

Localizzazione e valutazione dell'espressione di *Chlamydomphila pneumoniae* mediante RT-PCR *in situ*

Stefania Cazzavillan¹, Chiara Segala¹, Emanuela Bonoldi¹, Stefania Manfro¹, Emanuele D'Amore¹, Mario Rasso²

¹U.O. Anatomia e Cito-istopatologia

²U.O. Microbiologia e Virologia – AULSS 6 Vicenza, Via Rodolfi, 36100 Vicenza

Key Words: *Chlamydomphila pneumoniae*, RT-PCR *in situ*, Atherosclerosis

SUMMARY

Chlamydomphila pneumoniae, an obligate intracellular gram negative bacterium, is involved in a wide spectrum of symptomatic respiratory tract diseases. However more recently it has been reported to be a pathogenic agent in the mechanism leading to atherosclerosis. In the present study the presence of *Chlamydomphila pneumoniae* was assessed, using nested PCR and *in situ* PCR, while the viability of the microorganism was investigated using RT *in situ* PCR. The results obtained demonstrated that *Chlamydomphila pneumoniae* was present and alive in the tissues examined. The global concordance of results in the three techniques used was 100%. RT *in situ* PCR can be considered a precious tool to detect bacterial mRNA in formalin fixed paraffin embedded samples provided an optimal standardization of the key variables is achieved.

INTRODUZIONE

Chlamydomphila pneumoniae (*C. pneumoniae*) è un organismo endocellulare obbligato, Gram negativo che, oltre ad essere correlato a sindromi di origine respiratoria è stato recentemente associato a patologie cardiovascolari (patologie coronariche (12, 14), aterosclerosi (5, 15), ecc...).

In due precedenti lavori abbiamo confermato la possibilità di dimostrare la presenza del DNA di *C. pneumoniae* sia nel sangue di soggetti sani (13) che in tessuto autoptico fissato in formalina ed incluso in paraffina (12) già riportata in letteratura da altri autori (10, 11).

La successiva implementazione del metodo con l'utilizzo della tecnica di PCR *in situ* (2), ci ha consentito di localizzare la presenza del microorganismo in precise strutture istologiche. Tali precedenti studi lasciavano tuttavia irrisolto il problema della dimostrazione di condizioni di vitalità del microorganismo nei tessuti indagati. Precedenti autori (3) hanno risposto a tale quesito ricorrendo allo studio dell'mRNA di *C. pneumoniae* su tessuti criopreservati, basandosi sul breve tempo di emivita di questa molecola.

Nel presente lavoro abbiamo valutato l'utilizzo della RT-PCR *in situ* (1, 9) su tessuti non più criopreservati, ma fissati in formalina ed inclusi in paraffina cercando di standardizzare condizioni metodologiche che consentissero una ottimale conservazione delle caratteristiche morfologiche del tessuto.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 5 distretti vascolari (poligono di Willis, arteria coronaria, aorta toracica, aorta addominale, arteria renale) da 27 pazienti

deceduti sottoposti ad autopsia per verificare la diagnosi clinica, poi confermata, di malattie cardiovascolari (infarto miocardico acuto), embolia polmonare e rottura di aneurisma dell'aorta.

I prelievi sono stati effettuati a livello di distretti vascolari evidenziando lesioni ateromasiche. Come controlli negativi sono stati utilizzati: campioni prelevati da 2 pazienti di età inferiore ai 20 anni deceduti per cause traumatiche e campioni di tessuto vascolare esenti da lesioni aterosclerotiche prelevati dai soggetti precedentemente studiati. Come controllo positivo è stata utilizzata una coltura di cellule Hep-2 infettata con *C. pneumoniae*.

Estrazione del DNA

Per effettuare l'estrazione del DNA da materiale biotico fissato in formalina e incluso in paraffina, venivano impiegate sezioni aventi spessore di 10 mm. Dopo la deparaffinatura, il tessuto veniva digerito con Tris HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, in presenza di Nonidet 6% e Proteinasi K per 18 ore a 55°C e bollito per 10 minuti.

PCR

Ricerca di *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*)

Il gene omp-A (major outer membrane protein gene) di *C. pneumoniae* è stato ricercato mediante un protocollo di PCR nested (12). Per l'amplificazione si sono utilizzati i seguenti primers: CP1 (5' – TTA CAA GCC TTG CCT GTA GG – 3') e CP2 (5' – GCG ATC CCA AAT GTT TAA GGC – 3') per la prima amplificazione e CPC (5' – TTA TTA ATT GAT GGT ACA ATA – 3') e CPD (5' – ATC TAC GGC AGT AGT ATA GTT – 3') per la

seconda amplificazione.

I primers esterni (CP1 e CP2) producono un amplificato di 333 pb comune a *C. pneumoniae* e *C. psittaci*. I primers interni (CPC e CPD) sono studiati per legarsi ad una sequenza variabile nel dominio omp-A specifica per *C. pneumoniae* e producono un segmento di 207 pb.

Assieme ai campioni in esame erano sempre presenti un controllo negativo ed un controllo positivo rappresentato da DNA purificato del ceppo IOL-207 isolato dal laboratorio dell'Ospedale di S. Maria degli Angeli (Pordenone). L'appartenenza di questo ceppo al tipo TWAR ATCC VR 1310 è stata dimostrata mediante sequenziamento.

La miscela di amplificazione per la prima reazione aveva un volume finale di 50 µl/campione ed era costituita da Tris HCl 6,7 µM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 1,6 µM, 200 µM dNTPs, 6 µM MgCl₂, 0,5 µM di ogni primer, 1 U di Taq Polimerasi (Eurobio, Francia) e 10 µl DNA stampo.

La prima amplificazione era effettuata utilizzando la tecnica "Touchdown PCR" con abbassamento della temperatura di 1°C ogni 2 cicli, da 65°C fino a 55°C, seguito da ulteriori 20 cicli alla temperatura di 55°C. Come stampo per la seconda amplificazione sono stati utilizzati 5 ul del prodotto della prima amplificazione.

La seconda amplificazione differenziava dalla prima solo per i primers (CPC, CPD) e per il Mg⁺⁺ utilizzato (3 mM). Le condizioni di amplificazione prevedevano 5' a 94°C seguiti da 40 cicli di 1' a 94°C, 1' a 50°C e 1' a 72°C con 7' di estensione finale a 72°C. L'analisi di tutti i campioni è stata effettuata 2 volte. La dimensione attesa dell'amplificato di CP erano rispettivamente 333 e 207 bp.

Analisi di sequenza

Le bande ottenute dall'amplificazione del gene omp-A di *C. pneumoniae* sono state purificate secondo le istruzioni del kit GeneClean II (BIO 101, Rutherford Rd., Carlsband, CA).

I campioni così ottenuti sono stati usati per la reazione di sequenziamento su GeneAmp 9600 (PE Biosystems): 10 secondi a 96°C, 5 secondi 50°C e 4 minuti a 60°C, per 25 cicli.

I prodotti della reazione sono stati purificati con Centri-Sep Columns (Princeton Separation) per rimuovere l'eccesso di DyeDeoxy™ terminators prima dell'analisi con il sequenziatore automatico, 4 µl di prodotto sono stati quindi risospesi in 16µl di H₂O e, senza denaturazione, sono stati analizzati su ABI PRIMS 310 alle seguenti condizioni: iniezione di 10 secondi, voltaggio di iniezione pari a 2kV e voltaggio di corsa pari a 15kV alla temperatura costante di 45°C per 18 minuti,

usando il polimero POP4 (Applied Biosystems) con il modulo Seq POP 4 E. Le sequenze ottenute sono state esaminate con il programma FASTA (web site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) per identificare la porzione amplificata del gene omp-A.

PCR *in situ*

Dai campioni PCR positivi, sono state ottenute sezioni dello spessore di 4 µm per l'analisi di PCR *in situ* (2). Dopo la deparaffinatura, le sezioni sono state digerite con HCl 0.2 M per 20 minuti a 37°C e per altri 10 minuti a 37°C con Proteinasi K 10 mg/ml, in tampone Tris HCl 0.05M pH 9 preriscaldato a 37°C, trattate per 15" con acido acetico 20% a 4°C per inattivare la fosfatasi alcalina endogena contenuta nel tessuto, quindi disidratate attraverso una scala crescente di etanolo (dal 70% al 100%) e lasciate asciugare all'aria.

Il gene omp-A di *C. pneumoniae* è stato amplificato mediante un protocollo di amplificazione "single-step" utilizzando i primers interni (CPC e CPD) come per la seconda reazione di PCR in provetta. La miscela di reazione era costituita da 10 mM Tris HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1 µM primers, 5 U AmpliTaq DNA Polimerasi *In Situ* (Applied Biosystems), 2.5 µM dig-dUTP.

Per ogni sezione venivano utilizzati 50 µl di miscela di reazione sigillati utilizzando un diaframma in silicone monouso e un fermaglio in acciaio inossidabile, in grado di far presa ai lati del vetrino.

Il protocollo di amplificazione prevedeva 2,5 minuti a 94°C, e 40 cicli di amplificazione di 1' a 94°C, 1' a 50° e 30" a 72°C.

L'avvenuta reazione è stata evidenziata mediante incubazione per 30' a 37°C con un anticorpo anti-Digossigenina (αDigossigenina-AP, KREATECH Diagnostic) coniugato con fosfatasi alcalina, e per 20' con il substrato NBT/BCIP (KREATECH Diagnostic).

Le sezioni, dopo una lieve controcolorazione con Ematossilina Carazzi, venivano fatte asciugare completamente, immerse in Xilene e montate con montavetrini automatico.

RT-PCR *in situ*

Al protocollo di PCR *in situ*, dopo la digestione iniziale, vengono introdotti 2 passaggi aggiuntivi: uno di degradazione del DNA e uno di retrotrascrizione dell'RNA.

La degradazione del DNA è stata effettuata utilizzando Dnase Rnase free 0,01 U/µl per 10' a 37°C. La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando 1 mM dNTPs, 25 U Rnase inhibitor, 1,25 µM ran-

dom examers, 50 U Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) ed incubando i vetrini 30' a 42°C. A questo passaggio è stato fatto seguire il protocollo di amplificazione e di visualizzazione come per la PCR *in situ*. Tutti i tamponi ed i lavaggi sono stati effettuati utilizzando acqua DEPC.

Come controlli sono stati utilizzati:

- controllo negativo: tessuto non infettato;
- controllo dell'efficacia del trattamento con Dnase: tessuto con *C. pneumoniae* trattato con Dnase sul quale non veniva effettuata retrotrascrizione, ma solo amplificazione;
- controllo positivo: coltura di cellule Hep-2 infettata con *C.pneumoniae* precedentemente controllata mediante immunofluorescenza (figura I).

RISULTATI

Il DNA del gene *omp-A* è stato riscontrato nelle placche ateromasiche esaminate e un esempio di PCR è riportato in figura II.

La determinazione della specificità del DNA amplificato è stata effettuata mediante sequenziamento.

Il confronto della sequenza ottenuta evidenzia una omologia del 100% con quella per la regione in esame del gene *omp-A*; tale sequenza è identica per tutti i campioni esaminati (figura III).

Tutti i campioni risultati positivi alla PCR in provetta sono stati sottoposti a PCR *in situ* ed hanno evidenziato un segnale indicativo della presenza del microrganismo a livello intracellulare; la figura IV ne riporta alcuni esempi. Sugli stessi campioni è stata eseguita la RT-PCR *in situ* ed alcuni risultati sono stati riportati in figura V.

La validità dei protocolli utilizzati è stata confermata dai risultati ottenuti applicandoli ad una coltura di cellule Hep-2 infettate con CP (figura I).

Con questa tecnica abbiamo potuto determinare che l'RNA è localizzato nelle stesse cellule risultate positive alla ricerca di DNA e che *C. pneumoniae* era presumibilmente vitale all'interno di tali cellule.

Tutti i tessuti risultati positivi in PCR in provetta sono stati esaminati con le tecniche di PCR *in situ* e RT-PCR *in situ*.

Queste due tecniche hanno confermato la positività e hanno permesso di localizzarla nel tessuto.

DISCUSSIONE

Come descritto in un nostro precedente studio (2) la PCR *in situ* accoppia l'estrema sensibilità della PCR, che consente l'individuazione del DNA bersaglio presente anche in basso numero di copie, con la possibilità di localizzare l'antigene a livello cellulare propria dell'immunoistochimica.

È noto che i risultati conseguibili mediante l'applicazione delle sole metodiche immunoistochimiche risentono negativamente dei fenomeni degradativi particolarmente evidenti nel tessuto autoptico quali ad esempio la lisi cellulare ed il rilascio di enzimi lisosomiali con fuoriuscita degli antigeni cellulari e comparsa di diffusione del segnale tale da rendere difficile l'interpretazione della reazione.

I metodi di PCR *in situ* non sono gravati da questo limite grazie a caratteristiche proprie del DNA quali ad esempio le dimensioni e la stabilità.

Obiettivo del lavoro era anche dimostrare la vitalità del microrganismo ricercato. A tale scopo abbiamo fatto ricorso alla ricerca dell'mRNA utilizzando una metodologia RT-PCR *in situ*.

Infatti nei campioni autoptici, nei quali la fissazione avviene dopo almeno 24-48 ore dalla morte, le metodologie tradizionali per tale ricerca (Northern blot, RT-PCR in provetta), non consentono di ottenere buoni risultati, dal momento che l'mRNA va incontro ad un processo di degradazione.

L'utilizzo di una metodologia *in situ* evita il passaggio di estrazione, andando direttamente a ricercare l'mRNA fissato nel tessuto (4, 7, 8).

Questo accorgimento è utile poiché non comporta alcuna aggiuntiva manipolazione dell'mRNA che porterebbe ad una ulteriore degradazione dello stesso.

La fissazione in formalina rappresenta un elemento di vantaggio per la riuscita dell'RT-PCR *in situ* in termini di determinazione dell'amplificato e di prevenzione della migrazione degli acidi nucleici all'esterno della cellula, purché vengano rispettate determinate condizioni (tempi limitati di fissazione) (6).

È noto che il tempo di digestione e la degradazione del DNA sono le variabili che più condizionano il funzionamento della tecnica di RT *in situ* PCR.

In particolare l'ottimizzazione della digestione con proteasi permette l'entrata dei primers e degli enzimi verso la sequenza target ed evita la diffusione all'esterno della cellula dei prodotti di amplificazione.

Il trattamento con Dnasi ha la funzione di rendere il DNA genomico non amplificabile.

Il controllo della degradazione del DNA garantisce che il segnale prodotto derivi dall'mRNA (espressione) e non dal DNA (informazione).

Condizioni ottimali di digestione del tessuto e degradazione del DNA sono inoltre critiche per il mantenimento delle caratteristiche morfologiche originarie del tessuto in esame.

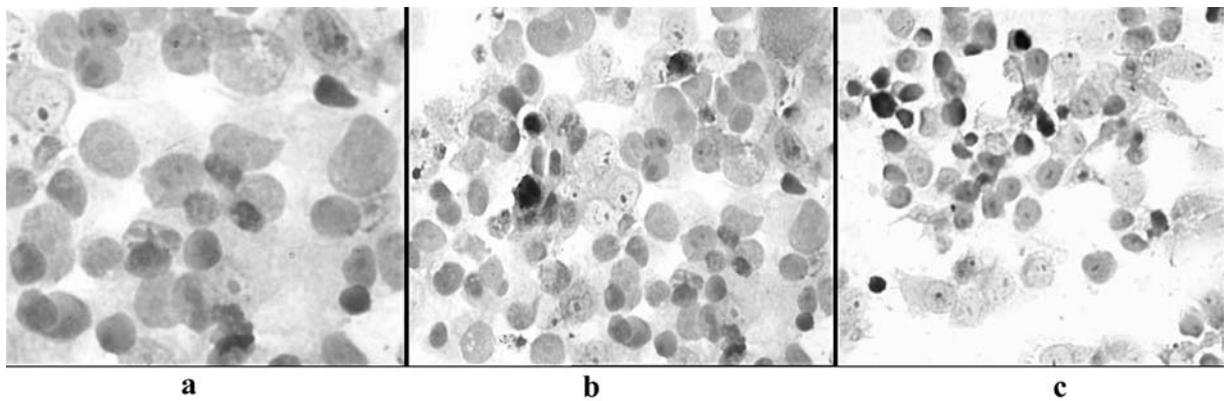


Figura I. a. Coltura di cellule HEp-2 trattate con Dnasi e non retrotrascritte (controllo negativo). b. determinazione mediante PCR *in situ* del gene *omp-A* dall'infezione con *C. pneumoniae* dopo 72 ore. c. determinazione mediante RT-PCR *in situ* del gene *omp-A* in coltura di cellule HEp-2 dopo 72 ore.

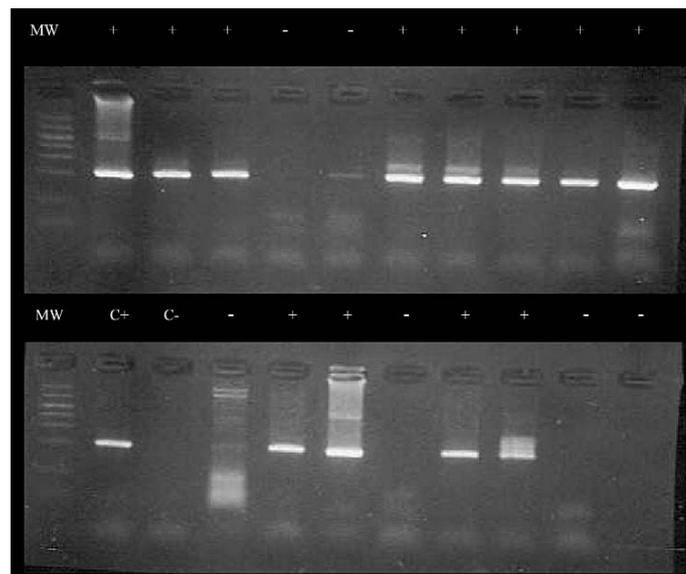


Figura II. PCR nested per la determinazione di una porzione del gene *omp-A* di *C. pneumoniae* dimensioni dell'amplificato 207 bp.

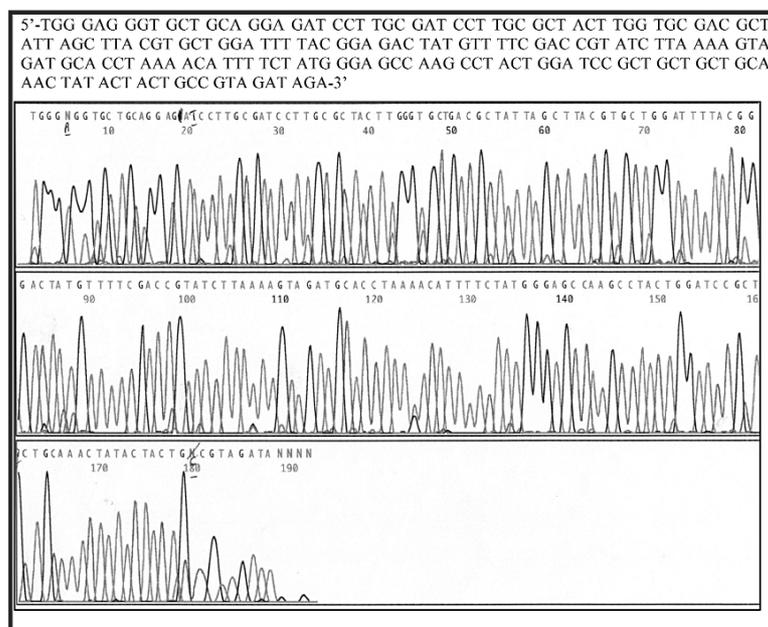
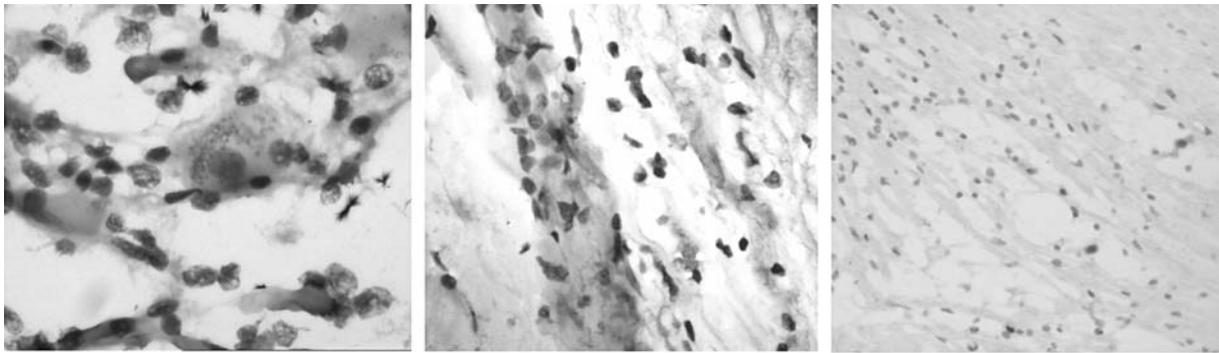


Figura III. Analisi di sequenza del gene *omp-A* di *C. pneumoniae* mediante sequenziatore automatico ABI PRISM Model 310.

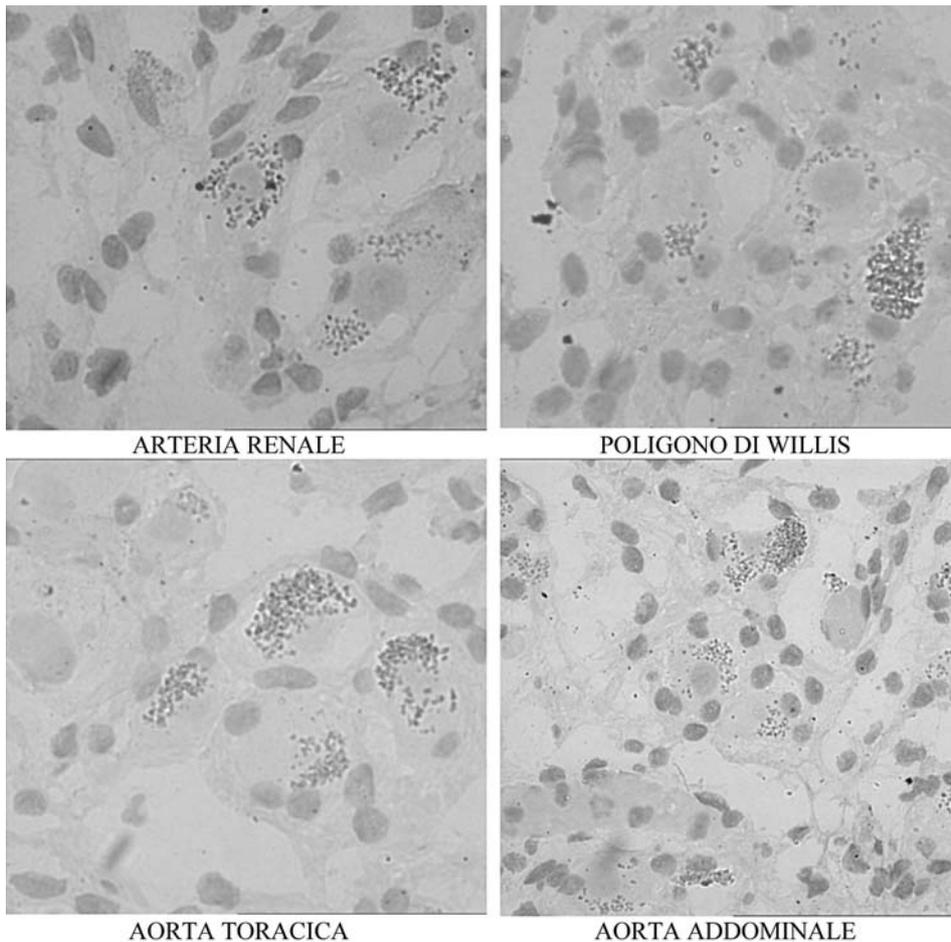


ARTERIA RENALE

POLIGONO DI WILLIS

AORTA TORACICA

Figura IV. PCR *in situ* per la determinazione del DNA di *C. pneumoniae* in tessuti di origine vascolare precedentemente positivi per PCR.



ARTERIA RENALE

POLIGONO DI WILLIS

AORTA TORACICA

AORTA ADDOMINALE

Figura V. RT-PCR *in situ* per la determinazione dell'RNA di *C. pneumoniae* in tessuti di origine vascolare precedentemente positivi per PCR e PCR *in situ*.

CONCLUSIONI

La tecnica illustrata funziona con ottimi risultati su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina come dimostrato dalla concordanza dei dati ottenuti con le altre tecniche utilizzate (PCR nested e PCR *in situ*).

Questa caratteristica ne permette un'applicazione

retrospettiva ad ampio spettro, che la rende particolarmente utile in presenza di grossi archivi di tessuto.

Ulteriore vantaggio è costituito dalla possibilità di evitare la fase di estrazione che notoriamente rende poco applicabile la retrotrascrizione nei tessuti fissati.

Le condizioni di lavorazione da noi proposte consentono di ovviare alla perdita di dettaglio morfologico ed al rischio di amplificare DNA al posto dell'mRNA.

La RT-PCR *in situ* rappresenta quindi un valido metodo per la ricerca su materiale fissato di microrganismi vitali localizzandoli in strutture istologiche definite e può quindi offrire un significativo contributo allo studio di patologie nelle quali l'azione di un agente infettante può giocare un ruolo patogenetico.

La complessità di esecuzione ed i tempi di esecuzione richiesti rappresentano una controindicazione ad applicazioni routinario-diagnostiche.

BIBLIOGRAFIA

- Bonetti B, Scardoni M, Monaco S, Rizzato N, Scarpa A. Hepatitis C virus infection of peripheral nerves in type II cryoglobulinaemia. *Virchows Arch* June; 1999; 434(6): 533-5.
- Cazzavillan S, Bonoldi E, Segala C, Rossi M, d'Amore E, Rasso M. Applicazioni della PCR e PCR *in situ* nella diagnosi di infezioni batteriche e virali da biopsie fissate in formalina e incluse in paraffina. *Microbiologia Medica*. 2003; 18(1): 56-64.
- Esposito G, Blasi F, Allegra L, et al. Demonstration of viable *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg* Jul 1999; 13(14): 421-5.
- Iwasaka T, Umemura S, Kakimoto K, et al. Expression of prolactin mRNA in rat mammary gland during pregnancy and lactation. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 389-95.
- Kuo CC, Shor A, Campbell LA, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993; 167: 841-9.
- Mies C. Molecular pathology of paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1(3): 206-11.
- Moridaira K, Nodera M, Sato G, Janagisawa H. Detection of prepro-ET1 mRNA in normal rat kidney by *in situ* RT-PCR. *Nephron Experimental Nephrology* 2003; 95(2): e55-e61.
- Nuovo GJ, Morrison C, Porcu P, Caligiuri MA, Suster S. *In situ* determination of T cell receptor beta expression patterns. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 139-45.
- Nuovo GJ. The foundation of successful RT *in situ* PCR. *Frontiers in Bioscience* 1, c4-15, Nov 1, 1996.
- Nuovo JG, MacConnell P, Forde A, Delvenne P. Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridisation after amplification by polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1991; 139(4): 847-54.
- Nuovo JG. Human papillomavirus DNA in genital tract lesions histologically negative for condylomata. *Am J Surg Pathol* 1990; 14(7): 643-51.
- Rasso M, Cazzavillan S, Scagnelli M, et al. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic arteries from various vascular regions. *Atherosclerosis* 2001; 158: 73-9.
- Rasso M, Lauro FM, Cazzavillan S, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells of blood donors in the north-east of Italy. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 139-44.
- Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, et al. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk for coronary heart disease in the Helsinki Heart study. *Ann Intern Med* 1992; 116(4): 273-8.
- Taylor-Robinson D, Thomas BJ. *Chlamydia pneumoniae* in arteries: the facts, their interpretation and future studies. *J Clin Pathol* 1998; 51: 793-7.
- Tong CYW, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. *J Clin Pathol* 1993; 46: 313-7.

Stefania Cazzavillan

ULSS 6 Vicenza

Via Rodolfi 36

36100 Vicenza

Tel. 0444 753275; Fax 0444753273

E-mail: biomol.anatpat@ulssvicenza.it