovčA., Prukner-Radovčić E., Residbegović E., Ilić V., Laroucau K., Donati M., Martinov S., Kaleta E.F. 2009. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol* 135, 554-567.
- 2) Ehrlich R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes* 20, 60-63.
- 3) Borel N., Kempf E., Hotzel H., Schubert E., Torgerson P., Slickers P., Ehrlich R., Tasara T., Pospischil A., Sachse K. 2008. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay—A validation study. *Mol Cell Probes* 22, 55-64.
- 4) Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydomphila psittaci* and *Chlamydomphila abortus* from tissue samples. *Vet. J.* 181, 145-150.
- 5) Laroucau K., Thierry S., Vorimore F., Blanco K., Kaleta E., Hoop R., Magnino S., Vanrompay D., Sachse K., Myers G.S.A., Bavoil P.M., Vergnaud G., Pourcel C. 2008. High resolution typing of *Chlamydomphila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol* 8, 171-181.
- 6) Sayada C., Andersen A.A., Storey C., Milon A., Eb F., Hashimovto N., Hirai K., Elion J. and E. Denamur. 1995. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. 1995. *Res Microbiol* 146, 155-165.
- 7) Pudjiatmoko, Fukushi H., Ochiai Y., Yamaguchi T. and K. Hirai. 1997. Phylogenetic Analysis of the Genus *Chlamydia* Based on 16s rRNA Gene Sequences. *Int J Syst Bacteriol* 47, 425-431.
- 8) Laroucau K. et al. Submitted for publication.

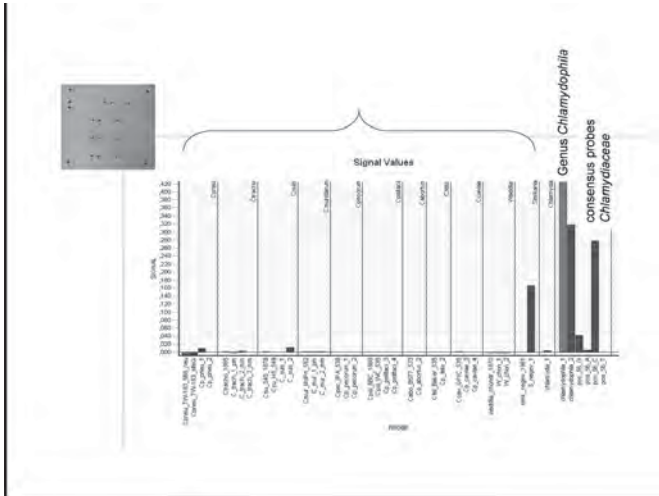


Fig. 1. Analisi ArrayTube DNA microarray per l'identificazione e tipizzazione delle specie di clamidia.

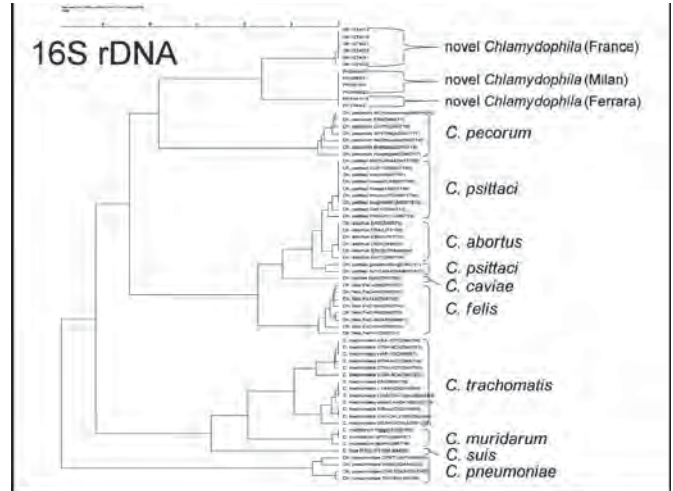


Fig. 3. Albero filogenetico ottenuto confrontando le sequenze complete del gene 16S rDNA ottenute dai sei isolati con sequenze tipo di tutte le specie conosciute di Chlamydia e Chlamydomphila.

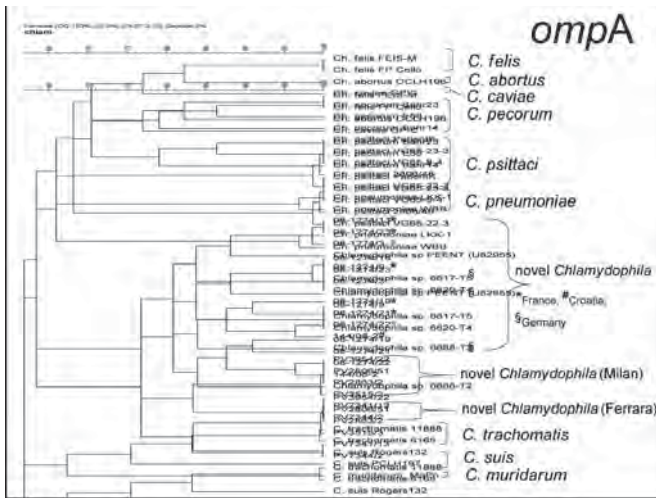


Fig. 2. Albero filogenetico ottenuto confrontando le sequenze complete del gene ompA ottenute dai sei isolati con sequenze tipo di tutte le specie conosciute di Chlamydia e Chlamydomphila.